

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

**Estudo da expressão gênica e de polimorfismos da  
CYP3A5 em pacientes com hipercolesterolemia tratados  
com atorvastatina**

Maria Alice Vieira Willrich

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientadora:  
Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo  
Hirata

São Paulo  
2006





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

**Estudo da expressão gênica e de polimorfismos da  
CYP3A5 em pacientes com hipercolesterolemia tratados  
com atorvastatina**

Maria Alice Vieira Willrich

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientadora:  
Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo  
Hirata

São Paulo  
2006

---

### Ficha Catalográfica

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

Willrich, Maria Alice Vieira

W739e      Estudo da expressão gênica e de polimorfismos da CYP3A5 em  
pacientes com hipercolesterolemia tratados com atorvastatina. --  
São Paulo, 2006.  
122p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas  
e Toxicológicas.

Orientador: Hirata, Rosário Dominguez Crespo

1. Análise clínica : Medicina 2. Expressão gênica 3.  
DNA : Polimorfismo 4. Colesterol : Bioquímica I. T. II.  
Hirata, Rosário Dominguez Crespo, orientador.

616.0756-9 CDD



Maria Alice Vieira Willrich

Estudo da expressão gênica e de polimorfismos da *CYP3A5* em  
pacientes com hipercolesterolemia tratados com atorvastatina

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata  
Orientadora/Presidente

Profa. Dra. Edna Regina Nakandakare  
1º. examinador

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara  
2º. examinador

São Paulo, 11 de dezembro de 2006.

## CARTA AOS JOVENS

O que desejaria eu aos jovens de minha Pátria, consagrados à ciência?

Antes de tudo, constância. Nunca posso falar sem emoção sobre essa importante condição para o trabalho científico. Consciência, consciência e constância! Desde o início de seus trabalhos habituem-se a uma rigorosa constância na acumulação de conhecimento.

Aprendam o ABC da Ciência antes de tentar galgar seu cume. Nunca acreditem no que se segue sem assimilar o que vem antes. Nunca tentem dissimular sua falta de conhecimento, ainda que com suposições e hipóteses audaciosas. Como se alegra nossa vida com o jogo de cores dessa bolha de sabão – no entanto ela, inevitavelmente, arrebenta e nada fica além da confusão. Acostume-se à discricção e à paciência. Aprendam o trabalho árduo da ciência. Estudem, comparem, acumulem fatos.

Ao contrário das asas perfeitas dos pássaros, a Ciência nunca conseguirá alçar vôo, nem sustentar-se no espaço. Fatos – essa é a atmosfera do cientista. Sem eles nunca poderemos voar. Sem eles nossa teoria não passa de um esforço vazio.

Porém, estudem, experimentem, observem, esforcem-se para não abandonar os fatos à superfície. Não se transformem em arquivistas de fatos. Tentem penetrar no mistério de sua origem e, com perseverança, procurem as leis que os governam.

Em segundo lugar, sejam modestos. Nunca pensem que sabem tudo. E não se tenham em alta conta; possam ter sempre a coragem de dizer: sou ignorante.



Não deixem que o orgulho os domine. Por causa dele poderão obstinar-se, quando for necessário concordar; por causa dele renunciarão ao conselho saudável e ao auxílio amigo; por causa dele perderão a medida da objetividade.

Em terceiro lugar – a paixão. Lembrem-se de que a Ciência exige que as pessoas se dediquem a ela durante a vida inteira. E se tivessem duas vidas, ainda assim não seria suficiente. A Ciência demanda dos indivíduos grande tensão e forte paixão.

Sejam apaixonados por sua ciência e por suas pesquisas.

Nossa Pátria abre um vasto horizonte para os cientistas e é preciso reconhecer – a Ciência generosamente nos introduz na vida de nosso país. Prossigam com o máximo de generosidade!

O que dizer sobre a situação de nossos jovens cientistas? Eis que aqui tudo é claro. A vocês muito foi dado, mas de vocês muito se exige. E para os jovens, assim como para nós, a questão de honra é ser digno de uma esperança maior, aquela que é depositada na ciência de nossa Pátria.

Ivan Petrovich Pavlov (1849 – 1936), fisiologista russo

## DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Verner, farmacêutico-bioquímico como eu.

Ele me ensinou a acreditar em mim mesma sempre, me ensinou a plantar sementes, a ir em busca dos meus sonhos.

Ele compartilhou comigo muitos momentos desta jornada. Momentos de angústia, momentos de dúvida, e principalmente dos momentos de alegria. Ele vibrava comigo a cada novo paciente que era incluído no estudo, a cada conquista que eu fazia.

Ele deixou muito mais que saudades em meu coração. Deixou um exemplo de liderança, de bondade, de dedicação à vida, à profissão, de amor à família, e de amizade. As sementes que ele me ensinou a plantar prosperaram. Tenho certeza que de onde ele estiver me olhando, ele estará orgulhoso.

Este fruto do meu trabalho é dedicado a você, pai.

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de sua diretora, Prof. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, que me recebeu de portas abertas.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu chefe, Prof. Tit. Ana Campa.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa, CNPq, pela bolsa de mestrado concedida.

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

Aos médicos da Seção de Lipoproteínas do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, pela obtenção de parte das amostras utilizadas neste trabalho.

Aos médicos da Divisão de Clínica Médica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em especial ao Dr. Egidio Lima Dorea, pela valiosa colaboração na seleção dos pacientes deste estudo.

Aos funcionários da Unidade Básica de Atendimento à Saúde do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, pela generosidade, paciência, pelo espaço e pela liberdade que nos deram para a condução da seleção diária dos pacientes.

Aos funcionários do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, pela realização dos exames de triagem dos pacientes, e pelo espaço cedido semanalmente para a coleta de amostras.

Aos pacientes, que de forma anônima generosamente contribuíram para o melhor entendimento dos fatores que influenciam a resposta terapêutica à atorvastatina.

## **AGRADECIMENTOS PESSOAIS**

À minha mãe, Teresa, por ser presente na minha vida, como amiga, como conselheira, como provedora. Por ter uma força admirável para enfrentar a vida, por não ter vergonha de errar, gritar, expor. Por amar. Por acreditar em mim, no meu potencial, “você faz a diferença”, ela diz, “vá em frente”! Tem algo mais inspirador que isso? Alguém que acredita em você? Obrigada, mãe, por ser você, com todos os seus atributos. Obrigada por ter me passado 50% do seu genoma, ter feito uma recombinação genética excelente com o pai, e dado a vida a essa pessoa que eu sou... Sem amor, eu nada seria.

Ao meu irmão, Werner Gustavo, por ter nascido, brincado, brigado comigo tantas vezes quando criança, e por ter crescido, e ter se tornado o jovem homem que é: o irmão companheiro, o amigo para todas as horas, o cara que acredita nas pessoas – e nos sonhos delas. Obrigada Gu, por ser O cara, e por, mesmo à distância, ter acreditado.

À minha orientadora, Prof. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata, por ter me acolhido sem muito me conhecer, e ter me ajudado a tornar-me uma pessoa melhor. Sua capacidade de análise, de produção, de reflexão, seu espírito de liderança e de equipe são raros. É uma pesquisadora nata, completa, e muito me orgulha ser sua aluna. Obrigada por tantos ensinamentos, não só científicos, mas de vida.

Ao Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata, pelo pulso firme, pelas oportunidades que ele cria, pelas idéias brilhantes, mirabolantes, que ele tem. Ele sonha, em seguida planeja, e as idéias tornam-se projetos reais, factíveis. O senhor é fonte de inspiração para seus alunos. Obrigada por tudo.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Conviver com vocês durante esses dois anos foi uma experiência de valor inestimável. O trabalho em equipe é bárbaro, e a contribuição de cada um de vocês imensurável. Todos vocês me fizeram crescer, me ajudaram a superar as dificuldades diárias, seja por uma palavra amiga em um momento de frustração, seja por abrirem os meus olhos nas horas de cansaço, seja simplesmente por estarem presentes. Aprender é um processo diário e contínuo, e eu aprendi com vocês todos os dias.

Meus caros, muito mais do que Ciência, vocês me ensinaram o valor do trabalho em equipe e de uma verdadeira amizade. Meu muito obrigada a todos vocês.

## RESUMO

WILLRICH, Maria Alice Vieira. **Estudo da expressão gênica e polimorfismos da CYP3A5 em indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina**. 2006. 122 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A isoenzima citocromo P450 3A5 (CYP3A5) tem um papel importante na biotransformação de compostos endógenos e xenobióticos. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene *CYP3A5* foram associados com variações na expressão gênica e atividade enzimática que podem modificar o metabolismo de vários fármacos. Com a finalidade de investigar a influência de SNPs do *CYP3A5* sobre a expressão de RNAm e a resposta a atorvastatina, foram selecionados 99 indivíduos normolipidêmicos (NL) e 139 hipercolesterolêmicos (HC). Os pacientes HC foram tratados com atorvastatina (10 mg/dia/4 semanas). Amostras de sangue periférico foram coletadas antes e após o tratamento para análise do perfil lipídico sérico, e extração de DNA genômico e RNA total. Os SNPs *CYP3A5\*3C* e *CYP3A5\*6* foram analisados por PCR-RFLP e o *CYP3A5\*1D* por sequenciamento de DNA. A expressão de RNAm do *CYP3A5* em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foi analisada por PCR em tempo real. No grupo HC, os alelos *CYP3A5\*3C* e *CYP3A5\*1D* foram mais frequentes em brancos (\*3C: 84,9% e \*1D 84,8%) que em afro-descendentes (\*3C: 47,8% e \*1D: 55,2%,  $p < 0,01$ ). Os alelos \*3C e \*1D estavam em desequilíbrio de ligação. A frequência do alelo *CYP3A5\*6* foi maior em negros (6,8%) que em brancos (0,6%,  $p = 0,002$ ). Não houve associação entre os SNPs do *CYP3A5* e o perfil lipídico basal nos grupos NL e HC. Os HC brancos portadores do haplótipo *CYP3A5\*3A/\*3A* (alelos \*3C e \*1D combinados) apresentaram menor redução de colesterol total e LDL-c após o tratamento com atorvastatina do que os portadores dos haplótipos não-*CYP3A5\*3A/\*3A* ( $p < 0,05$ ). A expressão de RNAm de *CYP3A5* em CMSP aumentou em resposta a atorvastatina ( $p < 0,05$ ) somente nos portadores de haplótipo *CYP3A5\*3A/\*3A*. Esses resultados são sugestivos de que os SNPs *CYP3A5\*3C* e *CYP3A5\*1D* são associados com a expressão gênica do *CYP3A5* e a resposta de redução de colesterol a atorvastatina.

Palavras-chave: CYP3A5. Hipercolesterolemia. Expressão gênica. Atorvastatina. Farmacogenética.

## ABSTRACT

WILLRICH, Maria Alice Vieira. **Study of CYP3A5 gene expression and polymorphisms in hypercholesterolemic individuals treated with atorvastatin.** 2006. 122 f. Dissertation (Masters Degree) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The cytochrome P450 isoenzyme 3A5 (CYP3A5) has an important role on biotransformation of endogenous compounds and xenobiotics. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *CYP3A5* gene have been associated with variations on gene expression and enzyme activity that can modify the metabolism of several drugs. In order to evaluate the influence of *CYP3A5* SNPs on RNA expression and response to atorvastatin, 99 normolipidemic (NL) and 139 hypercholesterolemic (HC) individuals have been enrolled in this study. HC patients were treated with atorvastatin (10 mg/day/four weeks). Blood samples were collected before and after treatment for serum lipids analyses, genomic DNA and total RNA extraction. *CYP3A5\*3C*, and *CYP3A5\*6* SNPs were analyzed by PCR-RFLP. *CYP3A5\*1D* was analyzed by direct sequencing. *CYP3A5* RNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was evaluated by Real Time PCR. In HC group, the frequencies of *CYP3A5\*3C* and *CYP3A5\*1D* alleles were higher in white individuals (*\*3C*: 84.9% and *\*1D* 84.8%) that in blacks (*\*3C*: 47.8% and *\*1D*: 55.2%,  $p < 0.01$ ). *CYP3A5\*3C* and *\*1D* alleles were in linkage disequilibrium. *CYP3A5\*6* allele frequency was higher in blacks (6.8%) that in white individuals (0.6%,  $p = 0.002$ ). There was no association between *CYP3A5* SNPs and baseline lipid profile in NL and HC groups. White HC carriers of *CYP3A5\*3A/\*3A* haplotype (*\*3C* and *\*1D* combined alleles) have lower total cholesterol and LDL-c response to atorvastatin than non-*CYP3A5\*3A/\*3A* carriers ( $p < 0.05$ ). *CYP3A5* RNA expression on PBMC increased in response to atorvastatin ( $p < 0.05$ ) only in *CYP3A5\*3A/\*3A* haplotype carriers. These results are suggestive that *CYP3A5\*3C* and *CYP3A5\*1D* SNPs are associated with *CYP3A5* gene expression and cholesterol-lowering response to atorvastatin.

Keywords: CYP3A5. Hypercholesterolemia. Gene expression. Atorvastatin. Pharmacogenetics.



## LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina Aminotransferase
Apo	Apolipoproteína
Apo AI	Apolipoproteína AI
Apo B	Apolipoproteína B
CMSP	Células Mononucleares de Sangue Periférico
CK	Creatina quinase
CT	Colesterol Total
DAC	Doença Arterial Coronariana
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FAM	6-carboxifluorosceína
HC	Hipercolesterolêmicos
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HDL-c	Colesterol da HDL
HMG-CoA	3-hidróxi-3metil-glutaril Coenzima A
IMC	Índice de Massa Corpórea
IDPC	Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
Kb	Kilobases
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LDL-c	Colesterol da LDL
NCEP	National Cholesterol Education Program
NL	Normolipidêmicos
PA	Pressão Arterial
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAm	RNA Mensageiro
Pb	Pares de Bases
PTC	Códon de terminação prematuro
SNP	Polimorfismo de Um Único Nucleotídeo
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
TG	Triglicérides
TSH	Hormônio tireoestimulante
T4 livre	Tetraiodotironina livre
UGT	UDP-glucuronosiltransferase
UTR	Região não-traduzida (Untranslated Region)
VIC <sup>TM</sup>	Fluoróforo disponibilizado pela Applied Biosystems®. Emite fluorescência em 340nm
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
VLDL-c	Colesterol da VLDL



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	25
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
<b>3.1 Casuística e protocolo terapêutico</b> .....	26
<b>3.2 Amostras biológicas</b> .....	28
<b>3.3 Linhagens celulares e condições de cultivo</b> .....	29
<b>3.4 Determinações dos parâmetros bioquímicos</b> .....	30
<b>3.5 Extração e análise de DNA genômico</b> .....	31
<b>3.6 Ensaios de PCR</b> .....	33
<b>3.7 Ensaios de RFLP</b> .....	37
<b>3.8 Ensaios de sequenciamento de DNA</b> .....	40
<b>3.9 Extração e análise do RNA total</b> .....	43
<b>3.10 Análise da expressão de RNAm por RT-PCR <i>duplex</i></b> .....	45
<b>3.11 Análise da expressão de RNAm por RT-PCR em Tempo Real</b> .....	49
<b>3.12 Controle de qualidade dos ensaios de PCR-RFLP e RT-PCR</b> .....	51
<b>3.13 Análise estatística dos resultados</b> .....	52
<b>4 RESULTADOS</b> .....	54
<b>4.1 Dados dos indivíduos do estudo</b> .....	54
<b>4.2 Estudo dos polimorfismos genéticos</b> .....	61
<b>4.3 Estudo de resposta a atorvastatina</b> .....	70
<b>4.4 Estudo do efeito da atorvastatina sobre a expressão do RNAm de     <i>CYP3A5</i></b> .....	86
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	90
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	102
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	103
<b>OBRAS CONSULTADAS</b> .....	114
<b>APÊNDICES</b> .....	115

## 1 INTRODUÇÃO

A hipercolesterolemia é um fator importante no desenvolvimento da aterosclerose, em particular na doença arterial coronariana (SIMONS, 1986). Vários estudos multicêntricos demonstraram que o colesterol alto está associado com alta taxa de mortalidade (SIMONS, 1986).

Uma revolução no tratamento farmacológico da hipercolesterolemia ocorreu quando da introdução das vastatinas, potentes inibidores da 3-hidróxi-3-metil-glutaril coenzima A (HMGCoA) redutase microssomal que é a enzima chave na síntese de colesterol (VAUGHAN; GOTTO JÚNIOR, 2004).

A HMG-coA redutase converte a HMG-coA em mevalonato, um precursor dos compostos isoprenóides envolvidos na sinalização e na proliferação celular (LENNERNAS, 2003). A inibição da HMG-coA redutase resulta em diminuição de síntese de colesterol e redução da produção de citocinas inflamatórias, bem como bloqueio do ciclo celular sendo os dois últimos efeitos pleiotrópicos atribuídos às vastatinas (LENNERNAS, 2003).

A redução da síntese endógena de colesterol é um sinalizador de transdução de sinal na célula que resulta na indução da expressão de receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL). Esse efeito aumenta a captação de partículas de LDL pelas células hepáticas e extra-hepáticas, reduzindo dramaticamente a colesterolemia (BROWN; GOLDSTEIN, 2004).

As vastatinas promovem a redução de colesterol da LDL (LDL-c, 18 a 55%) e triglicerídeos (7 a 30%), e aumento de colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-c, 5 a 15%) (SCHMITZ; DROBNIK, 2003).

As vastatinas também estão associadas com redução no risco relativo de infarto do miocárdio e/ou morte por doença arterial coronariana (DAC) de

23 a 37%, demonstrado em estudos de prevenção primária (WOSCOPS e AFSCAPS/TexCAPS) e prevenção secundária (4S, CARE e LIPID) (SCHMITZ; DROBNIK, 2003).

A atorvastatina é um inibidor sintético reversível da HMG-coA redutase, administrado via oral como sal cálcico da forma ativa hidróxi-ácida (VAUGHAN; GOTTO JÚNIOR, 2004). É biotransformada primariamente por enzimas de fase I da subfamília 3A do citocromo P450, CYP3A4 e CYP3A5, no intestino e no fígado (LENNERNAS, 2003). A especificidade bioquímica dessas enzimas pelos seus substratos é tão semelhante que são dificilmente distinguidas (WILKINSON, 2005).

Na fase II da biotransformação hepática, a atorvastatina sofre glucoronidação, mediada pelas UDP-glicuronil transferases (UGT) 1A1 e 1A3, resultando em intermediários acil-glucoronídeos (JACOBSEN *et al.*, 2000; PRUEKSARITANONT *et al.*, 2002).

O efluxo celular da atorvastatina é realizado pelos transportadores de fase III, representados principalmente pela glicoproteína P, uma proteína da família ABC (*ATP-binding cassette*) (BOGMAN *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2005).

A atorvastatina é a vastatina mais eficaz na redução do colesterol, alcançando redução de 52 a 55% em sua dose máxima de 80mg (STEIN, 2002). A atorvastatina é considerada segura, entretanto, aproximadamente 1 a 5% dos pacientes que utilizam este fármaco apresentam reações adversas (BELLOSTA; PAOLETTI; CORSINI, 2004; CORSINI *et al.*, 2003).

Entre as reações adversas, as mais graves são elevação assintomática das enzimas hepáticas, particularmente a alanina transferase (ALT), em até três vezes o valor superior de referência; e anormalidades na musculatura esquelética, que podem variar de dores musculares leves a miopatia (dor

muscular, associada à fraqueza e restrições de movimentos) e elevação da creatina quinase (CK) sérica em até 10 vezes. A miopatia ainda pode evoluir para rabdomiólise, caracterizada por grandes elevações de CK sérica (até 100 vezes o valor superior de referência), acompanhada de mioglobínúria, mioglobulinemia e evidência de dano orgânico, como função renal diminuída ou falência renal aguda (BELLOSTA; PAOLETTI; CORSINI, 2004; CORSINI *et al.*, 2003). O início dos efeitos adversos pode variar desde poucas semanas até dois anos da terapia com vastatinas (BELLOSTA; PAOLETTI; CORSINI, 2004).

Variações significativas na resposta hipolipemiante as vastatinas foram descritas em estudos clínicos (VAUGHAN; GOTTO JÚNIOR, 2004; THOMPSON; O'NEILL; SEED, 2002). O uso concomitante de medicamentos que inibem a atividade da CYP3A, como o itraconazol, gemfibrozil, niacina, ciclosporina, digoxina, warfarina e eritromicina, foi associado com biodisponibilidade oral e parâmetros farmacocinéticos das vastatinas elevados (MAURICE *et al.*, 1992; CORSINI *et al.*, 2003), o que aumenta potencialmente a exposição sistêmica a efeitos adversos.

Ativadores da CYP3A, como corticosteróides e anticonvulsivantes, reduzem significativamente as concentrações plasmáticas das vastatinas. Conseqüentemente, a interação entre esses medicamentos reduz drasticamente a eficácia das vastatinas (BELLOSTA; PAOLETTI; CORSINI, 2004).

Além desses fatores que determinam a resposta das vastatinas, há outros igualmente importantes, tais como o estado de saúde geral do paciente, a gravidade da doença, a qualidade da prescrição farmacológica e a diversidade genética entre os indivíduos (SANDER, 2000; SIEST *et al.*, 2005).

Estudos realizados no Brasil e em outros países demonstraram que polimorfismos de proteínas envolvidas no metabolismo lipídico estão associados a diferenças na resposta farmacológica a vastatinas. Entre essas proteínas, pode-se citar: receptor de LDL, apolipoproteína (apo) AI, Apo B, Apo E, proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP), fatores de transcrição como os *sterol regulatory element binding protein factors (SREBPF)* 1a e 1b, e enzimas como a lipase hepática e a *SREBPF cleavage activating protein (SCAP)* (SALAZAR *et al.*, 2000a; SORKIN *et al.*, 2005; GUZMÁN *et al.*, 2000; GARCIA-OTIN *et al.*, 2002; VOHL; SZOTS; LEVIELE, 2002; FIEGENBAUM *et al.*, 2005a, FIEGENBAUM *et al.*, 2005b).

Polimorfismos dos genes das CYP3A4 e CYP3A5 também são variantes importantes na resposta de vastatinas, como evidenciaram alguns estudos recentes (KIVISTO *et al.*, 2004; BELLOSTA; PAOLETTI; CORSINI, 2004; KAJINAMI *et al.*, 2004b; FIEGENBAUM *et al.*, 2005c).

Outros estudos recentes demonstraram que polimorfismos genéticos de enzimas de fase II (conjugativa) do metabolismo hepático, como as da família UGT1, estão associados com diferenças na glucoronidação de fármacos como o paracetamol, carbamazepina e lorazepam (KIANG; ENSOM; CHANG, 2005). Também foi demonstrado que variantes de genes de transportadores celulares da família ABC (fase III), como o da glicoproteína P, foram associadas com diferentes respostas a fluvastatina, simvastatina e atorvastatina (KAJINAMI *et al.*, 2004c; RODRIGUES *et al.*, 2005; FIEGENBAUM *et al.*, 2005c, BERCOVICH *et al.*, 2006).

A grande variabilidade interindividual na expressão de enzimas da subfamília CYP3A (20 a 40 vezes) é um fator importante que estimula sua investigação farmacogenética (LAMBA *et al.*, 2002). Os estudos

farmacogenéticos têm contribuído para o conhecimento de variantes associadas com a eficácia e a segurança de medicamentos. Esse conhecimento permitirá individualizar a estratégia de tratamento a fim de aumentar o sucesso da terapia farmacológica (EVANS; McLEOD, 2003).

As duas principais enzimas da subfamília 3A do citocromo P450, CYP3A4 e CYP3A5, têm a capacidade de metabolizar uma variedade de compostos químicos de quase todas as classes farmacológicas, por reações de hidroxilação, oxidação e redução. Exemplos de substratos são os inibidores da protease do HIV, bloqueadores de canal de cálcio, antiarrítmicos, ciclosporinas e vastatinas (KETTER *et al.*, 1995; VAUGHAN; GOTTO JÚNIOR, 2004), além de substâncias endógenas como a testosterona, progesterona e androstenediona (KUEHL *et al.*, 2001; SIEST; FERRARI; ACCAOUI, 2003).

As CYP3A4 e CYP3A5 são as mais importantes enzimas metabolizadoras de fármacos porque são abundantes tanto no epitélio intestinal quanto no fígado, onde representam 50% de atividade total das enzimas do citocromo P450 (KUEHL *et al.*, 2001). Entretanto, a taxa de atividade da CYP3A4 pode variar em até 10 vezes entre diferentes populações (BOTTORFF; HANSTEN, 2000).

O polipeptídeo 5 da subfamília 3A do citocromo P450 (CYP3A5) é codificado pelo gene *CYP3A5* que pertence ao agrupamento *CYP3A43–CYP3A4–CYP3AP2–CYP3A7–CYP3A5P1–CYP3A5*, localizado no cromossomo 7 (7q21-q22.1). Nesse agrupamento, também estão localizados os genes que codificam os outros membros da subfamília CYP3A: CYP3A4, CYP3A7 e CYP3A43 (XIE; WOOD; KIM, 2004).

A CYP3A7 é a principal forma fetal e sua expressão parece ser silenciada logo após o nascimento, sendo substituída progressivamente pela



CYP3A4 (WILLIAMS *et al.*, 2002; LACROIX *et al.*, 1997). No entanto, a CYP3A7 está presente em alguns adultos em baixas quantidades no fígado (KUEHL *et al.*, 2001). A CYP3A43 é uma isoforma recentemente identificada, cuja função ainda não foi completamente elucidada, mas seu envolvimento no metabolismo de fármacos parece ser de pouca importância, a julgar pela baixa expressão de seu RNAm nos diferentes tecidos (DOMANSKI *et al.*, 2001; GELLNER *et al.*, 2001; BUSI; CRESTEIL, 2005).

O gene *CYP3A5* tem 13 éxons e codifica uma proteína de 502 resíduos de aminoácidos, cuja seqüência tem 85% de similaridade com a *CYP3A4* (FUKUEN; FUKUDA; MAUNE, 2002).

A *CYP3A5* é o principal membro da *CYP3A* expresso em tecidos extra-hepáticos, como rins, pulmões, glândulas adrenais, mama, próstata e leucócitos mononucleares (**Figura 1**) (KUEHL *et al.*, 2001; BURK; WOJNOWSKI, 2004; LIU *et al.*, 2002) e parece ter papel fisiológico importante nestes tecidos podendo contribuir para a susceptibilidade a ação de carcinógenos, como os derivados do tabaco que são biotransformados pela *CYP3A5* nos pulmões (BALRAM *et al.*, 2003). A *CYP3A5* é a forma predominante no rim. Foi sugerido que polimorfismos na *CYP3A5* afetam o metabolismo endógeno do cortisol nos rins, e isso poderia afetar a pressão arterial através da retenção de sódio e água (LEE; GOLDSTEIN, 2005).

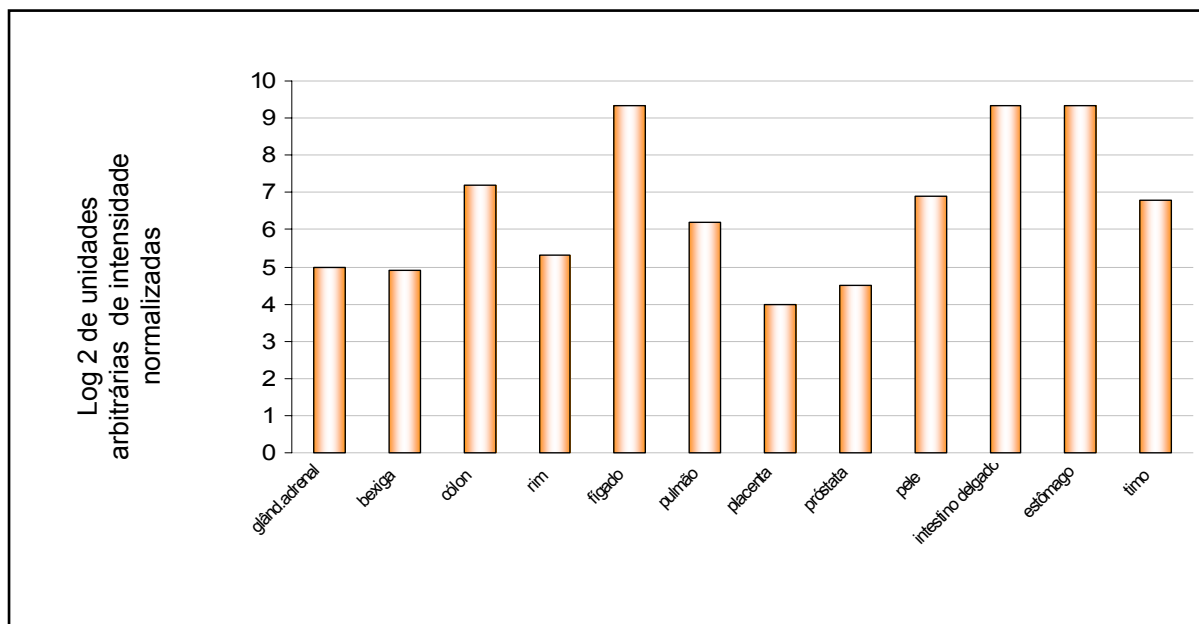


Figura 1. Perfil de expressão de RNAm de *CYP3A5* em diferentes órgãos ou tecidos por tecnologia de microarranjos (Affymetrix®). As amostras de RNA tecidual representadas são de diversos doadores. Adaptado de [www.ncbi.nlm.nih.gov/GEOprofiles](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GEOprofiles), acesso em 20 de junho de 2006.

Vários polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*, SNP) foram descritos em éxons e íntrons do gene *CYP3A5* (Figura 2) (HUSTERT; HABERL; BURK, 2001; KUEHL *et al.*, 2001; FUKUEN; FUKUDA; MAUNE, 2002; LAMBA *et al.*, 2002). O alelo *CYP3A5\*1A* é o único alelo conhecido que codifica para a enzima funcional. É distribuído diferencialmente entre as populações e sua freqüência varia de 10% a 65% (XIE; WOOD; KIM, 2004).

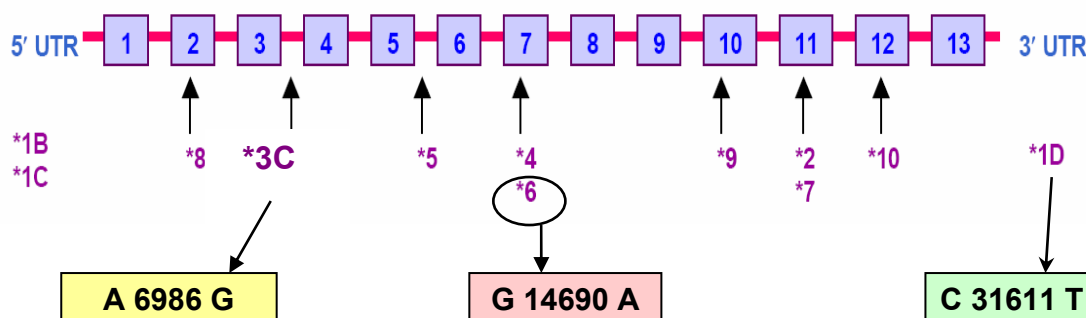


Figura 2. Esquema do gene *CYP3A5* e seus SNPs. Adaptação de Xie, Wood e Kim (2004).

O SNP mais comum é o A6986G (*CYP3A5\*3C*), localizado no íntron 3. Esse SNP cria um sítio de processamento no pré-RNA<sub>m</sub> e resulta na incorporação de 131 pb do íntron 3 no RNA<sub>m</sub> maduro (pseudoéxon 3B). Essa inserção causa uma mudança na fase de leitura aberta (*open reading frame*, ORF) do RNA<sub>m</sub>, e pode envolver deleções subseqüentes de éxons e/ou inserções de outras seqüências intrônicas. Os RNA<sub>m</sub> processados anormalmente (RNA<sub>m</sub> variantes) contêm vários códons de terminação prematuros (PTCs) na ORF, e por isso geram proteínas truncadas. A mais freqüente é proteína truncada no aminoácido 102, sem atividade enzimática (HUSTERT; HABERL; BURK, 2001; KUEHL *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2003; BUSI; CRESTEIL, 2005). Os RNA<sub>m</sub> variantes sofrem rápida degradação devido à presença dos PTCs, através de um mecanismo de proteção denominado *nonsense mediated decay* (NMD) (BUSI; CRESTEIL, 2005).

O SNP *CYP3A5\*3C* tem sido apontado como a principal causa de ausência da proteína CYP3A5 funcional (KUEHL *et al.*, 2001). Além disso, esse alelo foi associado com maior resposta ao tratamento com lovastatina, simvastatina ou atorvastatina por um ano, em um estudo com 46 hipercolesterolêmicos (KIVISTO *et al.*, 2004). Em uma população de indivíduos brancos brasileiros, não foi encontrada associação entre este alelo e a resposta a simvastatina (FIEGENBAUM *et al.*, 2005c).

O alelo *CYP3A5\*3C* em homozigose foi associado com elevação da CK sérica em pacientes com mialgia (WILKE; MOORE; BURMESTER, 2005). Ainda, a presença desse alelo foi relacionada com pior prognóstico na quimioterapia de pacientes com câncer de mama (DEMICHELE; APLEC; BOSBYL, 2005) e com hipertensão arterial em negros (GIVENS *et al.*, 2003;

FROMM *et al.*, 2005; KREUTZ *et al.*, 2005; KIVISTO *et al.*, 2005; HO *et al.*, 2005; BOCHUD *et al.*, 2006).

Polimorfismos do *CYP3A5* também foram associados com diferenças na biotransformação e farmacocinética de tacrolimus, um agente imunossupressor empregado na terapia pós-transplante e inibidor da atividade das enzimas da subfamília *CYP3A* (ZHENG *et al.*, 2004; HESSELINK *et al.*, 2003; THERVET *et al.*, 2003; BELLOSTA; PAOLETTI; CORSINI, 2004, GOTO; MASUDA; KIUCHI, 2004; HAUFROID; MOURAD; VAN KERCKHOVE, 2004; MACPHEE *et al.*, 2005; DAI *et al.*, 2006). Pacientes transplantados (pulmão, fígado ou rins) que expressavam a *CYP3A5* funcional (*CYP3A5\*1A*) requeriam doses mais altas de tacrolimus para manter a mesma concentração sanguínea que os portadores do genótipo *CYP3A5\*3C/\*3C*. (GOTO; MASUDA; KIUCHI, 2004).

O genótipo *CYP3A5\*1A/\*1A* também foi relacionado com maior metabolismo hepático e menor concentração plasmática de ABT-773, um antibiótico da classe dos quetolídeos (cetromicina), quando comparado com o genótipo *CYP3A5\*3C/\*3C* (KATZ; GRIMM; CASSAR, 2004).

Embora esses estudos tenham mostrado que o alelo *CYP3A5\*3C* está associado com maior biodisponibilidade de fármacos, Fukuda e colaboradores demonstraram que o alelo *CYP3A5\*3C* não está relacionado com variação na biodisponibilidade da nifedipina em voluntários saudáveis japoneses (FUKUDA; ONISHI; FUKUEN, 2004). O estudo de Chasman e colaboradores que avaliou 148 SNPs em pacientes hipercolesterolêmicos sob tratamento com pravastatina, concluiu que nenhum dos seis SNPs da *CYP3A5* estudados foi relacionado com variação na resposta hipolipemiante após 24 semanas de tratamento com pravastatina (CHASMAN *et al.*, 2004).

Outro SNP do gene *CYP3A5* é o G14690A (*CYP3A5\*6*) que causa uma deleção parcial do éxon 7 e resulta em uma proteína sem atividade funcional (KUEHL *et al.*, 2001). Esta variante é encontrada em negros com frequência de 12% e em caucasianos com frequência inferior a 1% (XIE; WOOD; KIM, 2004; GERVASINI *et al.*, 2005).

SNPs localizados nas regiões não traduzidas (*untranslated region*, UTR) das extremidades 5' e 3' do gene *CYP3A5* também foram descritos (XIE; WOOD; KIM, 2004). Foi observado que o SNP *CYP3A5\*1D*, localizado na 3'UTR, está em desequilíbrio de ligação com o alelo *CYP3A5\*3C* (HUSTERT; HABERL; BURK, 2001; LEE *et al.*, 2003), e as duas alterações presentes no mesmo indivíduo formam o alelo *CYP3A5\*3A* (KUEHL *et al.*, 2001). Polimorfismos nas UTRs tendem a causar menor estabilidade do RNAm, afetando a taxa de expressão e a atividade catalítica da enzima (XIE; WOOD; KIM, 2004). Na **tabela 1**, são apresentados os principais SNPs descritos anteriormente e seus respectivos genótipos.

Tabela 1. Descrição dos SNPs de *CYP3A5* e os respectivos genótipos

SNP	Genótipos possíveis		
<i>CYP3A5*3C</i> A6986G	*1A/*1A (AA)	*1A/*3C (AG)	*3C/*3C (GG)
<i>CYP3A5*6</i> G14690A	*1A/*1A (GG)	*1A/*6 (GA)	*6/*6 (AA)
<i>CYP3A5*1D</i> C31611T	*1A/*1A (CC)	*1A/*1D (CT)	*1D/*1D (TT)

Fonte: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Número de Acesso GenBank: AC 005020

Considerando que a atorvastatina é metabolizada pelas *CYP3A4* e *CYP3A5* e que algumas variantes do *CYP3A5* foram associadas com a

resposta a vastatinas, este estudo tem por objetivo avaliar a influência de polimorfismos do *CYP3A5* sobre a expressão do RNAm em células mononucleares de sangue periférico e sobre a resposta farmacológica a atorvastatina em indivíduos hipercolesterolêmicos.

## 2 OBJETIVOS

- 2.1 Estudar as frequências alélicas e genóticas de variantes do *CYP3A5* em indivíduos hipercolesterolêmicos.
- 2.2 Avaliar a relação entre polimorfismos do *CYP3A5* e a variabilidade na resposta farmacológica a atorvastatina.
- 2.3 Avaliar o efeito da atorvastatina sobre a expressão de RNAm do *CYP3A5* em células mononucleares de sangue periférico.
- 2.4 Analisar a relação de polimorfismos do *CYP3A5* com a variabilidade da expressão de RNAm em células mononucleares de sangue periférico, antes e após o tratamento com atorvastatina.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Casuística e protocolo terapêutico

Foram selecionados para o estudo 458 indivíduos, de ambos os sexos, com idades entre 29 e 81 anos. Desses indivíduos, 210 são hipercolesterolêmicos (HC) e 248 são normolipidêmicos (NL).

Os indivíduos foram selecionados na Divisão de Clínica Médica e na Unidade Básica de Assistência à Saúde do Hospital Universitário da USP (132 HC, 248 NL) e na Seção de Lipoproteínas do Instituto Dante Pazzanezze de Cardiologia (78 HC), durante consultas de rotina. Foram informados sobre o protocolo do estudo que foi previamente aprovado pelos comitês de ética das instituições envolvidas (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Hospital Universitário da USP e Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (**Anexo C**) e somente participaram os que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nesse momento, foram obtidos os dados de sexo, idade, peso, altura, menopausa, tabagismo, hipertensão, história familiar de DAC e medicações em uso.

Com base nas recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2000), indivíduos com índice de massa corpórea (IMC)  $\geq 30\text{kg/m}^2$  foram classificados como obesos, e os que apresentaram pressão sistólica/diastólica acima de 140/90 mmHg ou estavam sob tratamento anti-hipertensivo foram considerados hipertensos (CHALMERS *et al.*, 1999). É importante ressaltar que para a realização de todas as análises estatísticas os



indivíduos pardos foram incluídos no grupo de indivíduos negros. A etnia do paciente foi determinada durante a entrevista, por ele próprio.

Os critérios de inclusão dos indivíduos HC foram: idade superior a 40 anos, hipercolesterolemia primária segundo os critérios do 3º Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias (RESUMO DAS III DIRETRIZES BRASILEIRAS..., 2001), sem uso concomitante de hipolipemiantes. Para os indivíduos NL, os critérios de inclusão foram: idade superior a 40 anos e perfil lipídico normal.

Foram excluídos do estudo, tanto no grupo de indivíduos HC como NL, indivíduos com hipotireoidismo, diabetes melito, doenças hepática e renal graves, mulheres grávidas ou em uso de contraceptivos orais, após os exames de triagem. Os valores de referência dos parâmetros bioquímicos utilizados como critério de seleção estão representados na **Tabela 2**. Com base nesses critérios, foram excluídos 71 HC e 149 NL, sendo efetivamente incluídos 139 HC e 99 NL que completaram este estudo.

Os indivíduos HC foram orientados a fazer uso de dieta com baixo teor de colesterol e gordura saturada por quatro semanas (CHAHOU; AUDE; MEHTA, 2004). Após esse período, foi feita avaliação laboratorial e os indivíduos com concentrações séricas de LDL-c superiores a 160 mg/dL foram tratados com atorvastatina 10 mg (dose oral única diária) por quatro semanas. A dose de 10 mg é a dose mínima comercializada do fármaco e foi adotada para todos os pacientes. A resposta a atorvastatina foi avaliada pela determinação do perfil lipídico sérico, antes e após o tratamento.

Tabela 2. Valores de referência de parâmetros bioquímicos para inclusão de indivíduos no protocolo de estudo

<b>Parâmetros bioquímicos no soro</b>	<b>Normolipidêmicos (99)</b>	<b>Hipercolesterolêmicos (139)</b>
Glicemia de jejum	Até 120 mg/dL	Até 120 mg/dL
Alanina aminotransferase (ALT)	Homem: 9 a 43 U/L Mulher: 9 a 36 U/L	Homem: 9 a 43 U/L Mulher: 9 a 36 U/L
Aspartato aminotransferase (AST)	Homem: 10 a 35 U/L Mulher: 10 a 31 U/L	Homem: 10 a 35 U/L Mulher: 10 a 31 U/L
Creatina quinase (CK)	Homem: 38 a 174 U/L Mulher: 26 a 140 U/L	Homem: 38 a 174 U/L Mulher: 26 a 140 U/L
TSH	0,5 a 4,7 µU/mL	0,5 a 4,7 µU/mL
T4 livre	0,71 a 1,85 ng/dL	0,71 a 1,85 ng/dL
Uréia	10 a 50 mg/dL	10 a 50 mg/dL
Creatinina	0,4 a 1,3 mg/dL	0,4 a 1,3 mg/dL
Perfil lipídico		
Colesterol total	Até 200 mg/dL	Acima de 240 mg/dL
Triglicérides	Até 150 mg/dL	Até 350 mg/dL
HDL-c	Superior a 40mg/dL	Superior a 40mg/dL
LDL-c	Até 130 mg/dL*	Acima de 160 mg/dL

Número de indivíduos entre parêntesis.

(\*) O valor de LDL-c alvo para cada indivíduo é calculado a partir do número de fatores de risco de DAC que apresenta. Pacientes com alto risco tem LDL-c alvo inferior a 100 mg/dL, pacientes com médio risco tem LDL-c alvo inferior a 130mg/dL e pacientes com baixo risco tem LDL-c alvo inferior a 160mg/dL (NCEP, ATP III, 2005).

### 3.2 Amostras biológicas

Foram coletadas amostras de sangue, após jejum de 12-14 horas, no período basal e após o tratamento com atorvastatina. Foram obtidos 15 mL de sangue em tubo com EDTA (1 mg/mL de sangue) para extração de DNA e RNA e 5 mL em tubo sem anticoagulante para a obtenção de soro. Foram determinadas concentrações séricas de colesterol total e frações, triglicérides, apolipoproteína AI (apo AI), apolipoproteína B (apo B), TSH, T4 livre, glicose, alanina transferase (ALT), e creatina quinase (CK).

As concentrações séricas de colesterol total e frações, triglicérides, apo AI e apo B foram utilizadas a fim de avaliar a resposta terapêutica a atorvastatina. A avaliação de TSH e T4 livre, realizada somente na primeira

avaliação laboratorial, foi utilizada para exclusão de pacientes com hipo ou hipertireoidismo. A glicemia foi determinada para excluir os indivíduos com diabetes melito. As atividades das enzimas ALT (biomarcador de lesão hepática) e CK (biomarcador de lesão muscular) foram utilizadas para monitorar o aparecimento de hepatotoxicidade e miotoxicidade, as duas principais reações adversas do tratamento com atorvastatina.

### **3.3 Linhagens celulares e condições de cultivo**

Neste estudo, foram utilizadas as linhagens de células imortalizadas HepG2 e Caco2 que podem ser mantidas em cultura indefinidamente. A linhagem derivada de hepatoma humano HepG2 e a linhagem celular derivada de enterócitos humanos Caco2 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro, UFRJ. A linhagem HepG2 foi utilizada durante a otimização do estudo de expressão de RNAm do *CYP3A5*, e a linhagem Caco2 foi utilizada como calibrador nos estudos de expressão gênica por PCR em Tempo Real. Essas linhagens foram utilizadas porque a expressão de *CYP3A5* é mais abundante em hepatócitos e enterócitos que em células mononucleares de sangue periférico (CMSP) (KUEHL *et al.*; 2001).

Para garantir a homogeneidade das características morfofisiológicas, as células HepG2 e Caco2 foram mantidas em cultura por períodos nunca superiores a três meses conforme método padrão para cultivo celular (PERES; CURI, 2005).

As células foram cultivadas em meio de DMEM (pH 7,4) com 10% de soro fetal bovino (SFB), a 37<sup>0</sup>C, em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo foi suplementado com L-glutamina 2 mmoles/L,

bicarbonato de sódio 44 mmoles/L, penicilina 10.000 U/L e estreptomicina 10 mg/L. O meio foi trocado duas vezes por semana e as células foram tripsinizadas (solução de tripsina 0,2% e versene 0,02%) e subcultivadas entre as concentrações de 1 a  $10 \times 10^5$  células por mL, uma vez por semana.

### **3.4 Determinações dos parâmetros bioquímicos**

As concentrações séricas de colesterol total e triglicérides foram determinadas por métodos enzimático-colorimétricos (SIEDEL *et al.*, 1983; FOSSATI; PRENCIPE, 1982), utilizando conjuntos diagnósticos da Bayer Healthcare (Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil), em analisador automático Advia 1650<sup>®</sup> (Bayer Healthcare, divisão da Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil). O HDL-c sérico foi determinado por método enzimático (NAUCK; MARZ; WIELAND, 1998) usando o conjunto diagnóstico da DiaSys<sup>®</sup> (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Alemanha). As concentrações séricas de colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-c) e de LDL-c foram calculadas segundo a fórmula de Friedewald e colaboradores (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972).

As atividades de ALT e CK e a concentração de glicose foram determinadas por métodos cinéticos no UV e enzimático-colorimétrico, respectivamente (BERGMEYER; SCHEIBE; WAHLFELD, 1978; HORDER; ELSER; GERHARDT, 1991; TRINDER, 1969), em analisador automático Advia 1650<sup>®</sup> (Bayer Healthcare, divisão da Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil).

As determinações de T4 livre e TSH foram realizadas por imunoenensaio competitivo e método imunométrico, respectivamente (HAY *et al.*, 1991; WITERSPOON *et al.*, 1988) utilizando conjuntos diagnósticos e analisador

automático Immulite 2000<sup>®</sup> (DPC – Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, EUA).

Todas as determinações descritas foram realizadas no Serviço de Laboratório Clínico do HU-USP ou no Laboratório de Análises Clínicas do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.

O Serviço de Laboratório Clínico do HU/USP é membro participante do Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ) da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas. Além disso, em sua rotina faz uso de soros controle com concentrações dentro e fora da faixa de referência dos analitos (*Assayed Chemistry 1* e *Assayed Chemistry 2*) disponibilizados pela Bayer Healthcare (divisão da Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil).

Amostras de soro foram enviadas ao Laboratório Álvaro, em Cascavel, PR, para determinação das concentrações de Apo AI e Apo B por métodos nefelométricos (RIFAI *et al.*, 1986) utilizando conjuntos diagnósticos da Dade Behring (Dade Behring Ltda, São Paulo, SP, Brasil), em analisador automático BN II<sup>®</sup> (Dade Behring Ltda, São Paulo, SP, Brasil).

### **3.5 Extração e análise de DNA genômico**

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico, após lise dos eritrócitos, utilizando o método de precipitação salina desenvolvido em nosso laboratório (SALAZAR *et al.*, 1998). Resumidamente, as amostras de sangue, colhidas com EDTA, foram lisadas com tampão Tris-1 [Tris-HCl a 10mM (pH 8,0), KCl a 10mM; MgCl<sub>2</sub> a 10mM e EDTA a 2mM] adicionado de Triton X-100 a 2,5%. Posteriormente, os núcleos celulares foram lisados com tampão Tris-2 (Tris-HCl a 10mM, pH 8,0, KCl a 10mM, MgCl<sub>2</sub> a 10mM, EDTA a

2mM pH 8,0 e NaCl 0,4M) adicionado de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%. A seguir, foi adicionado NaCl 5 M e a suspensão foi centrifugada durante 5 min a 12000 rpm. Ao sobrenadante, foi adicionado 1 mL de etanol absoluto e o DNA precipitado foi centrifugado durante 5 min a 12000 rpm, lavado com etanol 70% e e ressuspendido em tampão TE pH 8,0 [Tris-HCl a 10mM e EDTA 1mM (pH 8,0)]. As amostras de DNA form armazenadas a -20° C.

A integridade das amostras de DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% utilizando tampão TBE 0,5X [Tris-HCl a 45mM, ácido bórico a 45 mM e EDTA a 1mM (pH 8,0)] (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A separação eletroforética foi realizada a 100V, 60mA, por 30 min, em cuba de eletroforese horizontal (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA) e fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP). Como referência foi utilizado um marcador de tamanho molecular de DNA de 1000bp (1Kb) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). As bandas foram visualizadas sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/mL) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem Chemilmager™ 4400 (v5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA).

A quantificação de DNA foi realizada por espectrofotometria a 260nm utilizando espectrofotômetro Beckman modelo DU 640 (Beckman, Fullerton, CA, EUA) e a pureza do DNA determinada pela relação  $A_{260nm}/A_{280nm}$  (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

### 3.6 Ensaios de PCR

Três SNPs do *CYP3A5* foram estudados: A6986G (*CYP3A5\*3C*, íntron 3), G14690A (*CYP3A5\*6*, éxon 7) e C31611T (*CYP3A5\*1D*, 3'UTR). Essas regiões polimórficas foram amplificadas por reação em cadeia pela polimerase (PCR) e os produtos gerados foram utilizados em ensaios de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) e sequenciamento de DNA.

Para os ensaios de PCR do SNP *CYP3A5\*3C* foram utilizados os iniciadores previamente descritos (BALRAM *et al.*, 2003; FUKUEN; FUKUDA; MAUNE, 2002). Para o SNP *CYP3A5\*6*, os iniciadores de Balram *et al.* (2003) e Fukuen, Fukuda e Maune (2002) foram modificados, adicionando-se 2 bases na extremidade 5' do iniciador antisense a fim de equiparar as temperaturas de dissociação ( $T_m$ ).

Para as reações de sequenciamento dos SNPs (*CYP3A5\*3C*, \*6 e \*1D), foram desenhados outros iniciadores com auxílio do programa Primer Premier® v. 5.0 (Premier Biosoft International, EUA). Para essa finalidade, utilizou-se a seqüência disponível (número de acesso AC 005020) no Banco de genes (*GenBank*) do *National Institute of Health* (NIH) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?dn=nucleotide](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?dn=nucleotide)). Na **Tabela 3**, estão descritos os iniciadores utilizados nos ensaios de PCR-RFLP e sequenciamento de DNA.

Tabela 3. Iniciadores utilizados nas reações de PCR

Polimorfismos	Métodos	Sequências dos Iniciadores	Tamanho do fragmento
A6986G ( <i>CYP3A5*3C</i> )	PCR-RFLP	5' CTTTAAAGAGCTCTTTTGTCTC*TCA3' 5' CCAGGAAGCCAGACTTTGAT3'	200bp
A6986G ( <i>CYP3A5*3C</i> )	Sequencia- mento	5' TTGTGAGCACTTGATGATTTACC3' 5' CCAGGAAGCCAGACTTTGAT3'	370bp
G14690A ( <i>CYP3A5*6</i> )	PCR-RFLP	5' GTGGGTTTCTTGCTGCATGT3' 5' <b>GC**</b> GAAACCAAATTTTAGGAACT3'	204bp
G14690A ( <i>CYP3A5*6</i> )	Sequencia- mento	5' GTGGGTTTCTTGCTGCATGT3' 5' GGCTCTAGATTGACAAAAACATTTT3'	403bp
C31611T ( <i>CYP3A5*1D</i> )	Sequencia- mento	5' TGCTTTTACTATCCAGTATTTACCC3' 5' GCCCATCTTTATTTCAAGGTTT3'	378bp

Fonte: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Número de Acesso GenBank: AC 005020

(\*) Base degenerada do primer.

(\*\*) Região não complementar à sequência (cauda).

Os ensaios de PCR foram otimizados a partir de um protocolo básico. Inicialmente, mantiveram-se constantes as concentrações dos componentes da reação e o número de ciclos (35 ciclos), e variou-se a temperatura de hibridização dos iniciadores.

Na composição de reagentes de PCR, foram utilizados: 100 ng de DNA genômico, iniciadores 10  $\mu$ moles/L (Integrated DNA Technologies, Coralville, EUA), deoxinucleotídeos (dNTPs) 10 mmoles/L (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP), DNA polimerase 1 U e tampão de PCR [Tris-HCl a 75mM (pH 9,0), MgCl<sub>2</sub> a 2mM, KCl a 50mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 20mM] (Biotools, Madrid, Espanha), em volume final de 50 $\mu$ L completado com água MilliQ autoclavada.

Os ensaios de PCR foram realizados utilizando-se termociclador PTC-200 (M&J Research, Watertown, EUA), sob as seguintes condições: etapa



inicial a 98°C por 3 min (desnaturação inicial); amplificação por 35 ciclos a 95°C por 1 min (desnaturação), 52°C a 60°C por 1 min (hibridização dos iniciadores) e 72°C por 1 min (extensão); etapa final a 72°C por 10 min (extensão final).

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5X (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) em cuba de eletroforese horizontal (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA) (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA). A separação eletroforética foi realizada por 30 min a 100 V e 60 mA, utilizando-se a fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP). Como referência foram utilizados marcadores de tamanho molecular de DNA de 100bp (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) e também o marcador *PCR Marker* (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA). As bandas foram visualizadas sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/mL) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem Chemilmager™ 4400 (v5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA).

No segundo teste de PCR realizado para o SNP *CYP3A5\*3C*, foi realizado ensaio com temperaturas de hibridização dos iniciadores entre 56 e 60°C. Conforme se observa na **Figura 3**, o sinal dos produtos de PCR foi maior nas temperaturas de hibridização de 56°C e 58°C. A temperatura de 58°C foi escolhida para evitar a formação de produtos inespecíficos ao do SNP *CYP3A5\*3C*.

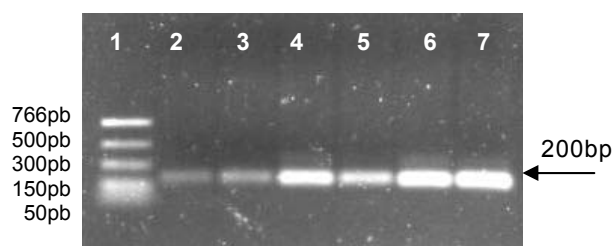


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose a 1% de produtos de PCR do SNP *CYP3A5\*3C* gerados com 35 ciclos. Linha 1: marcador de tamanho molecular de DNA *PCR Marker*. Linhas 2 e 3: amostra-teste de DNA amplificada em duplicata com temperatura de hibridização de 60°C. Linhas 4 e 5: amostra-teste de DNA amplificada em duplicata com temperatura de hibridização de 58°C. Linhas 6 e 7: amostra-teste de DNA amplificada em duplicata com temperatura de hibridização de 56°C.

Os produtos de PCR do primeiro teste para o SNP *CYP3A5\*6*, gerados em temperaturas de hibridização de 52 a 60°C, com 35 ciclos de amplificação, tinham todos a mesma intensidade (abundante). Portanto, não houve diferença significativa na eficiência da reação entre as diferentes temperaturas testadas. Outro teste foi realizado a fim de diminuir a intensidade do sinal reduzindo-se o número de ciclos de amplificação, de 35 para 30. Os resultados do segundo teste estão apresentados na **Figura 4**.

As temperaturas mais elevadas são as preferidas para evitar a formação de produtos inespecíficos, visto que o aumento da temperatura de hibridização reduz a estabilidade do *duplex* de DNA formado entre os iniciadores e as fitas de DNA genômico molde. Sendo assim, em altas temperaturas, a ligação dos iniciadores a seqüências parcialmente complementares é desfavorecida, bem como a formação de produtos secundários (DIEFFENBACH; LOWE; DVEKSLER, 1995). Considerando este argumento, a temperatura de hibridização de 60°C foi a escolhida para o ensaio de PCR do SNP *CYP3A5\*6*.

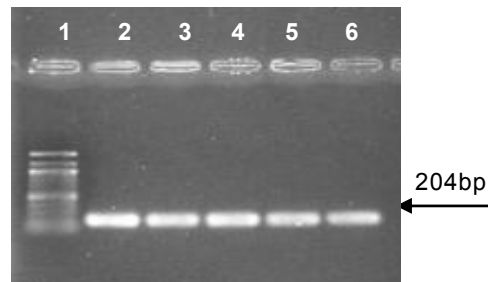


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR do SNP *CYP3A5\*6*, gerados com 30 ciclos. Linha 1: marcador de tamanho molecular de DNA de 100bp. Linhas 2 a 6: amostras-teste de DNA amplificadas a temperatura de hibridização de 60°C

Para o SNP *CYP3A5\*1D*, no primeiro teste de PCR, as temperaturas de hibridização variaram de 57°C a 60°C, em 35 ciclos de amplificação. Os resultados são apresentados na **Figura 5**. Pode-se observar que o sinal dos produtos de PCR foi abundante em todas as temperaturas de hibridização testadas. A temperatura de 59°C foi escolhida para evitar a formação de produtos inespecíficos.

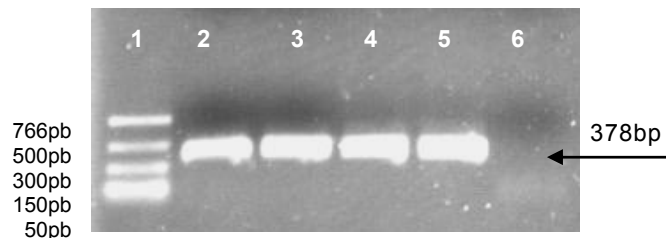


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 1% de produtos de PCR do SNP *CYP3A5\*1D*, gerados com 35 ciclos. Linha 1: marcador de tamanho molecular de DNA *PCR Marker*. Linhas 2 e 3: temperaturas de hibridização de 59°C. Linhas 4 e 5: temperaturas de hibridização de 60°C. Linha 6: reação de PCR sem DNA (controle de reagentes).

### 3.7 Ensaios de RFLP

Os alelos dos SNPs *CYP3A5\*3C* e *CYP3A5\*6* foram identificados por RFLP, utilizando 5 U da enzima de restrição *DdeI* (Promega Corporation, Madison, WI, EUA). Os ensaios de digestão enzimática foram realizados por 4

h, em banho de água (FANEM Ltda., São Paulo, SP, Brasil) a 37°C, em volume final de reação de 20 µL.

Os produtos de restrição foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, em TBE 1X [(Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM (pH 8,0)] (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), utilizando o sistema de eletroforese vertical Mini v16-2 (Biometra, Göttingen, Alemanha). A eletroforese foi realizada com a fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP) a 120V, 50mA durante 2 horas e 30 minutos. Marcadores de tamanho molecular de 50 bp e de 10 bp (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) foram usados para monitorar o tamanho dos fragmentos gerados pela restrição enzimática.

O gel foi posteriormente corado com nitrato de prata (Merck S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e documentado por meio de sistema de digitalização de imagem (HP Scan Jet 3400C, Hewlett-Packard<sup>R</sup>, Hong Kong, China) ou corado com SYBR Gold<sup>®</sup> (Molecular Probes, Invitrogen Detection Technologies, Eugene, Oregon, EUA) e fotodocumentado em sistema de captura de imagem ChemImager<sup>™</sup> 4400 (v5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA).

A digestão enzimática do produto de PCR do SNP *CYP3A5\*3C* com *DdeI* gera fragmentos com tamanhos de 129, 107, 71 e 22 bp (**Figura 6**). O fragmento de 71 bp é gerado pela presença do sítio constitutivo e visualizado em todas as amostras.

Para o SNP *CYP3A5\*6*, a digestão enzimática com a mesma enzima origina fragmentos de 130, 103, 74 e 27 bp. O fragmento de 74 bp é gerado pelo sítio constitutivo e é visualizado em todas as amostras (**Figura 7**).

Na **Tabela 4**, são apresentados os tamanhos dos fragmentos dos produtos de restrição para os SNPs *CYP3A5\*3C* e *CYP3A5\*6*.

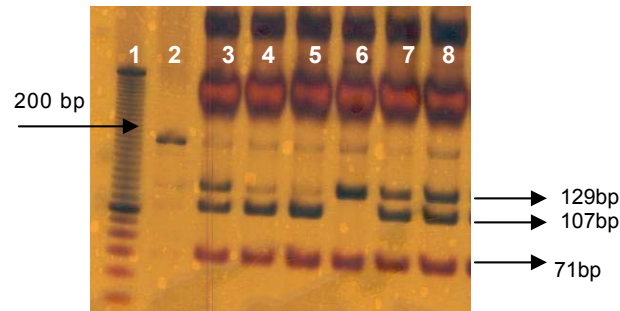


Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com prata dos produtos de restrição do SNP *CYP3A5\*3C* do gene *CYP3A5*. Linha 1: marcador de tamanho molecular de DNA de 10 bp. Linha 2: produto de PCR. Linhas 3, 7 e 8: genótipo GA. Linhas 4 e 5: genótipo GG. Linha 6: genótipo AA

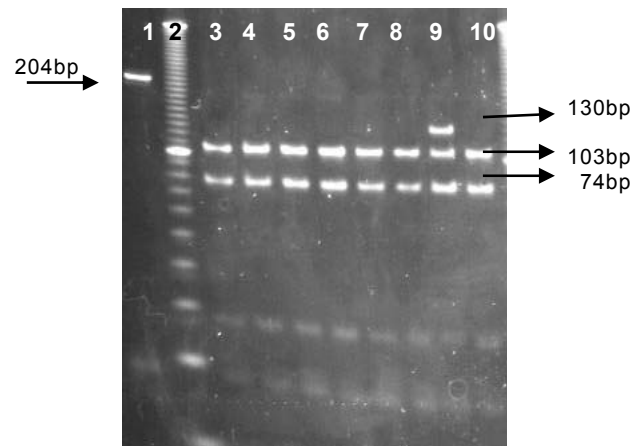


Figura 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com SYBR Gold® dos produtos de restrição do SNP *CYP3A5\*6* do gene *CYP3A5*. Linha 1: produto de PCR. Linha 2: marcador de tamanho molecular de DNA de 10 bp. Linhas 3 a 8 e 10: genótipo GG. Linha 9: genótipo AG.

Tabela 4. Fragmentos dos produtos de restrição dos SNPs *CYP3A5\*3C* e *CYP3A5\*6*

<b>A6986G CYP3A5*3C</b>	<b>*1A/*1A (AA)</b>	<b>*1A/*3C (AG)</b>	<b>*3C/*3C (GG)</b>	<b>Tamanho do produto de PCR íntegro</b>
Tamanho dos produtos de restrição	129bp 71bp	129bp 107bp 71bp 22bp	107bp 71bp 22bp	200bp
<b>G14690A CYP3A5*6</b>	<b>*6/*6 (AA)</b>	<b>*1A/*6 (AG)</b>	<b>*1A/*1A (GG)</b>	<b>Tamanho do produto de PCR íntegro</b>
Tamanho dos produtos de restrição	130bp 74bp	130bp 103bp 74bp 27bp	103bp 74bp 27bp	204bp

### 3.8 Ensaio de sequenciamento de DNA

Os resultados de genotipagem por PCR-RFLP para os SNPs *CYP3A5\*3C* e *CYP3A5\*6* foram confirmados por sequenciamento de DNA.

Foram feitas várias tentativas de estratégias para a detecção do SNP *CYP3A5\*1D* por RFLP, entretanto, nenhuma enzima de restrição reconhece o sítio polimórfico. Por essa razão, o SNP *CYP3A5\*1D* foi identificado diretamente por sequenciamento de DNA.

Na composição de reagentes de PCR, foram utilizados: 100 ng de DNA genômico, iniciadores 10  $\mu$ moles/L (Integrated DNA Technologies, Coralville, EUA), deoxinucleotídeos (dNTPs) 10 mmoles/L (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP), DNA polimerase 1 U e tampão de PCR [Tris-HCl a 75mM (pH 9,0), MgCl<sub>2</sub> a 2mM, KCl a 50mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 20mM] (Biotools, Madrid, Espanha), em volume final de 50 $\mu$ L completado com água MilliQ autoclavada.

Para o sequenciamento do SNP *CYP3A5\*3C*, o ensaio de PCR foi realizado nas seguintes condições: etapa inicial a 98°C por 3 min; seguida da etapa de amplificação com 35 ciclos: 95°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min; e etapa final a 72°C por 10 min.

Para o sequenciamento dos SNPs *CYP3A5\*6* e *CYP3A5\*1D*, os produtos de PCR foram gerados nas mesmas condições descritas anteriormente, utilizando-se a temperatura de hibridização de 63°C e 59°C, respectivamente, durante a etapa de hibridização dos iniciadores.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se colunas de purificação por tamanho molecular (*Microspin S300HR Columns*, GE

Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP), segundo as instruções do fabricante.

Os produtos purificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, em cuba de eletroforese horizontal (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA). A separação eletroforética foi realizada por 30 min a 100 V e 60 mA, utilizando-se a fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP).

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

A concentração dos produtos de PCR foi determinada comparando-se as intensidades com as do marcador de massa molecular de DNA (*Low Mass DNA Ladder*, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA).

O ensaio de sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano (Instituto de Biociências, USP, São Paulo), a partir do produto de PCR purificado produzido em nosso laboratório. Para essa finalidade, foram utilizados aproximadamente 40 ng de produto de PCR purificado, 3 pmoles de iniciador, 4,0 µL de *DYEnamic ET Terminator Reagent Premix* (GE Healthcare, antiga Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP) e água deionizada para completar o volume de 10 µL.

Os produtos de sequenciamento foram gerados no termociclador PTC 200™ (MJ Research, Watertown, MA, EUA) utilizando-se o seguinte protocolo: 30 ciclos de incubação a 95°C por 20 seg, 60°C (para CYP3A5\*3C), 60°C (para

CYP3A5\*6) ou 59°C (para CYP3A5\*1D) por 15 seg seguidos de 60°C por 1 min.

Os produtos de sequenciamento foram purificados por precipitação utilizando acetato de amônio 7,5 M e etanol absoluto. Esses produtos purificados foram ressuspensos em solução de aplicação (MegaBACE *loading solution* – formamida 70%, EDTA 1mM) e foram injetados no sistema de eletroforese capilar MegaBACE 1000 (GE Healthcare, antiga Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP). Para a injeção das amostras foram aplicados 2 kV durante 60 seg e, a seguir, a eletroforese foi realizada a 8 kV por 120 min. A análise do dado cru foi feita pelo software Sequence Analyser do MegaBACE utilizando o BaseCaller Cimarron 3.12. Num segundo momento, as seqüências foram analisadas no nosso laboratório utilizando-se o programa BioEdit Sequence Alignment Editor v. 5.0.9, disponível na página da Internet [www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) (2004).

Os eletroferogramas das reações de sequenciamento dos SNPs CYP3A5\*3C, CYP3A5\*6 e CYP3A5\*1D estão ilustrados nas **Figuras 8, 9 e 10**, respectivamente. Como pode ser observado na **Figura 9**, o produto de sequenciamento que contém o nucleotídeo variante (14690G, \*6) do SNP CYP3A5\*6 apresentou um sinal muito fraco, tanto para o alelo comum (**Figura 9A**) como para o alelo raro (**Figura 9B**), em todas as amostras, na reação de sequenciamento da fita senso. Esta reação foi repetida e o mesmo fenômeno foi observado na repetição. No entanto, a reação de sequenciamento da fita antisense funcionou perfeitamente e foi possível avaliar a presença do polimorfismo em heterozigose com segurança.



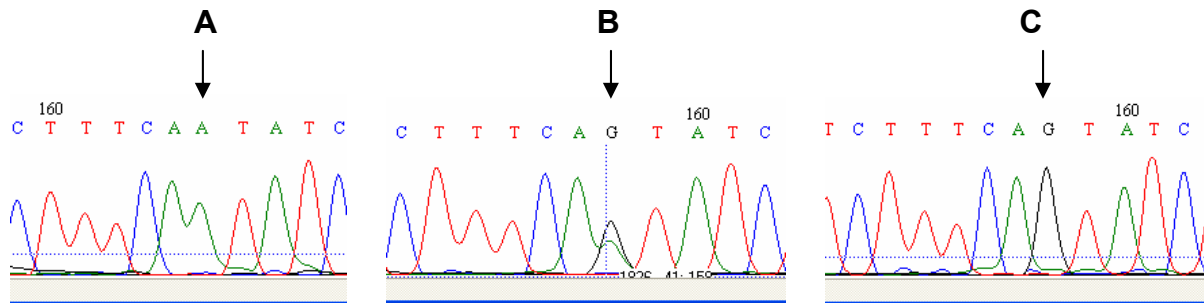


Figura 8. Eletroferogramas de sequenciamento de DNA para o SNP *CYP3A5\*3C*. (A). Genótipo AA ou \*1A/\*1A (B). Genótipo AG ou \*1A/\*3C; (C). Genótipo GG ou \*3C/\*3C

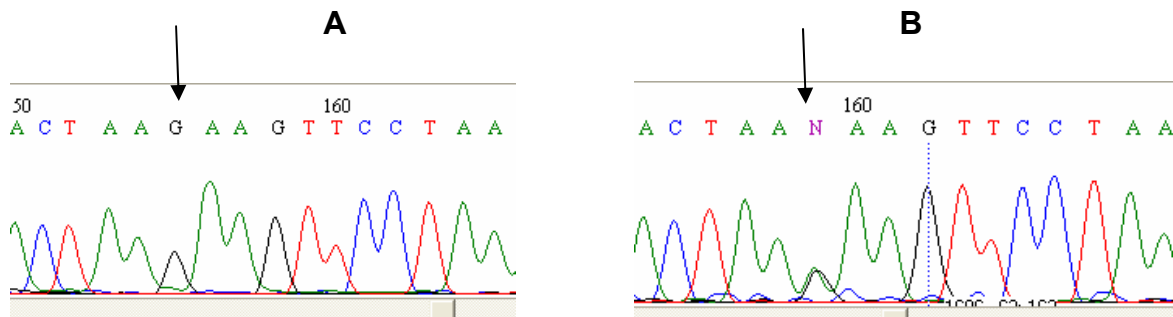


Figura 9. Eletroferogramas de sequenciamento de DNA para o SNP *CYP3A5\*6*. (A). Genótipo GG ou \*1A/\*1A (B). Genótipo AG ou \*1A/\*6

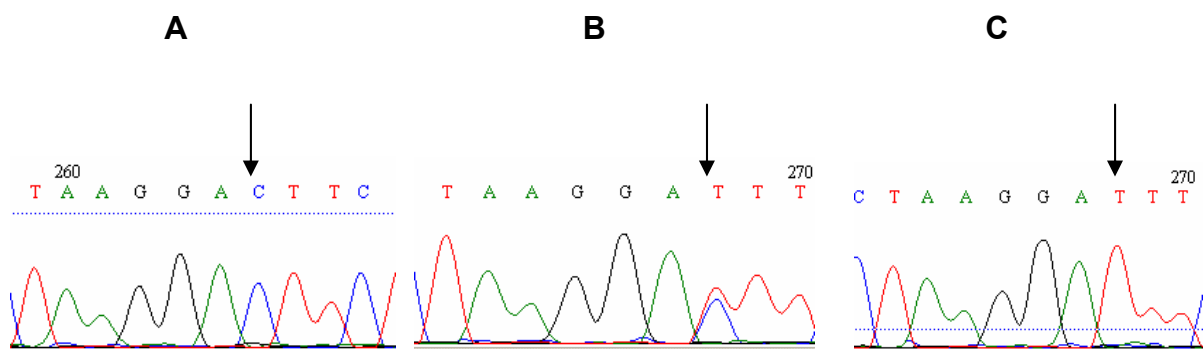


Figura 10. Eletroferogramas de sequenciamento de DNA para o SNP. (A). Genótipo CC ou \*1A/\*1A; (B). Genótipo CT ou \*1A/\*1D; (C). Genótipo TT ou \*1D/\*1D

### 3.9 Extração e análise do RNA total

O RNA total foi extraído de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) que foram previamente separadas por gradiente descontínuo de Ficoll-

Hypaque (Sigma Aldrich, MO, EUA) densidade específica de 1,070 g/mL, a temperatura ambiente (SALAZAR *et al.*, 2000b). Resumidamente, 5 mL de sangue colhido em EDTA foram diluídos 1:2 (v/v) com tampão Tris-EDTA (Tris-HCl 10mM, pH 7,4 e EDTA 10mM, pH 8,0). A seguir, esse volume foi cuidadosamente pipetado sobre 3,5 mL de Ficoll-Hypaque (Sigma Aldrich, MO, EUA) contido em tubo cônico de 15 mL que foi centrifugado a 800 g por 30 min a temperatura ambiente. As células mononucleares foram recolhidas, lavadas 3 vezes com o dobro do seu volume com tampão Tris-EDTA (Tris-HCl 10mM, pH 7,4 e EDTA 10mM, pH 8,0), contadas em câmara de Neubauer e imediatamente submetidas à extração do RNA total.

Entre 1 (um) e  $5 \times 10^6$  de CMSP e células das linhagens HepG2 e Caco2 foram lisadas com 1 mL de TRIZOL<sup>R</sup> (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com procedimento previamente padronizado em nosso laboratório (MASSIRER *et al.*, 2004). Resumidamente, 200  $\mu$ L de clorofórmio foram adicionados aos lisados e os extratos foram homogeneizados e centrifugados 12.000 x g por 15 min, a 4°C. O RNA total presente na fase aquosa foi precipitado com isopropanol gelado, centrifugado a 10.000 x g, por 10 min, a 4°C e lavado com etanol a 75% (v/v). A seguir, o RNA foi seco à temperatura ambiente, ressuspendido em 50  $\mu$ L água esterilizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma Aldrich, MO, EUA) e armazenado a -70°C para posterior análise.

O rendimento do RNA total foi avaliado por espectrofotometria no ultravioleta (UV) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) utilizando-se o espectrofotômetro Beckman modelo DU 640 (Beckman, Fullerton, CA, EUA) e

o grau de pureza do RNA determinado pela relação  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão MOPS [MOPS 20 mM (pH 7,0), acetato de sódio 8 mM e EDTA 1mM (pH 8,0)] contendo formaldeído a 2,2 M (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Como referência, foi utilizado um marcador de tamanho molecular de RNA (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP). A eletroforese foi realizada a 32 V por 40 min utilizando cuba de eletroforese horizontal (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA) (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA) e fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP).

As bandas foram visualizadas sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/mL) e fotodocumentadas em sistema de captura e digitalização de imagem utilizando-se o programa Chemilmager™ 4400 (v 5.5) (AlphaInnotech, San Leandro/CA, EUA).

### **3.10 Análise da expressão de RNAm por RT-PCR *duplex***

A expressão de RNAm do *CYP3A5* em HepG2 e em CMSP foi medida por transcrição reversa (RT) seguida de PCR. Em paralelo, foi medida a expressão de RNAm do gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPD*) como o controle endógeno. A análise conjunta do RNAm do *CYP3A5* e *GAPD* foi realizada no formato de PCR-*duplex*.

O cDNA foi gerado a partir de 2 µg de RNA, utilizando-se 200 ng de iniciadores aleatórios (*random primers*) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA,

EUA), DTT 20 mM (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), 10mmoles/L dNTPs (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP), 200U de transcriptase reversa (RT) (SuperScript™ II RT RNase H<sup>-</sup>) e tampão de RT [Tris-HCl 250 mM (pH 8,3), KCl 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 15mM] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). O ensaio de RT foi realizado em termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., Waltham, MA, EUA), com as seguintes etapas: 25°C por 10 min, 42°C por 50 min e 70°C por 15 min. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a realização da PCR.

Os iniciadores usados para amplificar o cDNA da *CYP3A5* por PCR-*duplex* foram desenhados utilizando-se o programa Primer Premier v 5.0 (Premier Biosoft International, EUA) com base nas seqüências gênicas disponíveis no banco de genes do NIH ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e estão descritos na **Tabela 5**.

As seqüências do cDNA dos genes da *CYP3A4* e da *CYP3A5* tem aproximadamente 85% de similaridade, e por este motivo as duas seqüências foram comparadas através da ferramenta Blast2, disponibilizada também pelo Banco de genes do NIH ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). Os iniciadores foram desenhados em uma região com baixa similaridade entre as duas seqüências (7 bases não complementares de cada iniciador de 22 bases, o que equivale a 32%), a fim de avaliar a expressão unicamente da *CYP3A5*. O cDNA do gene *GAPD* (controle endógeno) foi amplificado utilizando os iniciadores previamente descritos (TOKUNAGA *et al.*, 1987) (**Tabela 5**).

Tabela 5. Iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR duplex e PCR em Tempo Real

Genes	RT-PCR	Iniciadores	Fragmento
<i>CYP3A5</i>	<i>duplex</i>	5' TCAATGGTGGTGATTCCAACCTT3' 5' GTTGAAGAAGTCCTTGCGTGTC3'	277 bp
<i>GAPD</i>	<i>duplex</i>	5' ACCACAGTCCATGCCATCAC3' 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA3'	452 bp
<i>CYP3A5</i>	<i>Tempo real</i>	5' CTATCGTCAGGGTCTCTGGAAATT3' 5'ACGTTCCCCACATTTTCCATA3' 5'FAM ACACAGAGTGCTATAAAA MGB3'	68 bp
<i>GAPD</i>	<i>Tempo Real</i>	Catálogo 4326317E (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) Fluoróforos: 5'VIC e MGB3'	Dado não informado pelo fabricante

Nos ensaios de PCR-*duplex*, foram utilizados 2  $\mu$ L de cDNA, iniciadores para *CYP3A5* a 20  $\mu$ moles/L, iniciadores para o *GAPD* a 5  $\mu$ moles/L (Integrated DNA Technologies, Coralville, EUA), dNTPs 10 mmoles/L (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP), DNA polimerase 1 U e tampão de PCR (Biotools, Madrid, Espanha).

Os ensaios foram realizados no termociclador PTC-200 (MJ Research, Inc., Waltham, MA, EUA), utilizando-se o programa: etapa inicial a 98<sup>o</sup>C por 3 min; 35-40 ciclos de: 95<sup>o</sup>C por 1 min, 50-60<sup>o</sup>C por 1 min, e 72<sup>o</sup>C por 1 min; e etapa final a 72<sup>o</sup>C por 10 min.

Os produtos de RT-PCR-*duplex* foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TBE 0,5X por 40 min a 100 V (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), utilizando cuba de eletroforese horizontal (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA) e fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP).

As bandas foram visualizadas sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/mL) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e

fotodocumentadas em sistema de captura de imagem Chemilmager™ 4400 (v5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA).

Para a otimização do RT-PCR *duplex*, foram testadas diferentes concentrações de iniciadores para o gene *GAPD* (156,25 nanomoles/L a 5  $\mu$ moles/L, mantendo-se a constante a do gene *CYP3A5* (20  $\mu$ moles/L), tanto na linhagem de hepatócitos HepG2 quanto nas células mononucleares de sangue periférico. Inicialmente foi selecionada a concentração de iniciadores de 1,25  $\mu$ moles/L para o gene *GAPD*, porém nessa concentração o gene *GAPD* apresentou sinal significativamente mais intenso que o gene *CYP3A5*. Resultados de ensaios posteriores mostraram que a melhor concentração de iniciadores *GAPD* é de 850 nanomoles/L (ou 0,85  $\mu$ moles/L) tanto para a linhagem celular HepG2 (**Figura 11A**) quanto para as células mononucleares de sangue periférico (**Figura 11B**).

Após a realização destes ensaios preliminares, pode-se concluir que o gene *CYP3A5* é expresso nas CMSP. Portanto, pode-se proceder ao estudo quantitativo da expressão de *CYP3A5* em CMSP, utilizando-se o método de PCR em Tempo Real.

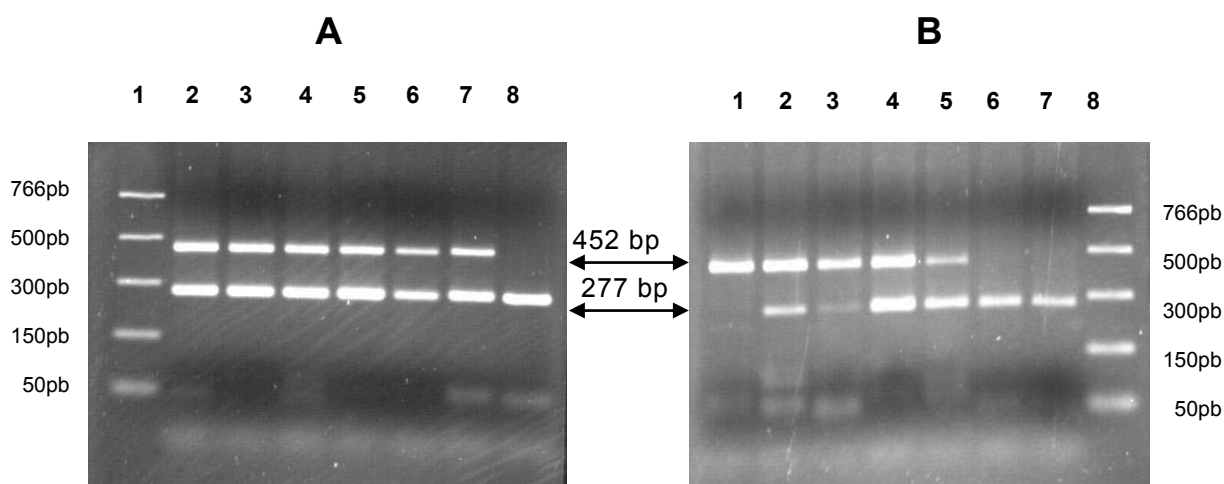


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de RT-PCR *duplex* dos genes *CYP3A5* e *GAPD* em HepG2 (A) e CMSP (B), gerados com 38 ciclos, com variação da concentração dos iniciadores do *GAPD*. (A) Linha 1: marcador de tamanho molecular de DNA *PCR Marker*. Linhas 2 a 7: 1,25 $\mu$ moles/L, 1,1 $\mu$ moles/L, 1 $\mu$ moles/L, 0,850 $\mu$ moles/L, 0,750 $\mu$ moles/L e 0,625 $\mu$ moles/L respectivamente. Linha 8: ausência de iniciadores para o gene *GAPD*. (B). Linhas 1 a 6: 1,25 $\mu$ moles/L, 1,1 $\mu$ moles/L, 1 $\mu$ moles/L, 0,850 $\mu$ moles/L, 0,750 $\mu$ moles/L e 0,625 $\mu$ moles/L respectivamente. Linha 7: ausência de iniciadores para o gene *GAPD*. Linha 8: marcador de tamanho molecular de DNA *PCR Marker*.

### 3.11 Análise da expressão de RNAm por RT-PCR em Tempo Real

A medida quantitativa da expressão do RNAm do *CYP3A5* em CMSP foi realizada por RT-PCR em tempo real utilizando o sistema de amplificação *TaqMan*<sup>®</sup> *RT-PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O sinal de fluorescência emitido pelo fluoróforo da sonda *TaqMan*<sup>®</sup> é detectado em tempo real no equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A análise da expressão gênica foi realizada por método de quantificação relativa utilizando o gene *GAPD* como controle endógeno.

Para a amplificação por PCR em tempo real, foram desenhados iniciadores e sonda marcada com fluoróforo para o gene *CYP3A5* com o

auxílio do programa *PrimerExpress*® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) (**Tabela 5**, anterior). A região escolhida para amplificação é comum ao RNAm corretamente transcrito (funcional) e ao RNAm variante (iniciadores e sonda estão localizados entre os éxons 2 e 3). Para o *GAPD* foram utilizados os iniciadores comercializados através do serviço “*Assay on demand*” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), sob a identificação de catálogo número 4326317E.

Para os ensaios de RT-PCR em tempo real, O cDNA foi obtido conforme descrito no item 3.10. Os cDNA dos genes *CYP3A5* e *GAPD* foram amplificados por PCR individual. Os ensaios foram realizados no termociclador ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Nos ensaios de amplificação do *CYP3A5* utilizou-se iniciadores a 10 µmoles/L sonda de detecção marcada com FAM a 5 µmoles/L. Para o *GAPD*, utilizou-se a sonda de detecção (5 µmoles/L) marcada com VIC e os iniciadores a 18 µmoles/L. Os demais reagentes foram fornecidos em solução 2 x concentrada denominada *Master Mix* (MgCl<sub>2</sub> 5 mM, dNTPs 400µM, AmpErase<sup>R</sup> UNG 30U, enzima AmpliTaq Gold 250 U e tampão de reação *Gold PCR Buffer*) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Foi utilizado volume final de 25 µL por reação.

O programa de PCR em tempo real utilizado foi constituído de: (1) um ciclo 2 min a 50°C, (ativação da UNG); (2) um ciclo de 10 min a 95°C, (inativação da UNG); (3) 40 ciclos de 15 seg a 95°C (desnaturação) e 1 min a 60°C (hibridização e extensão). Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos das sondas TaqMan<sup>®</sup> foram detectados pelo equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os dados foram



analisados utilizando-se o programa *Sequence Detection Software* v1.2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA EUA) que gera curvas semi-logarítmicas dos sinais de amplificação.

A quantidade de cDNA a ser utilizada nos ensaios foi otimizada a partir de uma curva-padrão, realizada com diferentes concentrações de amostra. A curva-padrão permite avaliar a linearidade da amplificação bem como a eficiência da mesma. Segundo Livak e Schmittgen (2001), para uma reação de PCR em tempo real ter eficiência de 100%, a inclinação (do inglês *slope*) da curva-padrão deve ser próximo de -3,3. A eficiência de cada ensaio foi considerada adequada para valores acima de 90%.

A variação inter-ensaio do PCR em tempo real foi analisada com o uso do cDNA da linhagem celular derivada de enterócitos Caco2 como controle em todos os ensaios realizados.

### **3.12 Controle de qualidade dos ensaios de PCR-RFLP e RT-PCR**

Os ensaios de PCR foram monitorizados utilizando-se controle de reagentes (tubo no qual não se adiciona a amostra de DNA ou cDNA) em cada conjunto de reações. Os ensaios de RT-PCR-*duplex* foram realizados em triplicata para cada amostra. Os ensaios de RT-PCR em Tempo Real foram realizados em duplicata para cada amostra.

Os produtos de PCR-RFLP apresentam em sua seqüência um sítio de reconhecimento da enzima de restrição, denominado sítio constitutivo, que permite o monitoramento da atividade enzimática durante a reação de restrição. Os ensaios de PCR-RFLP foram repetidos aleatoriamente para 30%

das amostras testadas. Controles de genótipos foram utilizados em todos os ensaios de PCR-RFLP.

### 3.13 Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se os programas SigmaStat v.2.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA) e SAS System for Windows versão 8.02 (SAS Institute Inc, 1999-2001, Cary, NC, EUA).

Inicialmente foi realizada uma análise descritiva dos parâmetros bioquímicos basais para os grupos hipercolesterolêmico e normolipidêmico, e após o tratamento com atorvastatina no grupo hipercolesterolêmico. Para comparar os valores de parâmetros bioquímicos entre os grupos estudados e para avaliar o efeito dos polimorfismos genéticos sobre os valores de lipídeos basais ou sobre a resposta terapêutica foram utilizados o teste *t* de Student e o teste de Mann-Whitney (*Mann Whitney Rank Sum Test*). Variáveis categóricas foram comparadas por  $\chi^2$  (Qui-Quadrado) ou Teste Exato de Fisher.

Para as análises dos polimorfismos genéticos, os indivíduos negros foram agrupados com os indivíduos pardos, a fim de aumentar o poder estatístico dos testes. Para a mesma finalidade, os genótipos heterozigotos foram agrupados com o genótipo raro. A avaliação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizada usando o programa MS-DOS QBasic V. 1.1 (Microsoft Informática Ltda., São Paulo, Brasil).

Os grupos haplotípicos foram comparados por e as diferenças entre a expressão basal e após o tratamento com atorvastatina através do Teste-*t* de Student.

Para a análise da expressão gênica, os indivíduos foram comparados por Teste-*t* de Student ou *One Way ANOVA*. O nível de significância estabelecido foi de  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Dados dos indivíduos do estudo

As características clínicas e as concentrações séricas basais de lipídeos dos indivíduos dos grupos hipercolesterolêmico (HC) e normolipidêmico (NL) incluídos no estudo estão descritas na **Tabela 6**.

Observou-se maior frequência relativa de mulheres em ambos os grupos (HC = 68% vs. NL = 70%). Entretanto, a distribuição de homens e mulheres do grupo HC é similar a do grupo NL ( $p=0,843$ ).

A média de idade é maior no grupo de hipercolesterolêmicos ( $p<0,001$ ) na população estudada, fato que vem explicar a dificuldade em selecionar pacientes mais idosos para o grupo normolipidêmico. Alterações metabólicas, como a hipercolesterolemia e a diabete, ocorrem com maior frequência em indivíduos com idade mais avançada. Conseqüentemente, pacientes normolipidêmicos são mais difíceis de incluir em faixas etárias maiores.

A presença de indivíduos brancos foi mais freqüente em ambos os grupos (HC = 67% vs NL = 65%), embora a distribuição de brancos e negros sejam similares entre os grupos ( $p=0,364$ ).

Os grupos HC e NL não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto ao IMC (NL =  $26 \pm 4$  vs HC =  $28 \pm 4$ ;  $p=0,103$ ). No entanto, a proporção de indivíduos obesos é significativamente maior no grupo HC (NL= 11% vs HC = 28%;  $p<0,001$ ). A presença de hipertensão arterial foi similar entre os grupos HC e NL ( $p>0,05$ ).

Como esperado, o grupo HC teve concentrações plasmáticas do perfil lipídico maiores que o grupo NL ( $p < 0,001$ ), porém os valores para HDL-c foram similares entre os dois grupos (**Tabela 6, Figura 12**).

Tabela 6. Características clínicas e concentrações de lipídeos séricos dos indivíduos normolipidêmicos (NL) e hipercolesterolêmicos (HC)

Variável	NL (99)	HC (139)	
Sexo (Masculino/feminino)	30/69	45/94	$p=0,843^c$
Idade (anos)	47 ± 8	57 ± 11	$p < 0,001^a$
Etnia (Branco/Negro)	64/35	93/46	$p=0,364^c$
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26 ± 4	28 ± 4	$p=0,103^a$
Obesidade (%)	11	28	$p < 0,001$
Hipertensão arterial (%)	48	58	$p=0,293$
Perfil lipídico (mg/dL)			
Colesterol total	174 ± 18	281 ± 38	$p < 0,001^b$
Triglicérides	91 ± 32	157 ± 64	$p < 0,001^b$
HDL-c	56 ± 13	56 ± 14	$p=0,883^b$
LDL-c	100 ± 16	193 ± 35	$p < 0,001^b$
VLDL-c	18 ± 6	32 ± 13	$p < 0,001^b$
Apo AI	144 ± 28	130 ± 26	$p=0,001^a$
Apo B	75 ± 14	141 ± 22	$p < 0,001^a$

Nota: Número de indivíduos em parênteses.

HDL-c: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; Apo AI: Apolipoproteína AI; apo B: apolipoproteína B.

Variáveis contínuas são apresentadas como média ± DP e comparadas por Teste-t de Student<sup>(a)</sup> ou *Mann Whitney Rank Sum Test*<sup>(b)</sup>. Variáveis categóricas foram comparadas por qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e Teste Exato de Fisher<sup>(c)</sup>.

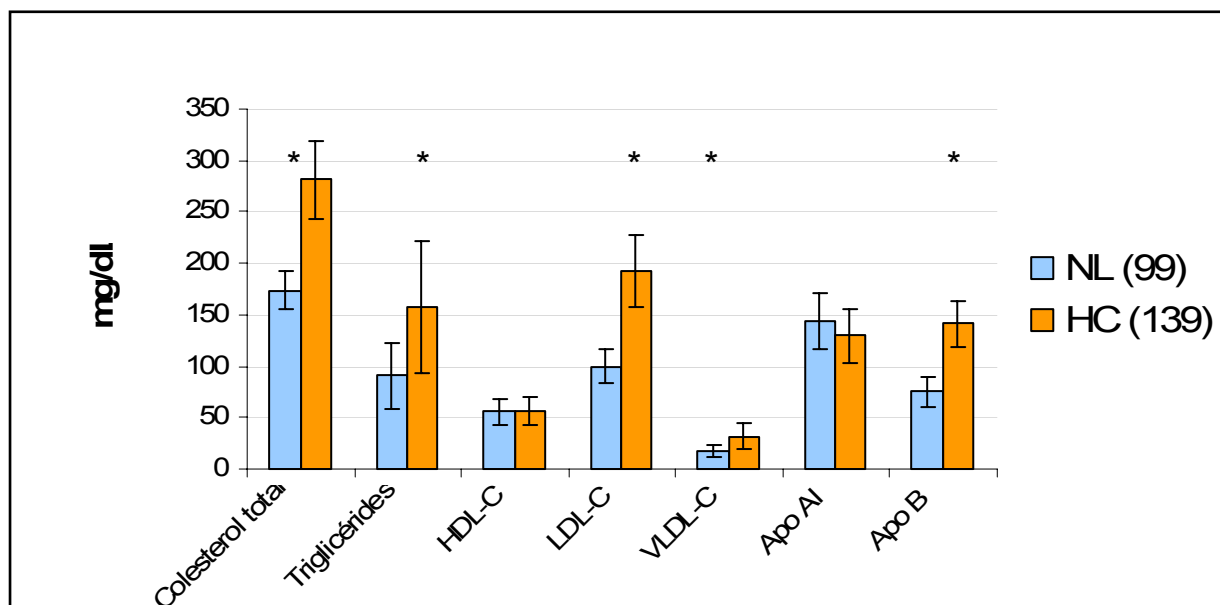


Figura 12. Perfil lipídico sérico dos indivíduos normolipidêmicos (NL) e hipercolesterolêmicos (HC).

ApoAI, Apolipoproteína AI; Apo B, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

As **Tabelas 7 e 8** descrevem as características dos grupos NL e HC, respectivamente, separados por etnia. Não foram observadas diferenças nos parâmetros avaliados entre indivíduos de etnia branca e negra do grupo NL, com exceção da pressão arterial que foi maior nos de etnia negra (**Tabela 7**).

No grupo HC, observa-se maior freqüência de mulheres de etnia negra (80%) do que branca (61%,  $p = 0,038$ ) (**Tabela 8**). No grupo de mulheres de etnia negra, há também maior freqüência de menopausa ( $p = 0,023$ ). É possível que a baixa proporção de negros incluídos neste estudo (33%) tenha contribuído para estes achados. Não há diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos brancos e negros quanto ao IMC, à presença de obesidade, tabagismo, consumo de álcool, prática de atividades físicas ou história familiar de DAC ( $p > 0,05$ ).

Quando se avalia a medicação concomitante dos indivíduos HC, a freqüência de uso de diuréticos e de bloqueadores de canal de cálcio é maior

no grupo de negros que de brancos ( $p < 0,05$ ). Estes resultados têm relação com a maior frequência de hipertensão observada no grupo de negros ( $p = 0,028$ ).

No grupo NL, o perfil lipídico é similar entre indivíduos NL negros e brancos ( $p > 0,05$ ) (**Tabela 7, Figura 13**). Por outro lado, no grupo HC, as concentrações de VLDL-c e de triglicérides são maiores e as de HDL-c menores nos indivíduos brancos que nos de etnia negra ( $p < 0,05$ ) (**Tabela 8, Figura 14**). Os demais parâmetros foram similares entre os indivíduos brancos e negros HC ( $p > 0,05$ ).

Tabela 7. Características clínicas e variáveis antropométricas dos indivíduos normolipidêmicos separados por etnia

Variável	Total (99)	Brancos (64)	Negros (35)	
Sexo masculino	30% (30)	25% (16)	40% (14)	$p = 0,186$
feminino	70% (69)	75% (48)	60% (21)	
Idade (anos)	47 ± 8	47 ± 8	47 ± 8	$p = 0,655^b$
Hipertensão	48% (48)	44% (28)	57% (20)	$p = 0,287$
Pressão Diastólica (mmHg)	78 ± 12	76 ± 11	82 ± 11	$p = 0,031^a$
Pressão Sistólica (mmHg)	124 ± 16	122 ± 16	129 ± 15	$p = 0,029^a$
Menopausa*	33% (19)	32% (12)	37% (7)	$p = 0,921$
Obesidade**	12% (11)	9% (6)	14% (5)	$p = 0,519^c$
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26 ± 4	26 ± 4	27 ± 5	$p = 0,297^a$
Fumo	17% (17)	22% (14)	9% (3)	$p = 0,162$
Consumo de Álcool	1% (1)	0% (0)	1% (1)	$p = 1,000^c$
Atividade Física**	50% (50)	49% (32)	51% (18)	$p = 0,941$
DAC	46% (46)	49% (32)	40% (14)	$p = 0,457$
Medicação concomitante				
diuréticos	37% (37)	33% (21)	46% (16)	$p = 0,293$
Inibidores da ECA	22% (22)	29% (27)	26% (9)	$p = 0,158$
Beta- bloqueadores	8% (8)	6% (4)	11% (4)	$p = 0,448^c$
Bloqueadores de canal de Cálcio	4% (4)	5% (3)	3% (1)	$p = 1,000^c$
Perfil lipídico basal (mg/dL)				
Colesterol total	174 ± 17	173 ± 17	175 ± 18	$p = 0,684^a$
LDL-c	100 ± 16	100 ± 16	99 ± 16	$p = 0,720^a$
HDL-c	56 ± 13	54 ± 12	58 ± 14	$p = 0,176^a$
VLDL-c	18 ± 6	18 ± 7	18 ± 6	$p = 0,542^a$
Triglicérides	91 ± 32	92 ± 34	88 ± 30	$p = 0,542^a$
Apo AI	143 ± 28	140 ± 26	149 ± 31	$p = 0,210^a$
Apo B	75 ± 14	76 ± 12	73 ± 17	$p = 0,490^a$

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Variáveis contínuas são apresentadas como média ± DP e comparadas por Teste-t de Student<sup>(a)</sup>. Variáveis categóricas foram comparadas por qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e Teste Exato de Fisher<sup>(c)</sup>.

ECA, enzima conversora de angiotensina; IMC, índice de massa corporal; DAC, história familiar de doença arterial coronariana. ApoAI, Apolipoproteína AI; Apo B, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

(\*) Doze mulheres não informaram sua condição de menopausa (10 Brancas e 2 negras ou pardas).

(\*\*) 3 brancos não foram avaliados quanto à prática de atividade física ou obesidade.



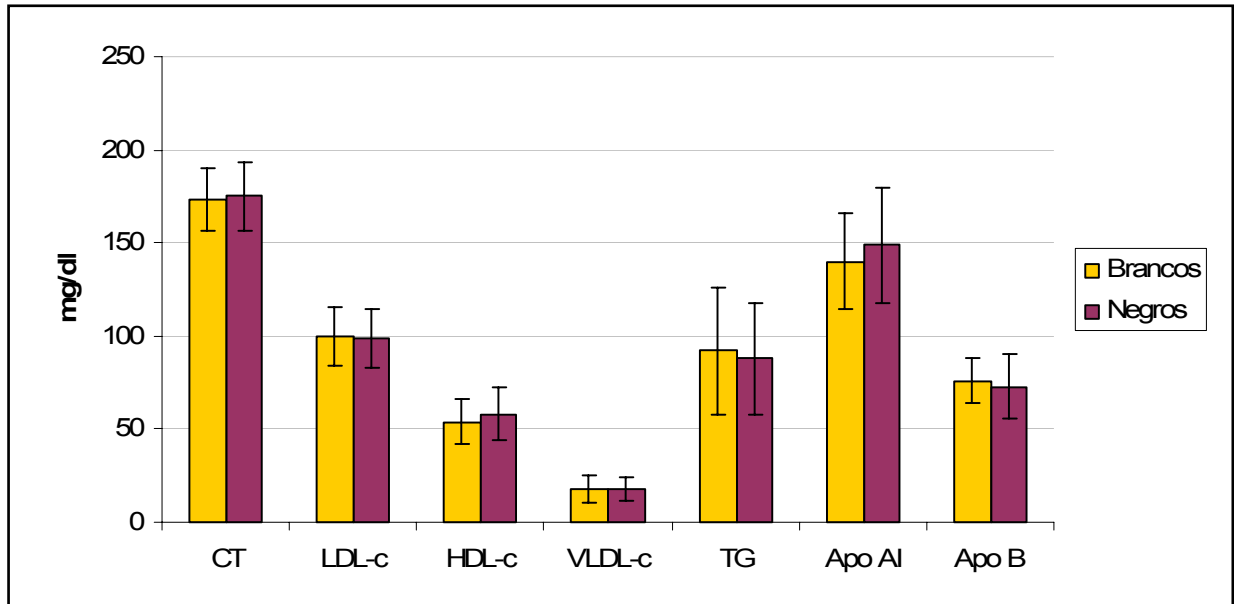


Figura 13. Perfil lipídico sérico dos indivíduos normolipidêmicos (NL, n= 99) agrupados de acordo com a etnia.

ApoAI, Apolipoproteína AI; Apo B, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Tabela 8 – Características clínicas e variáveis antropométricas dos indivíduos hipercolesterolêmicos separados por etnia

Variável	Total (139)	Branco (93)	Negros (46)	
Sexo masculino	32 % (45)	39% (36)	20% (9)	$p = 0,038$
feminino	68 % (94)	61% (57)	80% (37)	
Idade (anos)	57 ± 11	57 ± 12	58 ± 10	$p = 0,435^a$
Hipertensão	58 % (80)	50% (47)	72% (33)	$p = 0,028$
Pressão Diastólica (mmHg)	85 ± 13	84 ± 13	88 ± 14	$p = 0,187^a$
Pressão Sistólica (mmHg)	134 ± 22	133 ± 23	138 ± 19	$p = 0,074^a$
Menopausa*	86% (75)	49 % (44)	72 % (31)	$p = 0,023$
Obesidade**	28 % (38)	27 % (25)	30 % (13)	$p = 0,904$
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	28 ± 4	27 ± 4	28 ± 4	$p = 0,189^a$
Fumo	16 % (22)	65% (16)	13% (6)	$p = 0,700$
Consumo de Álcool	3 % (4)	4 % (4)	0 % (0)	$p = 1,000^c$
Atividade Física**	45 % (62)	45 % (42)	45 % (20)	$p = 0,879$
DAC	57% (78)	59% (55)	50 % (23)	$p = 0,362$
Medicação concomitante				
diuréticos	38 % (54)	32 % (30)	52 % (24)	$p = 0,037$
Inibidores da ECA	34 % (47)	29 % (27)	43 % (20)	$p = 0,133$
Beta-bloqueadores	22 % (31)	22 % (24)	15 % (7)	$p = 0,232$
Bloqueadores de canal de Cálcio	11% (15)	5 % (5)	22 % (10)	$p = 0,008$
Perfil lipídico basal (mg/dL)				
Colesterol total	281 ± 38	280 ± 38	283 ± 39	$p = 0,754^a$
LDL-c	193 ± 35	192 ± 35	195 ± 35	$p = 0,558^a$
HDL-c	56 ± 13	54 ± 13	59 ± 13	$p = 0,010^a$
VLDL-c	31 ± 12	33 ± 13	26 ± 10	$p = 0,002^a$
Triglicérides	157 ± 64	168 ± 67	134 ± 50	$p = 0,002^a$
Apo AI	130 ± 25	129 ± 27	132 ± 20	$p = 0,436^a$
Apo B	140 ± 22	140 ± 22	141 ± 22	$p = 0,802^a$

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Variáveis contínuas são apresentadas como média ± DP e comparadas por Teste-t de Student<sup>(a)</sup>. Variáveis categóricas foram comparadas por qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e Teste Exato de Fisher<sup>(c)</sup>.

Apo AI, Apolipoproteína AI; ApoB, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade. ECA, enzima conversora de angiotensina; IMC, índice de massa corporal; DAC, história familiar de doença arterial coronariana.

(\*) Sete mulheres não informaram sua condição de menopausa (4 Brancas e 3 negras ou pardas).

(\*\*) Dois negros não foram avaliados quanto à prática de atividade física ou obesidade.

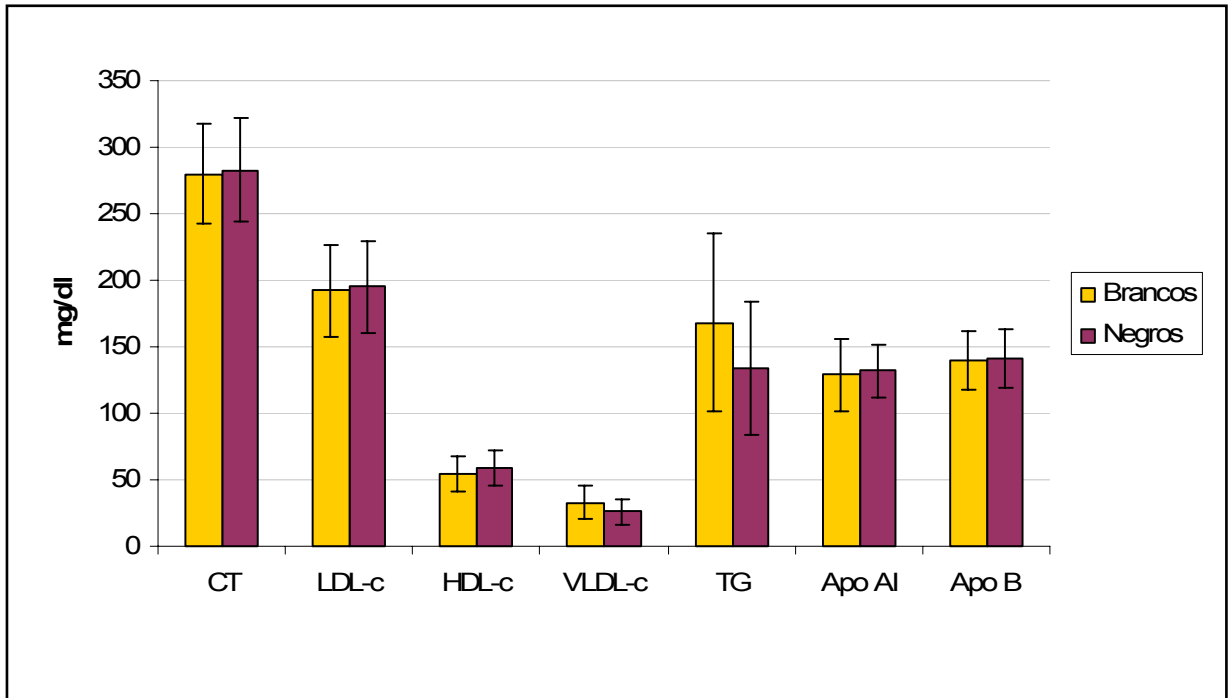


Figura 14. Perfil lipídico sérico dos indivíduos hipercolesterolêmicos (HC, n= 139) agrupados de acordo com a etnia. ApoAI, Apolipoproteína AI; Apo B, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

## 4.2 Estudo dos polimorfismos genéticos

A análise da frequência relativa dos alelos e a distribuição dos genótipos dos SNPs *CYP3A5\*3C*, *CYP3A5\*6* e *CYP3A5\*1D* do gene *CYP3A5*, nos pacientes dos grupos HC e NL, podem ser observadas na **Tabela 9**. Todos os SNPs estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos. Não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na frequência gênica ou genotípica entre o grupo de indivíduos hipercolesterolêmicos e normolipidêmicos.

Ao analisar separadamente as frequências alélicas e genotípicas dos pacientes NL, observa-se que a distribuição de genótipos e a frequência relativa de alelos dos SNPs *CYP3A5\*3C*, *CYP3A5\*6* e *CYP3A5\*1D* é similar

entre homens e mulheres ( $p>0,05$ ) (**Tabela 10**). Resultados similares são observados no grupo HC (**Tabela 11**).

Ao analisar as freqüências de alelos *CYP3A5* em NL e HC de acordo com a etnia, observa-se que a freqüência dos alelos *CYP3A5\*3C* e *CYP3A5\*1D* foi significativamente maior em NL brancos (\*3C: 85,9%; \*1D: 79,7%) que em negros (\*3C: 42,8%,  $p<0,001$ ; \*1D: 45,6% ,  $p <0,001$ ) (**Tabela 12**). Entretanto, não foram observadas diferenças nas freqüências do alelo *CYP3A5\*6* entre negros e brancos normolipidêmicos.

No grupo HC, os alelos *CYP3A5\*3C* e \*1D foram também mais freqüentes em brancos (\*3C: 84,9%; \*1D: 84,8%) que em negros (\*3C: 47,8 % ,  $p<0,001$ ; \*1D: 55,2 % ,  $p <0,001$ ) (**Tabela 13**). Por outro lado, a freqüência do alelo *CYP3A5\*6* foi maior em negros (6,8%) que em brancos (0,0%,  $p = 0,002$ ). O alelo \*6 não foi encontrado em indivíduos \*3C/\*3C, somente em indivíduos portadores do alelo \*1A.

Os alelos *CYP3A5\*3C* e *CYP3A5\*1D* estão em desequilíbrio de ligação em ambos os grupos, HC ( $\chi^2= 159,768$ ;  $p<0,001$ ) e NL ( $\chi^2= 140,084$ ;  $p<0,001$ ) (**Tabela 14**). Esses dados são sugestivos de que o alelo *CYP3A5\*1D* está fortemente ligado ao alelo *CYP3A5\*3C*. A presença dos alelos *CYP3A5\*3C* e *CYP3A5\*1D* no mesmo indivíduo simultaneamente origina o alelo *CYP3A5\*3A*. O haplótipo \*3C/\*3C + \*1D/\*1D (haplótipo \*3A/\*3A) é o mais freqüente em ambos os grupos. A forte associação entre os alelos foi encontrada também quando os indivíduos dos grupos HC e NL foram separados de acordo com o sexo e a etnia ( $p<0,001$ ).

As freqüências do alelo *CYP3A5\*3C* e do haplótipo \*3A/\*3A também foram avaliadas no grupo total de indivíduos HC com hipertensão, e CK e ALT séricas alteradas. Não foram observadas associações entre essas variáveis e

o genótipo *CYP3A5\*3C/\*3C* ( $p>0,05$ ) (Tabela 15) e o haplótipo *\*3A/\*3A* (Tabela 16). Resultados similares também foram observados nos dois grupos étnicos (dados não mostrados).

Tabela 9. Distribuição de genótipos e frequência relativa de alelos dos SNPs *CYP3A5\*3C*, *CYP3A5\*6* e *CYP3A5\*1D* do *CYP3A5*, em hipercolesterolêmicos (HC) e normolipidêmicos (NL)

Polimorfismo	Distribuição dos genótipos			Frequência de alelos	
	<i>*1A/*1A</i>	<i>*1A/*3C</i>	<i>*3C/*3C</i>	<i>*1A</i>	<i>*3C</i>
<b><i>CYP3A5*3C</i></b>					
HC (139)	9% (14)	36% (52)	55% (73)	28,8% (80)	71,2% (198)
NL (99)	12 % (12)	28% (36)	54% (51)	30,3% (60)	69,7% (138)
	$\chi^2=0,25$ (2df, $p=0,882$ )			$\chi^2=0,07$ (1df, $p=0,796$ )	
<b><i>CYP3A5*6</i></b>	<b><i>*1A/*1A</i></b>	<b><i>*1A/*6</i></b>	<b><i>*6/*6</i></b>	<b><i>*1A</i></b>	<b><i>*6</i></b>
HC (137)	96% (131)	5% (6)	0% (0)	97,8% (268)	2,2% (6)
NL (99)	93% (92)	7% (7)	0% (0)	96,5% (191)	3,5% (7)
	$\chi^2= 0,37$ (1df, $p=0,545$ )			$\chi^2=0,36$ (1df, $p=0,551$ )	
<b><i>CYP3A5*1D</i></b>	<b><i>*1A/*1A</i></b>	<b><i>*1A/*1D</i></b>	<b><i>*1D/*1D</i></b>	<b><i>*1A</i></b>	<b><i>*1D</i></b>
HC (140)	8% (12)	34% (47)	58% (81)	25,4% (71)	74,6% (209)
NL (98)	11% (11)	34% (34)	55% (53)	28,6% (56)	71,4% (140)
	$\chi^2= 0,59$ (2df, $p=0,746$ )			$\chi^2=0,46$ (1df, $p=0,500$ )	

Nota: Número de indivíduos em parênteses

Equilíbrio de Hardy-Weinberg:

SNP *CYP3A5\*3C*: HC,  $\chi^2 = 1,32$  ( $p>0,05$ ) e NL,  $\chi^2 = 3,36$  ( $p>0,05$ ).

SNP *CYP3A5\*6*: HC,  $\chi^2 = 0,07$  ( $p>0,05$ ) e NL,  $\chi^2 = 0,13$  ( $p >0,05$ ).

SNP *CYP3A5\*1D*: HC,  $\chi^2 = 1,79$  ( $p>0,05$ ) e NL,  $\chi^2 = 2,11$  ( $p >0,05$ ).

Tabela 10. Distribuição de genótipos e frequência relativa de alelos dos SNPs *CYP3A5\*3C*, *CYP3A5\*6* e *CYP3A5\*1D* do *CYP3A5*, em normolipidêmicos agrupados por sexo

Polimorfismo	Distribuição dos genótipos			Frequência de alelos	
	<i>*1A/*1A</i>	<i>*1A/*3C</i>	<i>*3C/*3C</i>	<i>*1A</i>	<i>*3C</i>
<b><i>CYP3A5*3C</i></b>					
Homens (30)	10% (3)	37% (11)	53% (16)	28,3% (17)	71,7% (43)
Mulheres (69)	13% (9)	33% (23)	54% (37)	29,7% (41)	70,3% (97)
$\chi^2 = 0,23$ (2 df, $p=0,892$ )			$\chi^2=0,0007$ (1df, $p=0,979$ )		
<b><i>CYP3A5*6</i></b>	<b><i>*1A/*1A</i></b>	<b><i>*1A/*6</i></b>	<b><i>*6/*6</i></b>	<b><i>*1A</i></b>	<b><i>*6</i></b>
Homens (30)	90% (27)	10% (3)	0% (0)	95% (57)	5% (3)
Mulheres (69)	94% (65)	6% (4)	0% (0)	97,1% (134)	2,9% (4)
$\chi^2 = 0,10$ (1df, $p=0,747$ )			$\chi^2=0,10$ (1df, $p=0,751$ )		
<b><i>CYP3A5*1D</i></b>	<b><i>*1A/*1A</i></b>	<b><i>*1A/*1D</i></b>	<b><i>*1D/*1D</i></b>	<b><i>*1A</i></b>	<b><i>*1D</i></b>
Homens (30)	10% (3)	37% (11)	53% (16)	28,3,5% (17)	71,7% (43)
Mulheres (68)	12% (8)	34% (23)	54% (37)	28,7% (39)	71,3% (97)
$\chi^2 = 0,11$ (2df, $p=0,946$ )			$\chi^2=0,01$ (1df, $p=0,902$ )		

Nota: Número de indivíduos em parênteses

Equilíbrio de Hardy-Weinberg:

SNP *CYP3A5\*3C*: Homens,  $\chi^2 = 0,28$  ( $p>0,05$ ) e Mulheres,  $\chi^2 = 2,81$  ( $p >0,05$ ).

SNP *CYP3A5\*6*: Homens,  $\chi^2 = 0,08$  ( $p>0,05$ ) e Mulheres,  $\chi^2 = 0,06$  ( $p >0,05$ ).

SNP *CYP3A5\*1D*: Homens,  $\chi^2 = 0,006$  ( $p>0,05$ ) e Mulheres,  $\chi^2 = 3,02$  ( $p >0,05$ ).

Tabela 11. Distribuição de genótipos e frequência relativa de alelos dos SNPs CYP3A5\*3C, CYP3A5\*6 e CYP3A5\*1D do gene CYP3A5, em hipercolesterolêmicos agrupados por sexo

Polimorfismo	Distribuição dos genótipos			Frequência de alelos	
	*1A/*1A	*1A/*3C	*3C/*3C	*1A	*3C
<b>CYP3A5*3C</b>					
Homens (45)	11% (5)	22% (10)	67% (30)	22,2% (20)	77,8% (70)
Mulheres (94)	8% (8)	43% (40)	49% (46)	29,8% (56)	70,2% (132)
	$\chi^2 = 5,47$ (2 df, p=0,065)			$\chi^2 = 1,39$ (1df, p= 0,238)	
<b>CYP3A5*6</b>					
Homens (44)	96% (42)	4% (2)	0% (0)	97,7% (86)	2,3% (2)
Mulheres (93)	96% (89)	4% (4)	0% (0)	97,8% (182)	2,2% (4)
	$\chi^2 = 0,15$ (1df, p=0,703)			$\chi^2 = 0,14$ (1df, p=0,706)	
<b>CYP3A5*1D</b>					
Homens (46)	13% (6)	22% (10)	65% (30)	23,9% (22)	76,1% (70)
Mulheres (94)	6% (6)	39% (37)	55% (51)	26,1% (49)	73,9% (139)
	$\chi^2 = 5,10$ (2df, p=0,078)			$\chi^2 = 0,06$ (1df, p=0,809)	

Nota: Número de indivíduos em parênteses

Equilíbrio de Hardy-Weinberg:

SNP CYP3A5\*3C: Homens,  $\chi^2 = 5,74$  ( $p > 0,05$ ) e Mulheres,  $\chi^2 = 0,03$  ( $p > 0,05$ ).

SNP CYP3A5\*6: Homens,  $\chi^2 = 0,02$  ( $p > 0,05$ ) e Mulheres,  $\chi^2 = 0,04$  ( $p > 0,05$ ).

SNP CYP3A5\*1D: Homens,  $\chi^2 = 3,45$  ( $p > 0,05$ ) e Mulheres,  $\chi^2 = 0,04$  ( $p > 0,05$ ).

Tabela 12. Distribuição de genótipos e freqüência relativa de alelos dos SNPs CYP3A5\*3C, CYP3A5\*6 e CYP3A5\*1D do gene CYP3A5, em normolipidêmicos agrupados por etnia

Polimorfismo	Distribuição dos genótipos			Freqüência de alelos	
	*1A/*1A	*1A/*3C	*3C/*3C	*1A	*3C
<b>CYP3A5*3C</b>					
Branços (64)	3% (2)	22% (14)	75% (48)	14,1% (18)	85,9% (110)
Negros (35)	29% (10)	57% (20)	14% (5)	57,2% (40)	42,8% (30)
$\chi^2 = 35,86$ (2 df, $p < 0,001$ )			$\chi^2 = 38,50$ (1df, $p < 0,001$ )		
<b>CYP3A5*6</b>					
Branços (64)	97% (62)	3% (2)	0 (0)	98,4% (126)	1,6% (2)
Negros (35)	86% (30)	14% (5)	0 (0)	92,9% (65)	7,1% (5)
$\chi^2 = 25,88$ (1df, $p < 0,001$ )			$\chi^2 = 2,66$ (1df, $p = 0,103$ )		
<b>CYP3A5*1D</b>					
Branços (64)	6% (4)	28% (18)	66% (42)	20,3% (26)	79,7% (102)
Negros (34)	26% (9)	56% (19)	18% (6)	54,4% (37)	45,6% (31)
$\chi^2 = 21,81$ (2df, $p < 0,001$ )			$\chi^2 = 22,14$ (1df, $p < 0,001$ )		

Nota: Número de indivíduos em parênteses

Equilíbrio de Hardy-Weinberg:

SNP CYP3A5\*3C: brancos,  $\chi^2 = 0,58$  ( $p > 0,05$ ) e negros,  $\chi^2 = 0,97$  ( $p > 0,05$ ).

SNP CYP3A5\*6: brancos,  $\chi^2 = 0,02$  ( $p > 0,05$ ) e negros,  $\chi^2 = 0,21$  ( $p > 0,05$ ).

SNP CYP3A5\*1D: brancos,  $\chi^2 = 1,10$  ( $p > 0,05$ ) e negros,  $\chi^2 = 0,12$  ( $p > 0,05$ ).



Tabela 13. Distribuição de genótipos e frequência relativa de alelos dos SNPs CYP3A5\*3C, CYP3A5\*6 e CYP3A5\*1D do gene CYP3A5, em hipercolesterolêmicos agrupados por etnia

Polimorfismo	Distribuição dos genótipos			Frequência de alelos	
	*1A/*1A	*1A/*3C	*3C/*3C	*1A	*3C
<b>CYP3A5*3C</b>					
Branco	1%	28%	71%	15,1%	84,9%
(93)	(1)	(26)	(66)	(28)	(158)
Negro	26%	52%	22%	52,2%	47,8%
(46)	(12)	(24)	(10)	(48)	(44)
$\chi^2 = 39,25$ (2 df, $p < 0,001$ )			$\chi^2 = 40,85$ (1 df, $p < 0,001$ )		
<b>CYP3A5*6</b>					
Branco	100%	0%	0%	100%	0%
(93)	(93)	(0)	(0)	(186)	(0)
Negro	86%	14%	0%	93,2%	6,8%
(44)	(38)	(6)	(0)	(82)	(6)
$\chi^2 = 10,21$ (1 df, $p = 0,001$ )			$\chi^2 = 9,98$ (1 df, $p = 0,002$ )		
<b>CYP3A5*1D</b>					
Branco	2%	26%	72%	15,2%	84,8%
(92)	(2)	(24)	(66)	(28)	(156)
Negro	21%	48%	31%	44,8%	55,2%
(48)	(10)	(23)	(15)	(43)	(53)
$\chi^2 = 26,23$ (2 df, $p < 0,001$ )			$\chi^2 = 27,61$ (1 df, $p < 0,001$ )		

Nota: Número de indivíduos em parênteses

Equilíbrio de Hardy-Weinberg:

SNP CYP3A5\*3C: brancos,  $\chi^2 = 0,81$  ( $p > 0,05$ ) e negros,  $\chi^2 = 0,10$  ( $p > 0,05$ ).

SNP CYP3A5\*6: brancos,  $\chi^2 = 0,00$  ( $p > 0,05$ ) e negros,  $\chi^2 = 0,24$  ( $p > 0,05$ ).

SNP CYP3A5\*1D: brancos,  $\chi^2 = 0,01$  ( $p > 0,05$ ) e negros,  $\chi^2 = 0,05$  ( $p > 0,05$ ).

Tabela 14. Distribuição de genótipos e frequência relativa de haplótipos dos SNPs CYP3A5\*3C e CYP3A5\*1D do gene CYP3A5, em hipercolesterolêmicos (HC) e normolipidêmicos (NL)

		<b>SNP 3A5*3C</b>		
<b>HC (139)</b>		<b>*1A/*1A (AA)</b>	<b>*1A/*3C (AG)</b>	<b>*3C/*3C (GG)</b>
	<b>*1A/*1A (CC)</b>	8,0% (11)	0% (0)	0,7% (1)
<b>SNP3A5*1D</b>	<b>*1A/*1D (CT)</b>	2,2% (3)	30,9% (43)	0,7% (1)
	<b>*1D/*1D (TT)</b>	0% (0)	6,5% (9)	51,0% (71)
$\chi^2 = 159,77$ (4df, $p < 0,001$ )				
<b>NL (98)</b>		<b>*1A/*1A (AA)</b>	<b>*1A/*3C (AG)</b>	<b>*3C/*3C (GG)</b>
	<b>*1A/*1A (CC)</b>	10,2% (10)	1,0% (1)	0% (0)
<b>SNP3A5*1D</b>	<b>*1A/*1D (CT)</b>	1,0% (1)	31,7% (31)	2% (2)
	<b>*1D/*1D (TT)</b>	1,0% (1)	4,1% (4)	49,0% (48)
$\chi^2 = 140,08$ (4df, $p < 0,001$ )				

Nota: Número de indivíduos em parênteses

Tabela 15. Distribuição do SNP *CYP3A5*\*3C do gene *CYP3A5*, em hipercolesterolêmicos (n=139), quanto à presença de hipertensão (informada no momento da inclusão no protocolo de estudo), CK ou ALT elevadas (maiores que o valor de referência superior) após o tratamento com atorvastatina 10mg/dia/4 semanas.

Variáveis	Distribuição dos genótipos		
	*3C/*3C	*1A/*3C	*1A/*1A
<b>Hipertensão</b>			
Normotensos (58)	64% (37)	27% (16)	9% (5)
Hipertensos (80)	48% (38)	42% (34)	10% (8)
$\chi^2 = 3,60$ (1 df, $p = 0,058$ )*			
<b>CK sérica</b>			
CK normal (114)	57% (65)	37% (42)	6% (7)
CK > valor referência (25)	48% (12)	28% (7)	24% (6)
$\chi^2 = 0,68$ (1 df, $p = 0,411$ )*			
<b>ALT sérica</b>			
ALT normal (124)	54% (67)	36% (45)	10% (12)
ALT > valor referência (15)	67% (10)	27% (4)	6% (1)
$\chi^2 = 0,86$ (1 df, $p = 0,352$ )*			

Nota: Número de indivíduos em parênteses

(\*) Teste feito com os genótipos agrupados (\*3C/\*3C e \*1A/\*3C + \*1A/\*1A)

\* Um indivíduo \*3C/\*3C não informou seu status de hipertensão.

Tabela 16. Distribuição do efeito dos SNP *CYP3A5\*3C* e *\*1D* (haplótipo *\*3A*) do gene *CYP3A5*, em hipercolesterolêmicos (n=139), quanto à presença de hipertensão (informada no momento da inclusão no protocolo de estudo), CK ou ALT elevadas (maiores que o valor de referência superior) após o tratamento com atorvastatina 10mg/dia/4 semanas.

Variáveis	Distribuição dos haplótipos	
	Não <i>*3A/*3A</i>	<i>*3A/*3A</i>
<b>Hipertensão*</b>		
Normotensos (55)	42% (23)	58% (32)
Hipertensos (82)	52% (43)	48% (39)
$\chi^2 = 1,09$ (1 df, $p = 0,296$ )		
<b>CK sérica**</b>		
CK normal (113)	45% (51)	55% (62)
CK > valor referência (25)	56% (14)	44% (11)
$\chi^2 = 0,58$ (1 df, $p = 0,445$ )		
<b>ALT sérica***</b>		
ALT normal (123)	50% (61)	50% (62)
ALT > valor referência (15)	33% (5)	67% (10)
$\chi^2 = 0,84$ (1 df, $p = 0,359$ )		
<b>Uso de medicamentos</b>		
Sem uso (39)	44% (17)	56% (22)
Uso (100)	49% (49)	51% (51)
$\chi^2 = 0,15$ (1 df, $p = 0,700$ )		

Nota: Número de indivíduos em parênteses

(\*) Dois indivíduos *\*3A/\*3A* não informaram seu status de hipertensão.

(\*\*) Um indivíduo negro *\*3A/\*3A* não teve o valor de CK avaliado após o tratamento com atorvastatina

(\*\*\*) Um indivíduo negro *\*3A/\*3A* não teve o valor de ALT avaliado após o tratamento com atorvastatina

### 4.3 Estudo de resposta a atorvastatina

A eficácia do tratamento com atorvastatina (10 mg/dia/4 semanas) pode ser observada na **Tabela 17** e **Figura 15**. Após 4 semanas de tratamento

com o fármaco, houve redução significativa dos lipídeos séricos ( $p < 0,05$ ), com exceção dos valores da HDL-c e da Apo AI que não se alteraram. Após o tratamento, não foram observados aumentos significantes das enzimas CK e ALT após o tratamento ( $p > 0,05$ ). Esses resultados são sugestivos de que na dose utilizada, a atorvastatina não promoveu reações adversas no período de avaliação do estudo.

Tabela 17. Perfil lipídico e outros parâmetros bioquímicos dos indivíduos hipercolesterolêmicos, antes e após tratamento com atorvastatina (10 mg/dia/4semanas)

Variável	Pré Tratamento	Pós Tratamento	Varição (%)	
Colesterol total (mg/dL)	281±38	199±31	-28,8±9,5	$p < 0,001^b$
Triglicérides (mg/dL)	157±64	132±52	-12,0±27,3	$p = 0,002^b$
HDL-c (mg/dL)	56±13	54±13	-2,5±11,2	$p = 0,267^b$
LDL-c (mg/dL)	193±35	118±28	-38,3±12,2	$p < 0,001^b$
VLDL-c (mg/dL)	31±12	26±10	-12,0±27,3	$p < 0,001^b$
Apo AI (mg/dL)	130±25	134±26	-1,6±13,9	$p = 0,304^a$
Apo B (mg/dL)	140±22	99±20	-45,1±26,7	$p < 0,001^a$
CK (U/L)	95±78	94±80	2,2±35,3	$p = 0,627^b$
ALT (U/L)	21±9	24±13	24,3±59,4	$p = 0,072^b$

Nota: Valores são apresentados como media  $\pm$  DP dos dados. O sinal (-) indica redução. HDL-c: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; Apo AI: Apolipoproteína AI; apo B: apolipoproteína B, CK: creatina-quinase; ALT: alanina-transferase. Comparados por teste-*t* pareado<sup>(a)</sup>; *Mann-Whitney Rank Sum Test*<sup>(b)</sup>.

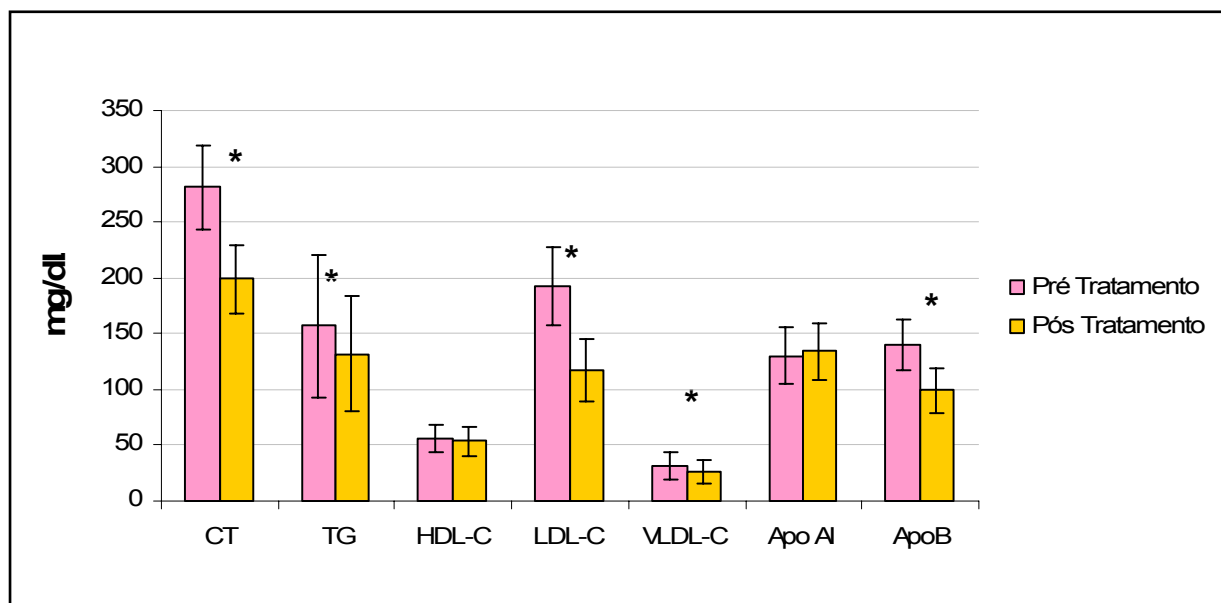


Figura 15. Perfil lipídico sérico dos indivíduos hipercolesterolêmicos (HC, n= 139) antes e após o tratamento com atorvastatina (10mg/dia/4 semanas).

Apo AI, Apolipoproteína AI; Apo B, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade;

Para analisar a relação entre o SNP *CYP3A5\*3C* e a variação do perfil lipídico após tratamento com atorvastatina, os indivíduos portadores de genótipos *\*1A/\*1A* e *\*1A/\*3A* (AA + GA) foram agrupados, constituindo o grupo de genótipo não-*\*3C/\*3C* e os resultados foram comparados com os portadores do genótipo *\*3C/\*3C* (GG). Devido às diferenças nas frequências alélicas e genóticas encontradas entre as etnias, as associações entre o SNP *CYP3A5\*3C* e o perfil lipídico foram avaliadas separadamente para brancos e negros.

No grupo de normolipidêmicos, não se observou relação do SNP *CYP3A5\*3C* e o perfil lipídico sérico basal em brancos e negros (**Tabela 18**). No grupo HC, também não foi observada associação entre o perfil lipídico sérico basal e o SNP *CYP3A5\*3C*, independente da etnia (**Tabelas 19 e 20**). Esses resultados são sugestivos de que o SNP *CYP3A5\*3C* não está

relacionado com variação no perfil lipídico basal de indivíduos normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos.

Tabela 18. Efeito do SNP *CYP3A5\*3C* no perfil lipídico sérico de indivíduos normolipidêmicos brancos e negros

Variável (mg/dL)	Não *3C/*3C	*3C/*3C	
<b>Branços</b>	<b>(16)</b>	<b>(48)</b>	
CT	172 ± 18	174 ± 17	$p = 0,650^a$
LDL-c	97 ± 20	102 ± 15	$p = 0,342^a$
HDL-c	55 ± 11	54 ± 12	$p = 0,638^a$
VLDL-c	20 ± 7	18 ± 7	$p = 0,379^a$
Triglicérides	99 ± 35	90 ± 33	$p = 0,379^a$
Apo AI	133 ± 30	143 ± 25	$p = 0,267^a$
Apo B	77 ± 9	76 ± 13	$p = 0,588^a$
<b>Negros</b>	<b>(30)</b>	<b>(5)</b>	
CT	175 ± 18	173 ± 25	$p = 0,766^a$
LDL-c	101 ± 15	87 ± 15	$p = 0,056^a$
HDL-c	57 ± 13	66 ± 22	$p = 0,327^a$
VLDL-c	17 ± 6	20 ± 7	$p = 0,309^a$
Triglicérides	86 ± 29	102 ± 38	$p = 0,309^a$
Apo AI	147 ± 28	164 ± 46	$p = 0,426^a$
Apo B	75 ± 18	64 ± 6	$p = 0,341^a$

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Os resultados foram comparados por Teste-t de Student<sup>(a)</sup>. Apo AI, Apolipoproteína AI; Apo B, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

A análise do perfil lipídico sérico após o tratamento com atorvastatina, revelou que indivíduos brancos com genótipo \*3C/\*3C tiveram menor redução menor de colesterol total (28,2%), LDL-c (37,6%) e HDL-c (8,2%) que os portadores do genótipo não-\*3C/\*3C (CT: 32,8% e LDL-c: 42,1%; HDL-c: 1,2%  $p < 0,05$ ) (Tabela 19, Figura 16). Esses resultados são sugestivos de que o alelo *CYP3A5\*3C* está associado com menor resposta a atorvastatina em indivíduos HC de etnia branca.

No grupo HC negros, a atorvastatina foi associada com aumento de Apo AI sérica em portadores do genótipo não-\*3C/\*3C (140 mg/dL), mas não

em portadores do genótipo \*3C/\*3C (123 mg/dL,  $p=0,021$ ) (Tabela 20). No entanto, esta diferença discreta não deve ser valorizada, pois o percentual de variação de Apo AI entre os dois grupos não apresentou diferença ( $p>0,05$ ), e é possível que estes resultados resultem da baixa frequência desse genótipo em negros e da pequena casuística de indivíduos de etnia negra em nosso estudo.

Tabela 19. Efeito do SNP CYP3A5\*3C no perfil lipídico sérico de indivíduos hipercolesterolêmicos brancos

Variável (mg/dL)		Não *3C/*3C (27)	*3C/*3C (66)	
CT	Basal	278 ± 42	281 ± 37	$p = 0,673^a$
	Atorvastatina	187 ± 35	201 ± 34	$p = 0,039^a$
	% variação	-32,8 ± 7,2	-28,2 ± 9,0	$p = 0,005^a$
LDL-c	Basal	191 ± 36	193 ± 35	$p = 0,761^a$
	Atorvastatina	110 ± 29	120 ± 29	$p = 0,156^a$
	% variação	-42,1 ± 8,6	-37,6 ± 12,6	$p = 0,034^a$
HDL-c	Basal	56 ± 13	53 ± 14	$p = 0,267^a$
	Atorvastatina	51 ± 12	52 ± 12	$p = 0,781^a$
	% variação	-8,2 ± 11,6	-1,2 ± 10,1	$p = 0,024^a$
VLDL-c	Basal	31 ± 12	35 ± 14	$p = 0,156^a$
	Atorvastatina	24 ± 10	29 ± 12	$p = 0,063^a$
	% variação	-18,7 ± 19,2	-12,8 ± 30,4	$p = 0,093^a$
Triglicérides	Basal	153 ± 59	176 ± 70	$p = 0,156^a$
	Atorvastatina	121 ± 48	145 ± 60	$p = 0,063^a$
	% variação	-18,7 ± 19,2	-12,8 ± 30,4	$p = 0,093^a$
Apo AI	Basal	131 ± 25	129 ± 29	$p = 0,646^a$
	Atorvastatina	132 ± 28	132 ± 27	$p = 0,922^a$
	% variação	0,1 ± 12,2	2,2 ± 14,1	$p = 0,350^a$
Apo B	Basal	137 ± 26	141 ± 21	$p = 0,429^a$
	Atorvastatina	94 ± 22	102 ± 20	$p = 0,091^a$
	% variação	-50,7 ± 28,6	-42,4 ± 25,3	$p = 0,944^a$

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Os resultados foram comparados por Teste-t de Student<sup>(a)</sup>. O sinal (-) indica redução.

Apo AI, Apolipoproteína AI; Apo B, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.



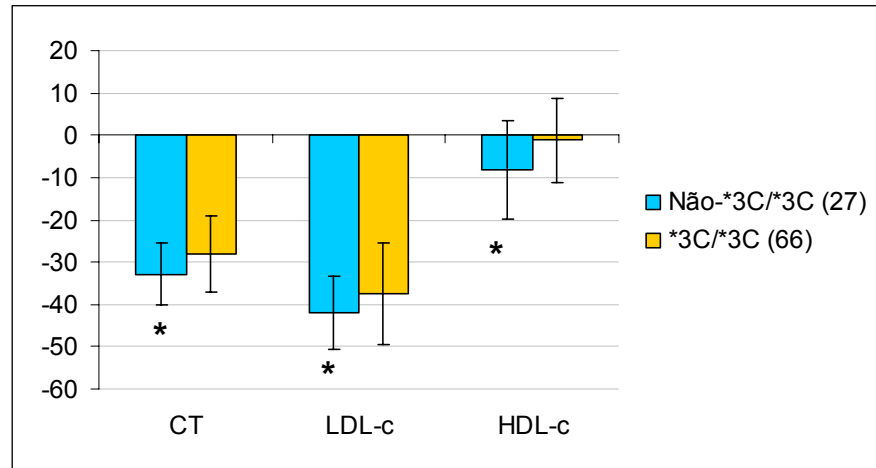


Figura 16. Percentual de variação do perfil lipídico dos indivíduos HC brancos (n=93) agrupados de acordo com o SNP CYP3A5\*3C, após o tratamento com atorvastatina (10mg/dia/4 semanas). Valores expressos como média  $\pm$  DP da variação percentual. CT, colesterol total; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade.

Tabela 20. Efeito do SNP CYP3A5\*3C no perfil lipídico sérico de indivíduos hipercolesterolêmicos negros

Variável (mg/dL)		Não *3C/*3C (36)	*3C/*3C (10)	p
CT	Basal	284 $\pm$ 38	279 $\pm$ 42	p = 0,664 <sup>a</sup>
	Atorvastatina	204 $\pm$ 30	204 $\pm$ 33	p = 0,928 <sup>a</sup>
	% variação	-27,5 $\pm$ 10,8	-26,4 $\pm$ 11,2	p = 0,651 <sup>a</sup>
LDL-c	Basal	196 $\pm$ 36	191 $\pm$ 34	p = 0,683 <sup>a</sup>
	Atorvastatina	121,6 $\pm$ 25	120 $\pm$ 26	p = 0,870 <sup>a</sup>
	% variação	-37,0 $\pm$ 14,5	-36,9 $\pm$ 10,7	p = 0,840 <sup>a</sup>
HDL-c	Basal	61 $\pm$ 13	57 $\pm$ 14	p = 0,305 <sup>a</sup>
	Atorvastatina	59 $\pm$ 14	57 $\pm$ 10	p = 0,607 <sup>a</sup>
	% variação	-2,1 $\pm$ 9,2	2,8 $\pm$ 18,2	p = 0,337 <sup>a</sup>
VLDL-c	Basal	27 $\pm$ 11	26 $\pm$ 8	p = 0,925 <sup>a</sup>
	Atorvastatina	23 $\pm$ 7	25 $\pm$ 8	p = 0,464 <sup>a</sup>
	% variação	-9,5 $\pm$ 21,8	-2,5 $\pm$ 37,6	p = 0,312 <sup>a</sup>
Triglicérides	Basal	136 $\pm$ 54	130 $\pm$ 38	p = 0,925 <sup>a</sup>
	Atorvastatina	116 $\pm$ 36	126 $\pm$ 41	p = 0,464 <sup>a</sup>
	% variação	-9,5 $\pm$ 21,8	-2,53 $\pm$ 37,6	p = 0,312 <sup>a</sup>
Apo AI	Basal	135 $\pm$ 20	124 $\pm$ 21	p = 0,123 <sup>a</sup>
	Atorvastatina	140 $\pm$ 20	123 $\pm$ 23	p = 0,021 <sup>a</sup>
	% variação	-3,0 $\pm$ 10,5	3,6 $\pm$ 24,9	p = 0,571 <sup>a</sup>
Apo B	Basal	139 $\pm$ 21	149 $\pm$ 28	p = 0,322 <sup>a</sup>
	Atorvastatina	97 $\pm$ 16	108 $\pm$ 24	p = 0,155 <sup>a</sup>
	% variação	-47,7 $\pm$ 28,8	-38,9 $\pm$ 24,5	p = 0,452 <sup>a</sup>

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média  $\pm$  DP dos dados. Os resultados foram comparados por Teste-T<sup>(a)</sup>. O sinal (-) indica redução. Apo AI, Apolipoproteína AI; Apo B, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

O alelo *CYP3A5\*6* foi encontrado em frequência baixa e em heterozigose (genótipo *\*1A/\*6*). Quando se avaliou a sua relação com o perfil lipídico sérico, observou-se que os indivíduos portadores do alelo *\*6* apresentavam perfil lipídico basal e apolipoproteínas similares aos portadores do genótipo não-*\*6* (*\*1A/\*1A*) ( $p > 0,05$ ). Esses resultados foram observados nos grupos NL total (brancos e negros) (**Tabela 21**), HC total (**Tabela 22**), e HC negros (**Tabela 23**). Também não foram observadas diferenças de resposta a atorvastatina entre portadores e não portadores do alelo *CYP3A5\*6*, independentemente da etnia (**Tabelas 22 e 23**). Esses resultados são sugestivos de que o alelo *CYP3A5\*6* não está associado com a resposta a atorvastatina.

Tabela 21. Efeito do SNP *CYP3A5\*6* no perfil lipídico sérico de indivíduos normolipidêmicos (brancos e negros)

Variável (mg/dL)	<i>*1A/*6</i> (7)	Não- <i>*6</i> (92)	
CT	184 ± 12	173 ± 18	$p = 0,107^a$
LDL-c	110 ± 11	99 ± 17	$p = 0,112^a$
HDL-c	52 ± 9	56 ± 13	$p = 0,453^a$
VLDL-c	23 ± 7	18 ± 6	$p = 0,063^a$
Triglicérides	114 ± 34	89 ± 32	$p = 0,063^a$
Apo AI	139 ± 21	144 ± 14	$p = 0,798^a$
Apo B	83 ± 17	74 ± 14	$p = 0,201^a$

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Os resultados foram comparados por Teste-T<sup>(a)</sup>. Apo AI, apolipoproteína A I; Apo B, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Tabela 22. Efeito do SNP CYP3A5\*6 no perfil lipídico sérico de indivíduos hipercolesterolêmicos (brancos e negros)

Variável (mg/dL)		*1A/*6 (6)	Não-*6 (131)	
CT	<i>Basal</i>	276 ± 47	281 ± 38	$p = 0,678^a$
	<i>Atorvastatina</i>	196 ± 28	199 ± 32	$p = 0,894^a$
	<i>% variação</i>	-27,7 ± 12,8	-29,0 ± 31,9	$p = 0,731^a$
LDL-c	<i>Basal</i>	188 ± 46	193 ± 35	$p = 0,585^a$
	<i>Atorvastatina</i>	116 ± 31	118 ± 28	$p = 0,881^a$
	<i>% variação</i>	-36,7 ± 15,6	-38,5 ± 12,3	$p = 0,791^a$
HDL-c	<i>Basal</i>	64 ± 10	56 ± 14	$p = 0,113^a$
	<i>Atorvastatina</i>	61 ± 12	54 ± 13	$p = 0,159^a$
	<i>% variação</i>	-5,3 ± 7,8	-2,6 ± 11,6	$p = 0,733^a$
VLDL-c	<i>Basal</i>	24 ± 12	32 ± 13	$p = 0,091^a$
	<i>Atorvastatina</i>	19 ± 4	27 ± 11	$p = 0,080^a$
	<i>% variação</i>	-10,7 ± 33,5	-11,9 ± 27,2	$p = 0,966^a$
Triglicérides	<i>Basal</i>	120 ± 58	160 ± 64	$p = 0,091^a$
	<i>Atorvastatina</i>	96 ± 22	134 ± 53	$p = 0,080^a$
	<i>% variação</i>	-10,7 ± 33,5	-11,9 ± 27,2	$p = 0,966^a$
Apo AI	<i>Basal</i>	142 ± 20	130 ± 26	$p = 0,263^a$
	<i>Atorvastatina</i>	139 ± 18	133 ± 26	$p = 0,501^a$
	<i>% variação</i>	2,2 ± 13,2	-1,8 ± 13,9	$p = 0,568^a$
Apo B	<i>Basal</i>	134 ± 24	141 ± 22	$p = 0,515^a$
	<i>Atorvastatina</i>	93 ± 14	100 ± 20	$p = 0,506^a$
	<i>% variação</i>	-51,0 ± 31,2	-44,8 ± 26,6	$p = 0,671^a$

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Os resultados foram comparados por Teste-t de Student<sup>(a)</sup>. O sinal (-) indica redução.

Apo AI, Apolipoproteína AI; Apo B, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Tabela 23. Efeito do SNP *CYP3A5*\*6 no perfil lipídico sérico de indivíduos hipercolesterolêmicos negros

Variável (mg/dL)		*1A/*6 (6)	Não-*6 (38)	
CT	Basal	276 ± 47	283 ± 39	$p = 0,668^a$
	Atorvastatina	196 ± 28	205 ± 31	$p = 0,524^a$
	% variação	-27,7 ± 12,8	-27,1 ± 10,8	$p = 0,902^a$
LDL-c	Basal	188 ± 46	196 ± 34	$p = 0,356^b$
	Atorvastatina	116 ± 31	122 ± 24	$p = 0,617^a$
	% variação	-36,7 ± 15,6	-36,9 ± 13,4	$p = 0,973^a$
HDL-c	Basal	64 ± 10	59 ± 13	$p = 0,166^b$
	Atorvastatina	61 ± 12	58 ± 13	$p = 0,466^b$
	% variação	-5,3 ± 7,8	-3,4 ± 12,4	$p = 0,351^a$
VLDL-c	Basal	24 ± 12	27 ± 10	$p = 0,091^b$
	Atorvastatina	19 ± 4	24 ± 7	$p = 0,080^a$
	% variação	-10,7 ± 33,5	-5,6 ± 25,6	$p = 0,664^a$
Triglicérides	Basal	120 ± 58	135 ± 48	$p = 0,519^a$
	Atorvastatina	96 ± 22	121 ± 37	$p = 0,114^a$
	% variação	-10,7 ± 33,5	-5,6 ± 25,6	$p = 0,664^a$
Apo AI	Basal	142 ± 20	132 ± 20	$p = 0,269^a$
	Atorvastatina	139 ± 18	136 ± 22	$p = 0,738^a$
	% variação	2,2 ± 13,2	-2,2 ± 15,1	$p = 0,510^a$
Apo B	Basal	134 ± 24	142 ± 22	$p = 0,430^a$
	Atorvastatina	93 ± 14	100 ± 18	$p = 0,388^a$
	% variação	-51,0 ± 31,2	-45,2 ± 27,9	$p = 0,721^b$

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Os resultados foram comparados por Teste-T de Student<sup>(a)</sup> ou *Mann Whitney Rank Sum Test*<sup>(b)</sup>. O sinal (-) indica redução. Apo AI, Apolipoproteína AI; Apo B, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Para analisar a relação entre o SNP *CYP3A5*\*1D e a variação do perfil lipídico após tratamento com atorvastatina, os indivíduos portadores de genótipos \*1A/\*1A e \*1A/\*1D (CC + CT) foram agrupados, constituindo o grupo genotípico não-\*1D/\*1D e os resultados foram comparados com os portadores do genótipo \*1D/\*1D (TT). Devido às diferenças nas frequências alélicas e genotípicas encontradas entre as etnias, as associações entre o SNP *CYP3A5*\*1D e o perfil lipídico foram avaliadas separadamente para brancos e negros.

No grupo NL (**Tabela 24**), verificou-se que os portadores do genótipo *\*1D/\*1D* de etnia negra tem colesterol total basal discretamente mais alto que os não portadores ( $p=0,046$ ). No grupo HC, indivíduos portadores do alelo *CYP3A5\*1D* apresentam perfil lipídico basal e apolipoproteínas similares aos indivíduos não-*\*1D/\*1D* ( $p > 0,05$ ), tanto nos de etnia branca (**Tabela 25**) quanto negra (**Tabela 26**). Esses resultados sugerem que o SNP *CYP3A5\*1D* não está relacionado com variação no perfil lipídico basal de indivíduos hipercolesterolêmicos.

Após o tratamento com atorvastatina, observou-se que indivíduos brancos com genótipo *\*1D/\*1D* tiveram menor redução de colesterol total (27,9%), LDL-c (36,8%) e HDL-c (1,9%) que os indivíduos não-*\*1D/\*1D* (CT: 33,1%; LDL-c: 42,9%; e HDL-c: 7,1%;  $p<0,05$ ) (**Tabela 25, Figura 17**). Esses resultados são sugestivos de que o alelo *CYP3A5\*1D* está associado com menor resposta a atorvastatina em indivíduos de etnia branca.

Tabela 24. Efeito do SNP *CYP3A5\*1D* no perfil lipídico sérico de indivíduos normolipidêmicos brancos, negros e pardos

Variável (mg/dL)	<i>Não-*1D/*1D</i>	<i>*1D/*1D</i>	
<b>Branços</b>	<b>(17)</b>	<b>(47)</b>	
CT	173 ± 17	172 ± 17	$p = 0,794^a$
LDL-c	98 ± 19	100 ± 16	$p = 0,569^b$
HDL-c	56 ± 11	55 ± 12	$p = 0,687^b$
VLDL-c	20 ± 6	17 ± 6	$p = 0,063^a$
Triglicérides	100 ± 28	84 ± 29	$p = 0,063^a$
Apo AI	142 ± 21	141 ± 29	$p = 0,939^a$
Apo B	80 ± 13	80 ± 19	$p = 0,717^a$
<b>Negros</b>	<b>(28)</b>	<b>(6)</b>	
CT	174 ± 18	190 ± 12	$p = 0,046^a$
LDL-c	100 ± 16	106 ± 16	$p = 0,399^a$
HDL-c	57 ± 12	68 ± 18	$p = 0,081^a$
VLDL-c	17 ± 6	16 ± 6	$p = 0,723^a$
Triglicérides	86 ± 28	82 ± 29	$p = 0,723^a$
Apo AI	145 ± 32	160 ± 35	$p = 0,313^a$
Apo B	74 ± 18	84 ± 24	$p = 0,276^a$

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Os resultados foram comparados por Teste-t de Student<sup>(a)</sup> ou *Mann Whitney Rank Sum Test*<sup>(b)</sup>. Apo AI, Apolipoproteína AI; Apo B, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Tabela 25. Efeito do SNP *CYP3A5\*1D* no perfil lipídico sérico de indivíduos hipercolesterolêmicos brancos

Variável (mg/dL)		Não- <i>*1D/*1D</i> (26)	<i>*1D/*1D</i> (66)	
CT	Basal	274 ± 39	282 ± 39	$p = 0,282^b$
	Atorvastatina	183 ± 33	202 ± 30	$p = 0,010^a$
	% variação	-33,1 ± 7,1	-27,9 ± 9,2	$p = 0,010^a$
LDL-c	Basal	188 ± 34	193 ± 37	$p = 0,748^b$
	Atorvastatina	108 ± 28	121 ± 29	$p = 0,043^a$
	% variação	-42,9 ± 8,4	-36,8 ± 12,7	$p = 0,029^a$
HDL-c	Basal	54 ± 12	54 ± 15	$p = 0,649^b$
	Atorvastatina	50 ± 11	52 ± 13	$p = 0,755^b$
	% variação	-7,1 ± 11,4	-1,9 ± 10,4	$p = 0,040^a$
VLDL-c	Basal	32 ± 13	35 ± 14	$p = 0,422^b$
	Atorvastatina	25 ± 10	29 ± 12	$p = 0,171^b$
	% variação	-19,4 ± 19,7	-13,07 ± 30,2	$p = 0,624^b$
Triglicérides	Basal	162 ± 67	174 ± 70	$p = 0,422^b$
	Atorvastatina	126 ± 50	144 ± 60	$p = 0,171^b$
	% variação	-19,4 ± 19,7	-13,07 ± 30,2	$p = 0,624^b$
Apo AI	Basal	132 ± 25	129 ± 29	$p = 0,675^a$
	Atorvastatina	131 ± 27	135 ± 29	$p = 0,738^b$
	% variação	-1,0 ± 11,8	2,3 ± 14,2	$p = 0,327^a$
Apo B	Basal	137 ± 27	142 ± 21	$p = 0,349^a$
	Atorvastatina	95 ± 22	102 ± 19	$p = 0,112^a$
	% variação	-50,5 ± 28,9	-41,2 ± 24,2	$p = 0,138^a$

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Os resultados foram comparados por Teste-t de Student<sup>(a)</sup> ou Mann Whitney Rank Sum Test<sup>(b)</sup>. O sinal (-) indica redução.

Apo AI, Apolipoproteína AI; Apo B, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

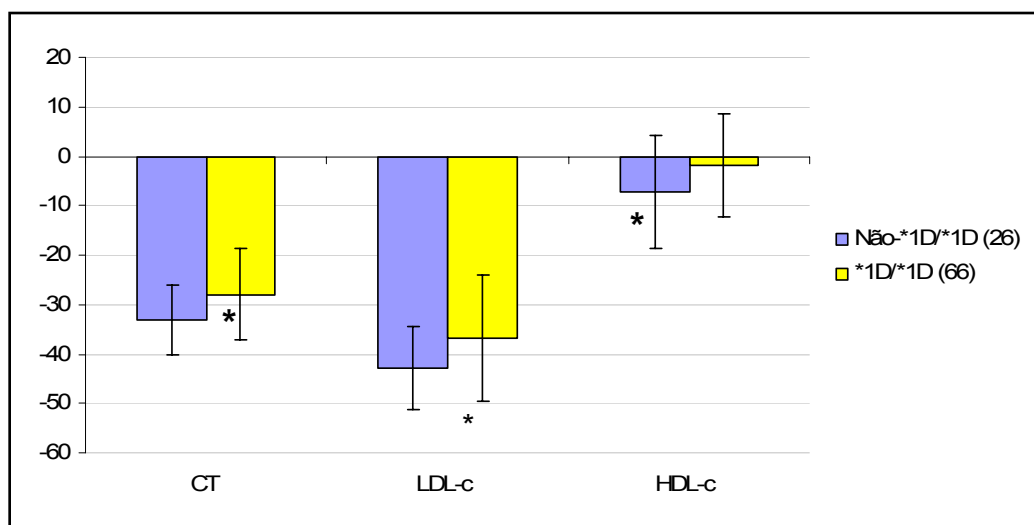


Figura 17. Percentual de variação do perfil lipídico dos indivíduos HC brancos (n=93), agrupados por genótipo do SNP *CYP3A5\*1D*, após o tratamento com atorvastatina (10mg/dia/4 semanas). Valores expressos como média ± DP da variação percentual. CT, colesterol total; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade.

Tabela 26. Efeito do SNP *CYP3A5\*1D* no perfil lipídico sérico de indivíduos hipercolesterolêmicos negros

Variável (mg/dL)		Não- <i>*1D/*1D</i> (33)	<i>*1D/*1D</i> (15)	
CT	<i>Basal</i>	284 ± 40	280 ± 34	$p = 0,777^a$
	<i>Atorvastatina</i>	205 ± 31	199 ± 27	$p = 0,547^a$
	% <i>variação</i>	-27,2 ± 11,0	-28,4 ± 10,9	$p = 0,625^b$
LDL-c	<i>Basal</i>	196 ± 38	191 ± 30	$p = 0,947^b$
	<i>Atorvastatina</i>	122 ± 26	115 ± 23	$p = 0,330^a$
	% <i>variação</i>	-36,3 ± 14,1	-369,4 ± 12,0	$p = 0,467^a$
HDL-c	<i>Basal</i>	62 ± 14	58 ± 14	$p = 0,391^b$
	<i>Atorvastatina</i>	60 ± 14	57 ± 11	$p = 0,555^b$
	% <i>variação</i>	-3,2 ± 9,3	1,1 ± 16,6	$p = 0,263^b$
VLDL-c	<i>Basal</i>	26 ± 10	28 ± 11	$p = 0,697^b$
	<i>Atorvastatina</i>	23 ± 6	26 ± 10	$p = 0,410^b$
	% <i>variação</i>	-9,3 ± 21,9	-1,9 ± 32,2	$p = 0,357^a$
Triglicérides	<i>Basal</i>	132 ± 50	142 ± 57	$p = 0,697^b$
	<i>Atorvastatina</i>	114 ± 32	132 ± 48	$p = 0,410^b$
	% <i>variação</i>	-9,3 ± 21,9	-1,9 ± 32,2	$p = 0,357^a$
Apo AI	<i>Basal</i>	141 ± 26	128 ± 25	$p = 0,143^a$
	<i>Atorvastatina</i>	144 ± 26	128 ± 20	$p = 0,029^a$
	% <i>variação</i>	1,5 ± 11,4	-0,4 ± 22,5	$p = 0,722^a$
Apo B	<i>Basal</i>	144 ± 25	157 ± 44	$p = 0,244^a$
	<i>Atorvastatina</i>	99 ± 19	104 ± 14	$p = 0,413^a$
	% <i>variação</i>	-50,3 ± 32,3	-41,3 ± 23,6	$p = 0,404^a$

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Os resultados foram comparados por Teste-t de Student <sup>(a)</sup> ou Mann Whitney Rank Sum Test <sup>(b)</sup>. O sinal (-) indica redução.

Apo AI, Apolipoproteína AI; Apo B, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Finalmente, foi feita uma análise do perfil lipídico em relação ao haplótipo *\*3A/\*3A*, formado pela associação dos genótipos *\*3C/\*3C* + *\*1D/\*1D*. Para esta análise, os indivíduos portadores do haplótipo *\*3A/\*3A* foram comparados com os portadores do haplótipo não-*\*3A/\*3A*. Devido às diferenças nas frequências genóticas encontradas entre as etnias, as associações entre os grupos haplotípicos e o perfil lipídico foram avaliadas separadamente para brancos e negros.

No grupo NL (Tabela 27), os portadores do haplótipo *\*3A/\*3A* apresentaram menores valores basais de VLDL-c e triglicérides que os com



haplótipo não \*3A/\*3A. Esse resultado foi observado nos indivíduos de etnia branca ( $p = 0,031$ ), mas não em indivíduos de etnia negra. Por outro lado, no grupo HC não foi observada associação do haplótipo \*3A/\*3A e o perfil sérico basal, independentemente da etnia (**Tabelas 28 e 29**).

Tabela 27. Efeito do haplótipo dos SNP *CYP3A5\*3C* e *CYP3A5\*1D* no perfil lipídico sérico de indivíduos normolipidêmicos brancos, negros e pardos

Variável (mg/dL)	não *3A/*3A	*3A/*3A	
<b>Branco</b>	<b>(19)</b>	<b>(45)</b>	
CT	172 ± 17	173 ± 17	$p = 0,786^a$
LDL-c	97 ± 19	101 ± 16	$p = 0,373^a$
HDL-c	55 ± 11	55 ± 12	$p = 0,994^b$
VLDL-c	20 ± 6	17 ± 6	$p = 0,031^a$
Triglicérides	100 ± 29	83 ± 28	$p = 0,031^a$
Apo AI	137 ± 26	143 ± 28	$p = 0,400^a$
Apo B	80 ± 13	80 ± 19	$p = 0,658^b$
<b>Negro</b>	<b>(31)</b>	<b>(3)</b>	
CT	175 ± 18	192 ± 5	$p = 0,128^a$
LDL-c	101 ± 16	104 ± 14	$p = 0,746^a$
HDL-c	57 ± 13	72 ± 17	$p = 0,085^a$
VLDL-c	17 ± 6	16 ± 5	$p = 0,804^a$
Triglicérides	86 ± 29	82 ± 24	$p = 0,804^a$
Apo AI	146 ± 32	166 ± 33	$p = 0,323^a$
Apo B	76 ± 19	74 ± 16	$p = 0,871^a$

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Os resultados foram comparados por Teste-t de Student<sup>(a)</sup> ou Mann Whitney Rank Sum Test<sup>(b)</sup>. Apo AI, Apolipoproteína AI; Apo B, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Já a análise do perfil lipídico sérico após o tratamento com atorvastatina, revelou que indivíduos HC brancos com haplótipo \*3A/\*3A tiveram menor redução menor de colesterol total (27,6%), LDL-c (36,7%) e HDL-c (1,3%) que os indivíduos não-\*3A/\*3A (CT: 33,1%; LDL-c: 42,5%; HDL-c: 7,8%;  $p < 0,05$ ) (**Tabela 28, Figura 18**). Além disso, os valores de VLDL-c e triglicérides após o tratamento com atorvastatina dos indivíduos \*3A/\*3A

apresentaram-se mais elevados (VLDL-c: 29 mg/dL; TG: 146 mg/dL) que nos indivíduos não-\*3A/\*3A (VLDL-c: 25 mg/dL; TG: 123 mg/dL;  $p < 0,05$ ). Esses resultados sugerem que o haplótipo CYP3A5\*3A/\*3A está associado com menor resposta a atorvastatina em indivíduos de etnia branca.

Os indivíduos HC de etnia negra portadores do haplótipo não-\*3A/\*3A tiveram aumento de HDL-c ( $p = 0,020$ ) quando comparados com os portadores de haplótipo \*3A/\*3A. Esses resultados devem ser analisados com cautela, pois podem ser resultado da baixa frequência do haplótipo \*3A/\*3A na etnia negra.

Tabela 28. Efeito do haplótipo dos SNP CYP3A5\*3C e CYP3A5\*1D no perfil lipídico sérico de indivíduos hipercolesterolêmicos brancos

Variável (mg/dL)		não *3A/*3A (30)	*3A/*3A (62)	
CT	Basal	278 ± 40	281 ± 38	$p = 0,497^b$
	Atorvastatina	186 ± 33	202 ± 30	$p = 0,018^a$
	% variação	-33,1 ± 6,9	-27,6 ± 9,3	$p = 0,005^a$
LDL-c	Basal	190 ± 35	192 ± 36	$p = 0,960^b$
	Atorvastatina	109 ± 28	121 ± 24	$p = 0,070^a$
	% variação	-42,5 ± 8,3	-36,7 ± 13,0	$p = 0,028^a$
HDL-c	Basal	56 ± 13	53 ± 14	$p = 0,268^b$
	Atorvastatina	51 ± 12	52 ± 13	$p = 0,950^b$
	% variação	-7,8 ± 11,4	-1,3 ± 10,1	$p = 0,006^a$
VLDL-c	Basal	32 ± 13	35 ± 14	$p = 0,250^a$
	Atorvastatina	25 ± 10	29 ± 12	$p = 0,049^b$
	% variação	-20,0 ± 18,7	-12,4 ± 31,0	$p = 0,568^b$
Triglicérides	Basal	159 ± 64	176 ± 71	$p = 0,250^a$
	Atorvastatina	123 ± 48	146 ± 60	$p = 0,049^b$
	% variação	-20,0 ± 18,7	-12,4 ± 31,0	$p = 0,568^b$
Apo AI	Basal	131 ± 24	130 ± 30	$p = 0,843^a$
	Atorvastatina	132 ± 28	135 ± 29	$p = 0,887^b$
	% variação	-0,1 ± 11,6	2,7 ± 14,1	$p = 0,339^a$
Apo B	Basal	139 ± 27	142 ± 21	$p = 0,539^a$
	Atorvastatina	95 ± 21	102 ± 19	$p = 0,093^a$
	% variação	-49,8 ± 25,6	-41,2 ± 24,5	$p = 0,127^a$

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Os resultados foram comparados por Teste-t de Student<sup>(a)</sup> ou Mann Whitney Rank Sum Test<sup>(b)</sup>. O sinal (-) indica redução.

Apo AI, Apolipoproteína AI; Apo B, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

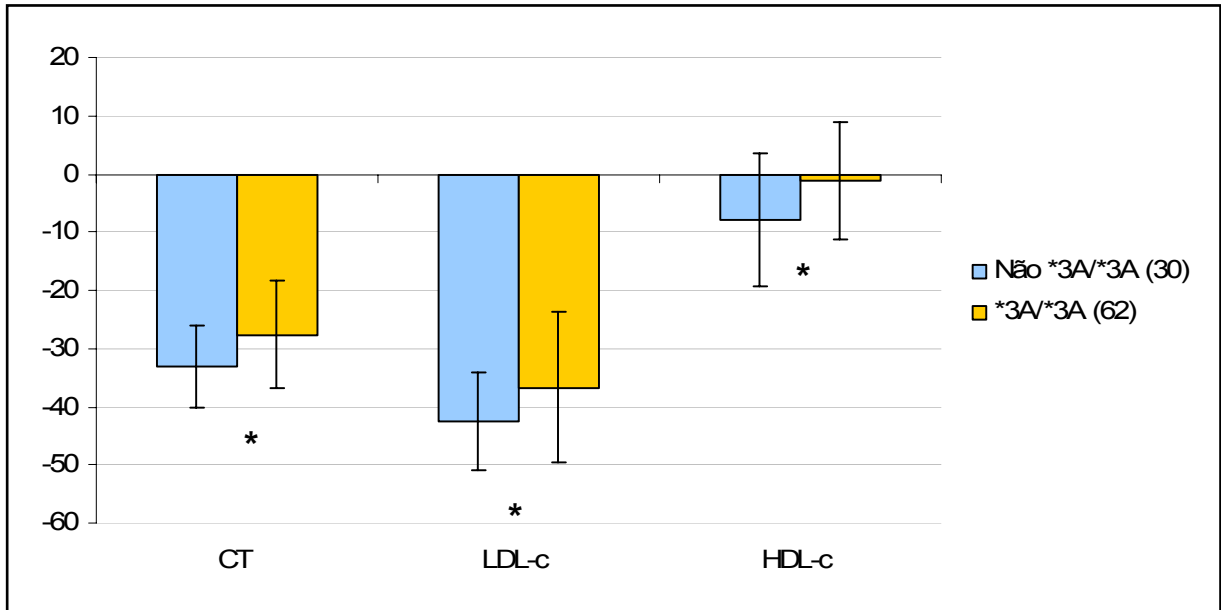


Figura 18. Percentual de variação do perfil lipídico sérico dos indivíduos HC brancos (n=92), agrupados por haplótipo dos SNPs CYP3A5\*3C e CYP3A5\*1D, após o tratamento com atorvastatina (10mg/dia/4 semanas). Valores expressos como média  $\pm$  DP. CT, colesterol total; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade.

Tabela 29. Efeito do haplótipo dos SNP CYP3A5\*3C e CYP3A5\*1D no perfil lipídico sérico de indivíduos hipercolesterolêmicos negros

Variável (mg/dL)		não *3A/*3A (38)	*3A/*3A (9)	
CT	Basal	286 $\pm$ 31	276 $\pm$ 47	$p = 0,310^a$
	Atorvastatina	206 $\pm$ 31	196 $\pm$ 25	$p = 0,398^a$
	% variação	-27,3 $\pm$ 10,5	-26,8 $\pm$ 11,8	$p = 0,897^a$
LDL-c	Basal	196 $\pm$ 36	190 $\pm$ 40	$p = 0,482^b$
	Atorvastatina	122 $\pm$ 26	115 $\pm$ 21	$p = 0,423^a$
	% variação	-37,0 $\pm$ 13,8	-37,7 $\pm$ 11,0	$p = 0,822^a$
HDL-c	Basal	62 $\pm$ 14	53 $\pm$ 15	$p = 0,185^b$
	Atorvastatina	60 $\pm$ 14	52 $\pm$ 13	$p = 0,317^b$
	% variação	-2,7 $\pm$ 9,3	4,0 $\pm$ 18,9	$p = 0,130^a$
VLDL-c	Basal	27 $\pm$ 11	34 $\pm$ 14	$p = 0,735^b$
	Atorvastatina	23 $\pm$ 7	25 $\pm$ 8	$p = 0,656^a$
	% variação	-9,5 $\pm$ 21,2	-9,7 $\pm$ 32,2	$p = 0,394^a$
Triglicérides	Basal	136 $\pm$ 53	168 $\pm$ 70	$p = 0,735^b$
	Atorvastatina	117 $\pm$ 36	123 $\pm$ 42	$p = 0,656^a$
	% variação	-9,5 $\pm$ 21,2	-9,7 $\pm$ 32,2	$p = 0,394^a$
Apo AI	Basal	139 $\pm$ 21	128 $\pm$ 31	$p = 0,207^b$
	Atorvastatina	145 $\pm$ 26	122 $\pm$ 22	$p = 0,020^a$
	% variação	3,4 $\pm$ 10,3	2,1 $\pm$ 15,8	$p = 0,475^b$
Apo B	Basal	142 $\pm$ 25	159 $\pm$ 53	$p = 0,168^a$
	Atorvastatina	103 $\pm$ 24	102 $\pm$ 18	$p = 0,935^a$
	% variação	-43,6 $\pm$ 32,4	-40,2 $\pm$ 25,3	$p = 0,736^b$

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média  $\pm$  DP dos dados. Os resultados foram comparados por Teste-t de Student <sup>(a)</sup> ou Mann Whitney Rank Sum Test <sup>(b)</sup>. O sinal (-) indica redução.

Apo AI, Apolipoproteína AI; Apo B, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

#### 4.4 Estudo do efeito da atorvastatina sobre a expressão do RNAm de CYP3A5

As análises da expressão de RNAm do CYP3A5 em CMSP foram realizadas por PCR em Tempo Real. Os iniciadores da reação foram cuidadosamente estudados a fim de evitar a amplificação não intencional do CYP3A4, devido à similaridade de ambas as seqüências de RNAm.

Os resultados de expressão de RNAm do CYP3A5 em HC, antes e após o tratamento com atorvastatina, foram calculados utilizando-se a fórmula:  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ calibrador})}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Como calibrador para todas as análises, utilizou-se a linhagem celular derivada de enterócitos Caco2.

A variação inter-ensaio do PCR em tempo real foi analisada com o uso do cDNA de Caco2 como controle em todos os ensaios realizados (n=56). Os coeficientes de variação (CV) inter-ensaio do *Cycle threshold* (Ct) foram 1,84% para o CYP3A5 e 3,96% para o GAPD, enquanto que o CV inter-ensaio para o delta Ct ( $\Delta Ct$ ) foi de 8,37% (Tabela 30).

Tabela 30. Valores de expressão de RNAm de CYP3A5 e GAPD na linhagem celular Caco2.

	$Ct^{CYP3A5}$	$Ct^{GAPD}$	$\Delta Ct = Ct^{CYP3A5} - Ct^{GAPD}$
<b>Caco2 (56)</b>	31,16 ± 0,57	19,84 ± 0,79	11,32 ± 0,95
<b>CV inter-ensaio</b>	1,84%	3,96%	8,37%

Nota: Número de amostras em parênteses. Valores são apresentados como media ± DP.

A expressão do RNAm do CYP3A5 em CMSP foi avaliada no grupo total de HC, utilizando-se a expressão em Caco2 como calibrador. Foram

comparados os valores de expressão entre genótipos, antes (basal) e após o tratamento com atorvastatina.

Ao analisar os indivíduos HC separadamente de acordo com a etnia, não se observou diferenças de expressão para indivíduos de mesmo genótipo com etnias diferentes ( $p > 0,05$ , dados não mostrados). Por isso, o grupo HC foi analisado em sua totalidade.

Como é possível observar, na **tabela 31**, a expressão basal de RNAm do *CYP3A5* é menor nos portadores do alelo \*3C (genótipos \*3C/\*3C e \*1A/\*3C) e de haplótipo \*3A/\*3A ( $p < 0,05$ ). Após o tratamento, não se observam diferenças de expressão entre os genótipos e haplótipos do *CYP3A5* ( $p > 0,05$ ). Entretanto, ao avaliar as diferenças de expressão antes e após o tratamento, verificou-se que os portadores do alelo \*3C (**Figura 19**) e de haplótipo \*3A/\*3A (**Figura 20**) têm aumento significativo da expressão de *CYP3A5* em CMSP ( $p < 0,05$ ).

Esses resultados são sugestivos de que o efeito da atorvastatina sobre a expressão do RNAm do *CYP3A5* está associado com a presença do alelo *CYP3A5*\*3C.

Tabela 31. Valores de expressão de RNAm em CMSP em hipercolesterolêmicos em relação ao calibrador.

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ( $\Delta Ct^{Basal} - \Delta Ct^{Caco2}$ )	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ( $\Delta Ct^{Atorva} - \Delta Ct^{Caco2}$ )	
<b>Total (138)</b>	0,483 ± 1,196	1,090 ± 3,168	$p=0,002^c$
<b>SNP CYP3A5*3C</b>			
*1A/*1A (13)	1,492 ± 3,429 <sup>(1)</sup>	1,324 ± 2,894	$p=0,415^d$
*1A/*3C (52)	0,457 ± 0,798	1,735 ± 4,784	$p=0,015^d$
*3C/*3C (73)	0,320 ± 0,282	0,574 ± 0,888	$p=0,017^d$
	$p=0,004^a$	$p=0,374^a$	
<b>Haplótipos CYP3A5*3A</b>			
*1A/*1A (11)	0,558 ± 0,357 <sup>(1)</sup>	0,528 ± 0,421	$p=0,850^d$
Não-*1A/*1A e *3A/*3A (53)	0,457 ± 0,790	1,204 ± 3,102	$p=0,012^c$
*3A/*3A (69)	0,312 ± 0,281	0,573 ± 0,910	$p=0,027^c$
	$p=0,013^b$	$p=0,558^a$	

Nota: Número de indivíduos entre parênteses. Resultados expressos como média ± DP. Grupos genotípicos ou haplotípicos comparados através de One Way ANOVA <sup>(a)</sup> ou *Kruskal-Wallis Analysis of Variance on Ranks* <sup>(b)</sup>. <sup>(1)</sup> Comparação dos 3 grupos por *Dunn's Method* mostra que este grupo é diferente dos outros dois. Expressão basal versus expressão após atorvastatina (10mg/dia/4 semanas) comparada através de *Wilcoxon Signed Rank Test* <sup>(c)</sup> ou Teste-t pareado <sup>(d)</sup>. Calibrador: Linhagem celular derivada de enterócitos humanos, Caco2. n=56,  $\Delta Ct$  médio = (Ct CYP3A5 – Ct GAPDH) = 11,315 ± 0,948.

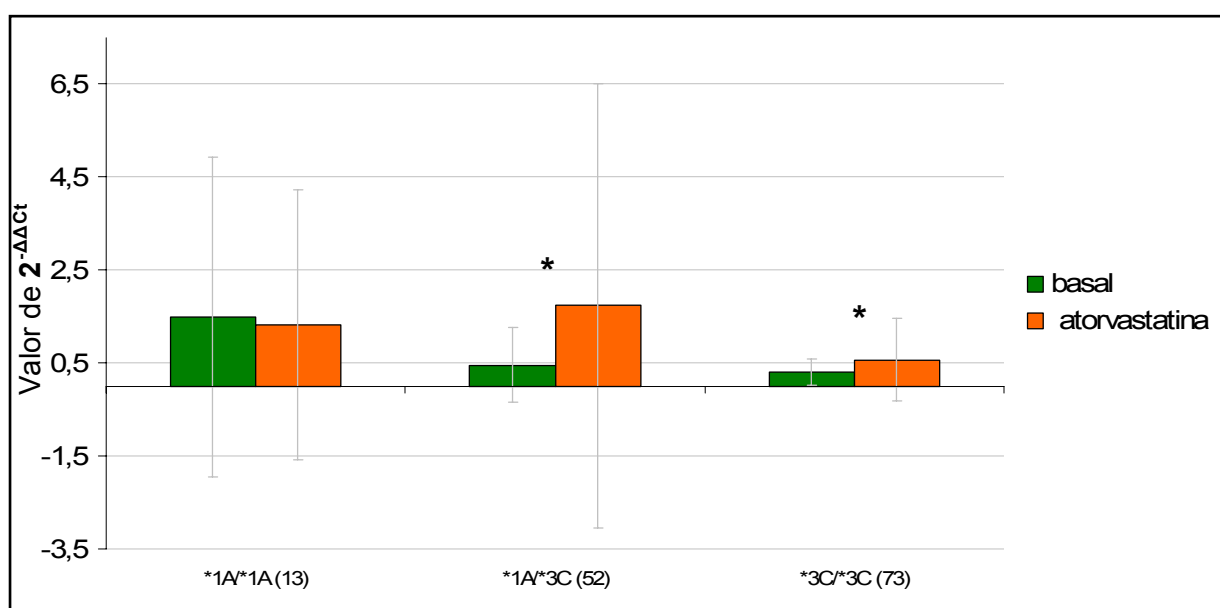


Figura 19. Valores de expressão de RNAm em CMSP em HC agrupados de acordo com o genótipo do SNP CYP3A5\*3C.

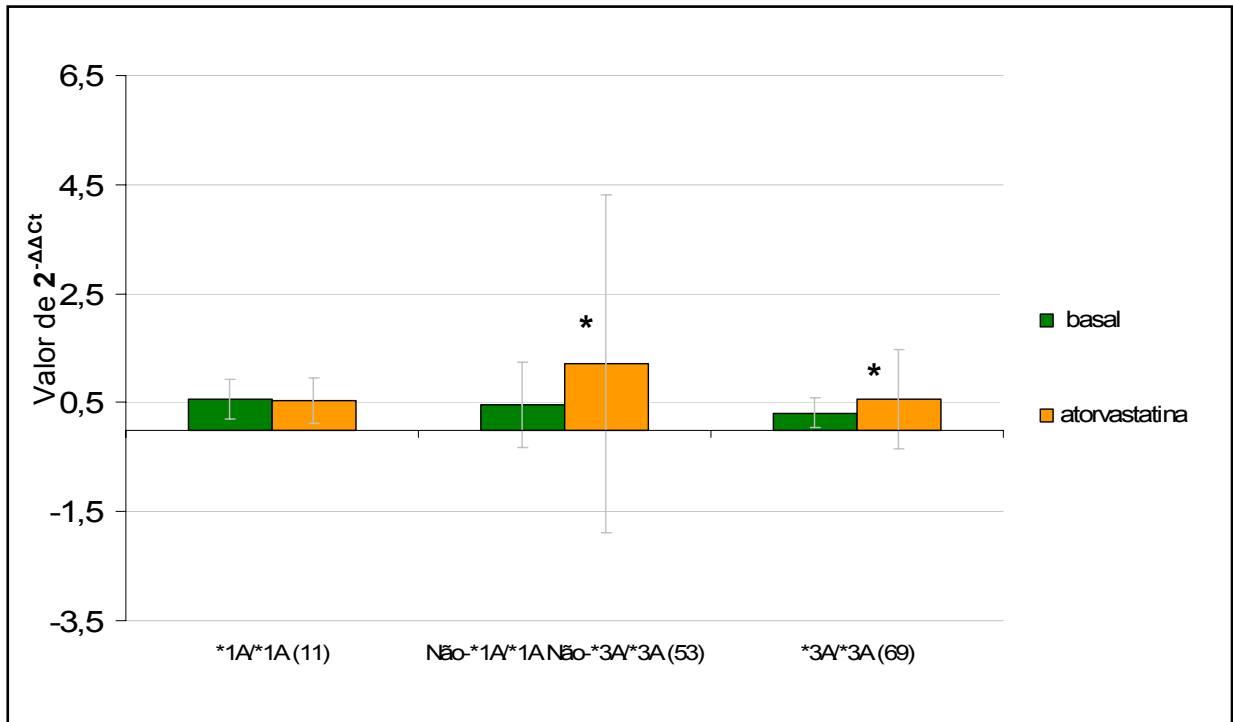


Figura 20. Valores de expressão de RNAm em CMSP em HC agrupados de acordo com o haplótipo CYP3A5\*3A.

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo, as frequências de alelos *CYP3A5\*3C*, *CYP3A5\*6* e *CYP3A5\*1D* foram similares entre normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos, e entre mulheres e homens. Por outro lado, foram encontradas diferenças nas frequências desses alelos entre indivíduos de etnia branca e negra.

As frequências de alelos dos SNPs *CYP3A5* variam acentuadamente entre as diferentes populações estudadas até hoje (XIE; WOOD; KIM, 2004). O alelo *CYP3A5\*3C* é o mais comum em caucasianos e foi sugerido que é de origem ancestral (LEE; GOLDSTEIN, 2005).

Nos indivíduos brancos deste estudo, a frequência do alelo *CYP3A5\*3C* (85,4%) foi menor que a encontrada em uma população de 107 hipercolesterolêmicos do sul do Brasil (91,9%;  $\chi^2 = 20,35,1$  df,  $p < 0,001$ ) (FIEGENBAUM *et al.*, 2005c) e em outras populações caucasianas (92 a 94%,  $\chi^2 = 31,02$ , 1 df,  $p < 0,001$ ) (XIE; WOOD; KIM, 2004; KUEHL *et al.*, 2001; WILKE; MOORE; BURMESTER, 2005; VAN SCHAİK *et al.*, 2002; GERVASINI *et al.*, 2005). A frequência do alelo *CYP3A5\*3C* nos negros deste estudo (54,3%) é maior que a descrita em outras populações afro-descendentes (32,2%,  $\chi^2 = 10,57$ ,  $p = 0,001$ ; (XIE; WOOD; KIM, 2004).

Observamos que o alelo *CYP3A5\*6* é mais freqüente em negros (7%) que em brancos (0,6%). Esses resultados são similares aos observados em outros grupos populacionais negros (8,6 a 15,2%) e brancos (-3,4 a 4,3%) (XIE; WOOD; DKIM, 2004,  $p > 0,05$ ). Este valor de média negativo é proveniente da média ponderada de todos os trabalhos publicados até 2004 e constantes na revisão de Xie e colaboradores, 2004.



A freqüência do alelo *CYP3A5\*1D* em brancos deste estudo é de 82,7%, e está abaixo da média descrita na literatura para europeus caucasianos (92 a 96%; ( $\chi^2 = 23,71$ , 1 df,  $p < 0,001$ ) (HUSTERT; HABERL; BURK, 2001; XIE; WOOD; KIM, 2004). Já o alelo *CYP3A5\*1D* está presente na população de negros deste estudo com freqüência de 51,2%, e está em concordância com a freqüência descrita na literatura para este grupo étnico (26 a 54%,  $\chi^2 = 3,63$ , 1 df,  $p = 0,112$ ) (LEE *et al.*, 2003; XIE; WOOD; KIM, 2004).

Os achados deste estudo refletem, portanto, a alta miscigenação étnica de nossa população (GATTAS *et al.*, 2004). É possível que a inclusão de indivíduos pardos no grupo de negros, a baixa proporção de negros (34%) neste estudo e o critério usado para definir a etnia (o próprio indivíduo define a sua etnia) tenham contribuído para as diferenças de freqüências alélicas. Além disso, a reduzida casuística de negros faz com que o poder dos testes estatísticos esteja abaixo dos valores desejáveis.

Diferenças nos perfis lipídicos séricos basais entre brancos e negros hipercolesterolêmicos ou normolipidêmicos não foram associadas às variantes estudadas. A ausência de relação do alelo *CYP3A5\*3C* com valores de lipídeos séricos basais também foi descrita em outras populações (KIVISTO *et al.*, 2004; FIEGENBAUM *et al.*, 2005c). Esses resultados são sugestivos de que a *CYP3A5* não está envolvida no metabolismo lipídico.

Também foi observada falta de relação entre os alelos *CYP3A5\*6* e *CYP3A5\*1D* e diferenças nos lipídeos séricos basais. Na literatura, não há relatos de estudos similares, provavelmente devido à baixa freqüência do alelo

*CYP3A5\*6* nas populações de um modo geral e à dificuldade de identificar o SNP *CYP3A5\*1D*.

A resposta hipolipemiante a atorvastatina nesta amostra foi semelhante à descrita em outros estudos com populações brasileiras (RODRIGUES *et al.*, 2005; SORKIN *et al.*, 2005).

Neste estudo, não se observou relação entre o SNP *CYP3A5\*6* e variação no perfil lipídico sérico após o tratamento. No entanto, é preciso levar em consideração o reduzido número de portadores desse alelo que foi restrito ao grupo de indivíduos HC de etnia negra (6,8%).

A interação entre os SNPs *CYP3A5\*3C*, *CYP3A5\*1D* e o haplótipo *CYP3A5\*3A* e a resposta ao tratamento com atorvastatina encontrada em HC brancos, demonstra claramente que os alelos *CYP3A5\*3C* e *\*1D* estão associados com menor redução de colesterol total, LDL-c e HDL-c, de forma dependente da etnia.

A menor redução de HDL-c sérico, após o tratamento, encontrada nos indivíduos de etnia branca portadores de alelos *CYP3A5\*3C* e *\*1D*, foi descrita pela primeira vez neste estudo. Esse resultado é sugestivo de que os alelos *CYP3A5\*3C* e *\*1D* estão associados com melhor resposta de HDL-c a atorvastatina. Em monoterapias com vastatinas, há grande heterogeneidade de resposta do HDL-c (AZTALOS *et al.*, 2004). Espera-se que até um terço dos pacientes apresentem redução no HDL-c (AZTALOS *et al.*, 2004), embora na maioria dos casos o esperado é que o HDL-c aumente ou permaneça inalterado com o tratamento com vastatinas (SCHMITZ; DROBNIK, 2003).

Os nossos resultados diferem dos descritos em estudo anterior que observou maior redução de colesterol total e LDL-c séricos, em 46 indivíduos europeus portadores do *CYP3A5\*3C* tratados por um ano com simvastatina,

lovastatina ou atorvastatina (KIVISTO *et al.*, 2004). Esse estudo tem algumas limitações, tais como pequena casuística, terapia de longa duração, diferentes doses de diversas vastatinas e, portanto, os resultados merecem uma análise cuidadosa.

Em outros estudos não foram encontradas associações significativas entre o alelo *CYP3A5\*3C* e resposta a simvastatina, fluvastatina e pravastatina em outras populações caucasianas (FIEGENBAUM *et al.*, 2005c; CHASMAN *et al.*, 2004).

As diferenças entre os resultados deste e de outros estudos são sugestivas de que o efeito do alelo *CYP3A5\*3C* na resposta hipolipemiante de vastatinas parece depender do tipo de vastatina, tempo de tratamento e grupo étnico. Além disso, outros fatores que afetam a farmacocinética e a farmacodinâmica das vastatinas devem ser também considerados. A casuística de hipercolesterolêmicos deste estudo contempla muitas variáveis que podem ter contribuído para estes resultados. O grupo de HC brancos e negros apresenta diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no número de hipertensos, de mulheres na menopausa, uso de diuréticos, uso de bloqueadores de canal de cálcio, perfil basal de HDL-c, VLDL-c e triglicérides entre os brancos

A atorvastatina é ingerida na forma de sal cálcico do fármaco ativo, e não como um pró-fármaco, como acontece com a simvastatina, por exemplo (LENNERNAS, 2003; SCHACHTER, 2004). Outro aspecto é que o efeito das vastatinas nem sempre se correlaciona com as concentrações plasmáticas do fármaco e de seus metabólitos ativos (LENNERNAS, 2003). Essa observação não é surpresa, levando-se em conta que o fígado é o principal sítio de ação da HMG-coA redutase (LENNERNAS, 2003). Como consequência, concentrações hepáticas de vastatinas e de seus metabólitos ativos têm

melhor correlação com os efeitos farmacológicos sobre o LDL-c. Infelizmente, os dados intracelulares são difíceis de obter, dada a complexa interação entre os processos de ligação a proteínas plasmáticas e tecidos, captação hepática, metabolismo intracelular, secreção biliar, entre outros (LENNERNAS, 2003). Além disso há também questões éticas envolvidas na obtenção desse tipo de amostra para estudos de resposta terapêutica a vastatinas.

*In vivo*, a atorvastatina é metabolizada pela CYP3A4/3A5 a dois metabólitos ativos, 2-hidróxi-atorvastatina e 4-hidróxi-atorvastatina, que estão em equilíbrio com suas formas lactonas inativas (LENNERNAS, 2003; JACOBSEN *et al.*, 2000). Estudos indicam que estes metabólitos ativos são responsáveis por 70% da atividade inibitória da HMG-coA redutase (KANTOLA; KIVISTO; NEUVONEN, 1998; LEA; McTAVISH, 1997; LENNERNAS, 2003).

Pode-se especular que indivíduos que possuem as duas enzimas CYP3A4 e CYP3A5 funcionais (*CYP3A4\*1A* e *CYP3A5\*1A*) produzem metabólitos ativos da atorvastatina em maior quantidade que os demais indivíduos. Dessa forma, a inibição da HMG-coA redutase é potencializada pela maior taxa de biotransformação da atorvastatina particularmente nos hepatócitos. Assim sendo, os indivíduos portadores do alelo *CYP3A5\*1A* devem apresentar maior resposta a atorvastatina que os portadores do alelo *CYP3A5\*3C*, como observado neste estudo. No entanto, a parcela de contribuição da CYP3A5 em relação ao conteúdo hepático total de CYP3A ainda é questão de debate (XIE; WOOD; KIM, 2004).

Além disso, sabe-se que a biodisponibilidade da atorvastatina é afetada por alterações em diversos processos complexos nos quais a CYP3A5 está envolvida. O equilíbrio entre o metabolismo das diferentes rotas de fase I

(oxidativa) e fase II (conjugativa) e a distribuição tecidual diferencial via transportadores de membrana (fase III) podem afetar a eficácia clínica da atorvastatina (WILKE; REIF; MOORE, 2005).

Em seguida ao metabolismo oxidativo efetuado pela CYP3A4/3A5, a atorvastatina forma uma variedade de intermediários hidroxil, (BULLEN; MILLER; HAYES, 1999; LENNERNAS, 2003), que sofrem modificações adicionais através da UGT1, que geram derivados lactona biologicamente inativos (para-hidroxi-atorvastatina lactona) (JEMAL *et al.*, 1999; JACOBSEN *et al.*, 2000). Variação na expressão da UGT1 está sujeita a vários polimorfismos genéticos (MARUO *et al.*, 2005; KIANG; ENSOM; CHANG, 2005) que podem estar envolvidos na síntese diferencial de atorvastatina lactona, o que modifica a farmacocinética e o resultado clínico do tratamento para várias vastatinas (PRUEKSARITANONT *et al.*, 2002).

Ainda, durante a fase III do metabolismo hepático, a atorvastatina é substrato do transportador de membrana dependente de ATP denominado glicoproteína P. A glicoproteína P é codificada pelo gene *MDR1 (ABCB1)* e está localizada em células e tecidos onde há atividade da subfamília CYP3A, como por exemplo nos enterócitos do intestino delgado e nos hepatócitos. Portanto, para a maioria dos substratos de CYP3A, as duas proteínas agem em consonância para reduzir as concentrações intracelulares dos mesmos. SNPs no *ABCB1*, como o C3435T, afetam a expressão de RNAm e o efluxo celular mediado pela glicoproteína P (MARKOVA *et al.*, 2006; OSELIN, 2003; HESSELINK *et al.*, 2003; HITZL *et al.*, 2001).

A menor resposta hipolipemiante encontrada nos portadores do alelo *CYP3A5\*3C* em nosso estudo pode resultar, portanto, de interação com variantes de outros genes envolvidos na biotransformação e eliminação da

atorvastatina. Outros fatores como sexo, hipertensão ou outras variáveis, tais como medicação concomitante, poderiam estar relacionados com os resultados deste estudo, conforme previamente relatado (WILKE; MOORE; BURMESTER, 2005; GIVENS *et al.*, 2003; HO *et al.*, 2005). Porém, associação entre essas variáveis e a resposta a atorvastatina não foi encontrada em nosso estudo.

É importante salientar que, neste estudo, não foi encontrada associação entre o SNP *CYP3A5\*3C* e a hipertensão arterial de indivíduos HC. Associação entre o SNP *CYP3A5\*3C* e a pressão arterial média, pressão sistólica e a taxa de depuração de creatinina foi descrita em 25 americanos afro-descendentes saudáveis (GIVENS *et al.*, 2003). No entanto, afirmar que o alelo *CYP3A5\*3C* está associado ao aumento da pressão arterial ainda é motivo de controvérsia, pois esse achado é proveniente de uma casuística reduzida. Embora esse resultado tenha sido parcialmente reproduzido em estudos mais recentes (FROMM *et al.*, 2005; KREUTZ *et al.*, 2005; KIVISTO *et al.*, 2005; HO *et al.*, 2005; BOCHUD *et al.*, 2006), o mecanismo envolvido ainda não foi completamente elucidado.

A interação entre o alelo *CYP3A5\*3C* e a elevação da CK sérica em pacientes com mialgia, evidenciada em uma população americana (WILKE; MOORE; BURMESTER, 2005) não se repetiu em nosso estudo. É importante notar que os hipercolesterolêmicos de nossa amostra não estavam fazendo uso concomitante de gemfibrozil que sabidamente causa danos musculares graves com aumento acentuado de CK sérica (WILKE; MOORE; BURMESTER, 2005). Além do mais, o estudo realizado é de curta duração, e efeitos colaterais do tratamento com vastatinas podem ter início algumas semanas

após o tratamento ou até dois anos depois (BELLOSTA; PAOLETTI; CORSINI, 2004).

O alelo *CYP3A5\*3C* pode apresentar-se na forma de dez variantes (XIE; WOOD; KIM, 2004) que podem estar associadas à baixa expressão da proteína CYP3A5. Entretanto, as conseqüências funcionais de algumas dessas variantes ainda permanecem por serem investigadas. O efeito do alelo *CYP3A5\*3C* no processamento do RNAm de *CYP3A5* não é integral, incondicional. A caracterização das diversas variantes de RNAm indica que algumas moléculas do pré-RNAm “escapam” ao efeito do alelo *CYP3A5\*3C* e são processadas corretamente (LIN *et al.*, 2002; BURK; WOJNOWSKI, 2004). Portanto, a presença do SNP *CYP3A5\*3C* sozinho pode não ser suficiente para determinar o fenótipo CYP3A5 (GIVENS *et al.*, 2003).

O SNP *CYP3A5\*1D*, localizado na 3'UTR, parece não estar relacionado com menor estabilidade do RNAm (BUSI; CRESTEIL, 2005) conforme sugerido anteriormente em outros estudos (XIE; WOOD; KIM, 2004). Entretanto, como o alelo *CYP3A5\*1D* está em forte associação com o alelo *CYP3A5\*3C*, e os efeitos gerados por este último, tanto na redução do perfil lipídico como na expressão gênica, são também encontrados nos portadores de *CYP3A5\*1D*. Isso pode ser observado nos resultados de análises do haplótipo *CYP3A5\*3A*, que reproduzem fielmente o que foi encontrado nas análises isoladas para ambos os alelos. A forte associação entre os alelos *CYP3A5\*3C* e *CYP3A5\*1D* foi relatada por Lee e colaboradores, em 2003. Na casuística daquele estudo, o alelo \*1D foi encontrado em 104 de 107 alelos *CYP3A5\*3C*. Em nosso estudo, foram encontrados 336 alelos \*3C e nestes mesmos indivíduos, 348 alelos \*1D, e esta freqüência é similar à do estudo anterior ( $\chi^2 = 0,11$ , 1df,  $p=0,745$ ).

Quanto à análise da expressão gênica de *CYP3A5*, o uso da linhagem celular derivada de enterócitos humanos Caco2 como calibrador nas reações de PCR em Tempo Real é inédito e permitiu avaliar a variação inter-ensaio, bem como comparar estatisticamente os resultados de expressão antes e após o tratamento com atorvastatina.

Os experimentos de expressão gênica deste estudo foram realizados em CMSP, supondo que este tipo celular reflete o que acontece nos hepatócitos, principal sítio de ação da atorvastatina. Em 2002, Nagai *et al.* (2002) apontaram que havia RNAm de *CYP3A5* e de *CYP3A4* em linhagens celulares derivadas de sangue humano. A expressão encontrada em linhagens representantes de linfócitos e macrófagos (MOLT4 e K562) foi proporcional à expressão de *CYP3A4/3A5* em linhagem derivada de hepatócitos (HepG2). Em 2004, WATANABE *et al.*, descreveram a correlação entre a quantidade de RNAm, a quantidade de proteína e a atividade da enzima *CYP3A4*, no fígado (WATANABE *et al.*, 2004).

É importante notar que os RNAm variantes de *CYP3A5* (codificados pelo alelo *CYP3A5\*3C*) que possuem o pseudoéxon 3B, são menos estáveis que o RNAm funcional (codificado pelo alelo *CYP3A5\*1A*) (BUSI; CRESTEIL, 2005). Isso sugere que, nos indivíduos com o genótipo *\*3C/\*3C*, a baixa quantidade de RNAm poderia ser resultante da rápida degradação das variantes produzidas pelo *CYP3A5\*3C* (BUSI; CRESTEIL, 2005). Esta hipótese está em concordância com os resultados deste estudo, em que foi possível verificar que os indivíduos portadores do alelo *CYP3A5\*3C* têm menor expressão basal de RNAm em células mononucleares do sangue periférico em relação aos indivíduos portadores do alelo *CYP3A5\*1A*.



Os resultados deste estudo demonstram, pela primeira vez, que a expressão de RNAm do *CYP3A5* em CMSP é aumentada *in vivo* pelo tratamento com atorvastatina por 4 semanas. Além disso, os resultados de análise genotípica são sugestivos de que o alelo *CYP3A5\*3C* e o haplótipo *CYP3A5\*3A* estão envolvidos nesse processo, enquanto que o alelo funcional *CYP3A5\*1A* (expressor de *CYP3A5*) não está.

A indução da expressão da subfamília CYP3A tem relevância clínica pois afeta a eficácia do tratamento farmacológico (BELLOSTA; PAOLETTI; CORSINI, 2004). Entre os indutores conhecidos de CYP3A estão xenobióticos como a dexametasona, omeprazol e lovastatina (BURK; WOJNOWSKI, 2004). Muitos destes substratos têm sua taxa de biotransformação aumentada em decorrência da indução da CYP3A, o que assegura a detoxificação destes compostos (BURK; WOJNOWSKI, 2004). Com isso, a concentração plasmática desses agentes terapêuticos é diminuída ao longo do tratamento e devem ser reajustadas para garantir a eficácia terapêutica.

A atorvastatina parece induzir a expressão de *CYP3A5* em indivíduos portadores do alelo *CYP3A\*3C* e haplótipo \*3A. O aumento da expressão de RNAm de *CYP3A5* pela atorvastatina nos portadores do alelo \*3C pode estar relacionado com um outro SNP na região promotora do gene (XIE; WOOD; KIM, 2004).

Especula-se que o aumento da taxa de transcrição de *CYP3A5* é mediado pelo receptor pregnano X (PXR), fator de transcrição que modula a expressão de toda a subfamília CYP3A (BURK *et al.*, 2004). Foi demonstrado que indutores ligam-se diretamente ao PXR e o complexo se liga a seqüências específicas (motivos) na região promotora (5'UTR) de genes da família CYP3A (BURK; WOJNOWSKI, 2004). A região promotora do *CYP3A5* tem pouca

similaridade com as 5'UTRs dos genes *CYP3A4* e de *CYP3A7*, e apresenta 89,6% de homologia com a região promotora do pseudogene *CYP3AP1* (XIE; WOOD; KIM, 2004; BURK *et al.*, 2004).

Foi observado que o SNP A-44G do pseudogene *CYP3AP1* está em desequilíbrio de ligação com o alelo *CYP3A5\*3C* (KUEHL *et al.*, 2001) e que indivíduos portadores da variante -44G apresentam maior expressão basal de proteína *CYP3A5* em hepatócitos que os não portadores (PAULUSSEN *et al.*, 2000). Portanto, é possível que o SNP A-44G do *CYP3AP1* ou outra variante da região promotora do *CYP3A5* apresente maior afinidade pelo PXR ativado pela atorvastatina e conseqüentemente seja responsável pelo aumento no número de transcritos observado nos portadores do alelo *CYP3A5\*3C*.

Outra consideração a fazer é que a taxa de expressão hepática de RNAm de *PXR* tem correlação com a de *CYP3A5* em indivíduos portadores do alelo \*1A, mas não nos indivíduos \*3C/\*3C. (BURK *et al.*, 2004). A ativação do PXR pela atorvastatina pode estar condicionada à baixa quantidade de RNAm funcional de *CYP3A5* nos portadores do alelo \*3C, na tentativa de fenocopiar o efeito de alta expressão do alelo \*1A. Especula-se que a síntese de RNAm é estimulada pelo PXR, mantendo constante a proporção de síntese dos RNAm funcional e variante. Uma vez que o RNAm variante é degradado mais rapidamente, isso resultaria em maior concentração de transcritos funcionais, e conseqüentemente no aumento da síntese protéica (BURK *et al.*, 2004; BUSI; CRESTEIL, 2005).

Em ambas as hipóteses, os portadores de alelo \*3C têm aumento de expressão de *CYP3A5* que poderia estar relacionada com aumento da atividade enzimática no fígado. Isso resultaria em menor biodisponibilidade de atorvastatina nesse tecido e conseqüentemente menor resposta

hipolipemiante, como se observou neste estudo. No entanto, todas estas proposições precisam ser confirmadas em estudos posteriores.

Os resultados deste estudo, quando analisados em conjunto com demais genes envolvidos na variação da resposta a atorvastatina, poderão ser úteis na identificação de marcadores farmacogenéticos de resposta a hipolipemiantes.

O uso desses marcadores poderá contribuir na escolha do tratamento mais apropriado, poupando o paciente hipercolesterolêmico de terapias ineficientes e reações adversas, e reduzir subseqüentemente o risco de desenvolvimento de doença arterial coronariana.

## 6 CONCLUSÕES

As frequências de alelos *CYP3A5\*3C* (85,4%) e *CYP3A5\*1D* (82,7%) foram menores em negros e de *CYP3A5\*6* (7%) maiores em negros que em brancos. Os alelos *CYP3A5\*3C* e *CYP3A5\*1D* apresentaram frequência menor que as observadas em outras populações de etnia branca, provavelmente devido à miscigenação de nossa população. O alelo *CYP3A5\*6* foi encontrado apenas em heterozigose e sua frequência foi similar a de outras populações.

O alelo *CYP3A5\*1D* está em forte associação com o alelo *CYP3A5\*3C* e ambos estão relacionados com menor resposta a atorvastatina, de forma dependente da etnia.

O tratamento com atorvastatina aumenta a expressão de RNAm de *CYP3A5*, em células mononucleares do sangue periférico, de portadores de pelo menos um alelo *CYP3A5\*3C* e do haplótipo *CYP3A5\*3A*.

## REFERÊNCIAS

AZTALOS, B., C. *et al.* High density lipoprotein metabolism and progression of atherosclerosis: new insights from the HDL Atherosclerosis Treatment Study. **Curr Opin Cardiol.**, 19:385-391, 2004.

BALRAM, C. *et al.* CYP3A5\*3 and \*6 single nucleotide polymorphism in three distinct Asian populations. **Eur J Clin Pharmacol.**, 59:123-126, 2003.

BANCO de dados na Internet. Disponível em:<[http://www.imm.ki.se/CY\\_Palleles](http://www.imm.ki.se/CY_Palleles)>. Acesso em: 10 ago. 2004.

BELLOSTA, S.; PAOLETTI, R.; CORSINI, A. Safety of statins. **Circulation**, 109S3: 50-7, 2004.

BERCOVICH, D. *et al.* The association of common SNPs and haplotypes in the CETP and MDR1 genes with lipids response to fluvastatin in familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, 185(1):97-107, Mar. 2006.

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

BIOEDIT SEQUENCE ALIGNMENT EDITOR. Versão 5.0.9. Disponível em:<<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>>. Acesso em: 05 dez. 2004.

BOCHUD, M. *et al.* Association of CYP3A5 genotypes with blood pressure and renal function in African families. **J Hypertens**, 24(5):923-929, May 2006.

BOGMAN, K. *et al.* HMG-CoA reductase inhibitors and P-glycoprotein modulation. **Br J Pharmacol**, 132:1183-92, 2001.

BOTTORFF, M.; HANSTEN, P. Long-term safety of hepatic hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitors: the role of metabolism-monograph for physicians. **Arch Intern Med.**, 14-28;160(15):2273-80, Aug. 2000.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Lowering plasma cholesterol by raising LDL receptors. 1981. **Atheroscler Suppl**, 5:57-9, 2004.

BULLEN, W. W.; MILLER, R. A.; HAYES, R. N. Development and validation of a high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for atorvastatin, ortho-hydroxy atorvastatin, and para-hydroxy atorvastatin in human, dog, and rat plasma. **J Am Soc Mass Spectrom**, 10:55-66, 1999.

BURK, O. *et al.* The Induction of Cytochrome P450 3A5 (CYP3A5) in the Human Liver and Intestine Is Mediated by the Xenobiotic Sensors Pregnane X Receptor (PXR) and Constitutively Activated Receptor (CAR)\*. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 279, n. 37, Sept. 2004.

BURK, O.; WOJNOWSKI, L. Cytochrome P450 3A and their regulation. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, 369(1):105-24, 2004.

BUSI, F.; CRESTEIL, T. CYP3A5 RNAm Degradation by Nonsense-Mediated Decay. **Mol Pharmacol.**, 68(3):808-15, Sep. 2005.

CHAHOU, G.; AUDE, Y. W.; MEHTA, J. L. Dietary recommendations in the prevention and treatment of coronary heart disease: do we have the ideal diet yet? **Am J Cardiol**, 94:1260-7, 2004.

CHALMERS, J. *et al.* World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the management of hypertension. Guidelines subcommittee of the World Health Organization. **Clin Exp Hypertens**, 21:1009-60, 1999.

CHASMAN, D. I. *et al.* Pharmacogenetic study of statin therapy and cholesterol reduction. **JAMA**, 291:2821-7, 2004.

CHEN, C. *et al.* Differential interaction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors with ABCB1, ABCC2, and OATP1B1. **Drug Metab Dispos**, 33:537-46, 2005.

CHOWBAY, B.; ZHOU, S.; LEE, E. J. An interethnic comparison of polymorphisms of the genes encoding drug-metabolizing enzymes and drug transporters: experience in Singapore. **Drug Metab Rev**, 37:327-78, 2005.

CORSINI, A. *et al.* The safety of HMG-CoA reductase inhibitors in special populations at high cardiovascular risk. **Cardiovasc Drugs Ther**, 17:265-85, 2003.

DAI, Y. *et al.* Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. **Drug Metab Dispos**, 34(5):836-47, 2006.

DEMICHELE, A.; APLENC, R.; BOSBYL, J. Drug-metabolizing enzyme polymorphisms predict clinical outcome in a node positive breast cancer cohort. **J Clin Oncol.**, 23:5552-59, 2005.

DIEFFENBACH, C. W.; LOWE, T. M. J.; DVEKSLER, G. S. General Concepts for PCR Primer Design. In: DIEFFENBACH, C. W.; DVEKSLER, G. S. **A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.** New York: PCR Primer, 1995. p. 133-155.

DISPONÍVEL EM:<<http://medicine.iupui.edu/flockhart/3A457.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2006.

DISPONÍVEL EM:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 10 jan. 2006.

DISPONÍVEL EM:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>>. Acesso em: 04 abr. 2005.

DOMANSKI, T. L. *et al.* cDNA cloning and initial characterization of CYP3A43, a novel human cytochrome P450. **Mol Pharmacol.**, 59:386-392, 2001.

EVANS, W. E.; McLEOD, H. L. Pharmacogenomics – Drug disposition, Drug Targets and Side Effects. **N Eng J Med.**, 348(6):538-49, 2003.

FIGENBAUM, M. *et al.* Pharmacogenetic study of apolipoprotein E, cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase genes and simvastatin therapy in Brazilian subjects. **Clin Chim Acta.**, 2005 Dec; 362(1-2):182-8. Epub 2005 Jul. 20., 2005a.

\_\_\_\_\_. Determinants of variable response to simvastatin treatment: the role of common variants of SCAP, SREBF-1a and SREBF-2 genes. **Pharmacogenomics J.**, 5(6):359-64, 2005b.

\_\_\_\_\_. The role of common variants of ABCB1, CYP3A4, and CYP3A5 genes in lipid-lowering efficacy and safety of simvastatin treatment. **Clin Pharmacol Ther**, 78:551-8, 2005c.

FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clin Chem.**, 28(10):2077-80, Oct. 1982.

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.**, 18:499-502, 1972.

FROMM, M. F. *et al.* CYP3A5 genotype is associated with elevated blood pressure. **Pharmacogenet Genomics.**, 15(10):737-41, Oct. 2005.

FUKUDA, T.; ONISHI, S.; FUKUEN, S. CYP3A5 genotype did not impact on nifedipine disposition in healthy volunteers. **The Pharmacogenomics Journal**, 4: 34-39, 2004.

FUKUEN, S.; FUKUDA, T.; MAUNE, H. Novel detection assay by PCR-RFLP and frequency of the CYP3A5 SNPs, CYP3A5\*3 and \*6, in a Japanese population. **Pharmacogenetics**, 12:331-334, 2002.

GARCIA-OTIN, A. L. *et al.* Allelic polymorphism – 491A/T in apo E gene modulates the lipid-lowering response in combined hyperlipidemia treatment. **Eur J Clin Invest.**, 32(6):421-8, 2002.

GATTAS, G. J. *et al.* Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. **Braz J Med Biol Res**, 37:451-8, 2004.

GELLNER, K. *et al.* Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene. **Pharmacogenetics**, 11:111-121, 2001.

GERVASINI, G. *et al.* Differences in CYP3A5\*3 genotype distribution and combinations with other polymorphisms between spaniards and other caucasian populations. **Ther Drug Monit**, 27(6):819-821, December 2005.

GIVENS, R. C. *et al.* CYP3A5 genotype predicts renal CYP3A activity and blood pressure in healthy adults. **J Appl Physiol**, 95:1297-300, 2003.

GOTO, M.; MASUDA, S.; KIUCHI, T. CYP3A5\*1-carrying graft liver reduces the concentration/oral dose ratio of tacrolimus in recipients of living-donor liver transplantation. **Pharmacogenetics**, 14(7):471-8, 2004.

GUZMÁN, E. C. R. *et al.* Association of the apolipoprotein B gene polymorphisms with cholesterol levels and response to fluvastatin in Brazilian individuals with high risk for coronary heart disease. **Clin. Chem. Lab. Med.**, 38:196-199, 2000.



HAUFROID, V.; MOURAD, M.; VAN KERCKHOVE, V. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. **Pharmacogenetics**, 14(3):147-54, 2004.

HAY, I. D. *et al.* American Thyroid Association assessment of current free thyroid hormone and thyrotropin measurements and guidelines for future clinical assays. The Committee on Nomenclature of the American Thyroid Association. **Clin Chem.**, 37(11):2002-8, Nov. 1991.

HESSELINK, D. A. *et al.* Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. **Clin Pharmacol Ther.**, 74:245-254, 2003.

HITZL, M. A. *et al.* The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 124 from CD56+ natural killer cells. **Pharmacogenetics.**, 11(4):293-8, 2001.

HO, H. *et al.* Association between the CYP3A5 genotype and blood pressure. **Hypertension**, 45:294-8, 2005.

HORDER, M.; ELSER, R. C.; GERHARDT, M. Approved Recommendation on IFCC Methods for the Measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 7. IFCC Methods for Creatine Kinase. **Eur. J. Chem. Clin. Biochem.**, 29:435-56, 1991.

HUSTERT, E.; HABERL, M.; BURK, O. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. **Pharmacogenetics**, 11:773-779, 2001.

JACOBSEN, W. *et al.* Lactonization is the critical first step in the disposition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor atorvastatin. **Drug Metab Dispos**, 28:1369-78, 2000.

JEMAL, M. *et al.* Quantitation of the acid and lactone forms of atorvastatin and its biotransformation products in human serum by high-performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, 13:1003-15, 1999.

KAJINAMI, K. *et al.* CYP3A4 Genotypes and Plasma Lipoprotein Levels Before and After Treatment with Atorvastatin in Primary Hypercholesterolemia. **Am J Cardiol.**, 93:104-107, 2004b.

\_\_\_\_\_. Polymorphisms in the multidrug resistance-1 (MDR1) gene influence the response to atorvastatin treatment in a gender-specific manner. **Am J Cardiol.**, 93(8):1046-50, 2004c.

KANTOLA, T.; KIVISTO, K. T.; NEUVONEN, P. J. Effect of itraconazole on the pharmacokinetics of atorvastatin. **Clin Pharmacol Ther.**, 64(1):58-65, Jul 1998.

KATZ, D. A.; GRIMM, D. R.; CASSAR, S. C. CYP3A5 genotype has a dose-dependent effect on ABT-773 plasma levels. **Clin Pharmacol Ther.**, 75(6):516-28, 2004.

KETTER, T. A. *et al.* The emerging role of cytochrome P450 3A in psychopharmacology. **J Clin Psychopharmacol.**, 15(6): 387-98, 1995.

KIANG, T. K.; ENSOM, M. H.; CHANG, T. K. UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. **Pharmacol Ther**, 106:97-132, 2005.

KIVISTO, K. T. *et al.* Lipid-lowering response to statins is affected by CYP3A5 polymorphism. **Pharmacogenetics**, 14:523-5, 2004.

\_\_\_\_\_. CYP3A5 genotype is associated with diagnosis of hypertension in elderly patients: data from the DEBATE Study. **Am J Pharmacogenomics.**, 5(3):191-5, 2005.

KREUTZ, R. *et al.* The role of the cytochrome P450 3A5 enzyme for blood pressure regulation in the general Caucasian population. **Pharmacogenet Genomics.**, 15(12):831-7, Dec. 2005.

KUEHL, P. *et al.* Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. **Nat Genet**, 27(4):383-91, 2001.

LACROIX, D. *et al.* Expression of CYP3A in the human liver – evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth. **Eur J Biochem**, 247:625-634, 1997.

LAMBA, J. K. *et al.* Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. **Adv Drug Deliv Rev**, 54:1271-94, 2002.

LEA, A. P.; McTAVISH, D. Atorvastatin. A review of its pharmacology and therapeutic potential in the management of hyperlipidaemias. **Drugs.**, 53(5):828-47, May 1997.

LEE, S. J. *et al.* Genetic findings and functional studies of human CYP3A5 single nucleotide polymorphisms in different ethnic groups. **Pharmacogenetics**, 13(8):461-472, 2003.

LEE, S. J.; GOLDSTEIN, J. A. Functionally defective or altered CYP3A4 and CYP3A5 single nucleotide polymorphisms and their detection with genotyping tests. **Pharmacogenomics**, 6:357-71, 2005.

LENNERNAS, H. Clinical pharmacokinetics of atorvastatin. **Clin Pharmacokinet**, 42(13):1141-60, 2003.

LIN, Y. S. *et al.* Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. **Mol Pharmacol.**, 62(1):162-72, Jul 2002.

LIU, T. C. *et al.* Polymorphism analysis of CYP3A5 in myeloid leukemia. **Oncology Reports.**, 9:327-329, 2002.

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

MACPHEE, I. A. *et al.* Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5\*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians. **Transplantation**, Feb 79(4):499-502, 2005.

MARUO, Y. *et al.* Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase and drug metabolism. **Curr Drug Metab**, 6(2):91-9, 2005.

MARKOVA, S. *et al.* Genotype-dependent down-regulation of gene expression and function of MDR1 in human peripheral blood mononuclear cells under acute inflammation. **Drug Metab Pharmacokinet**, 21(3):194-200, 2006.

MASSIRER, K. B. *et al.* Interferon-alpha receptor 1RNA expression in peripheral blood mononuclear cells is associated with response to interferon-

alpha therapy of patients with chronic hepatitis C. **Braz J Med Biol Res.**, 37: 643-7, 2004.

MAURICE, M. *et al.* Effects of imidazole derivatives on cytochromes P450 from human hepatocytes in primary culture. **FASEB J.**, 6(2):752-8, 1992.

NAGAI, F. *et al.* Cytochrome P450 (CYP) Expression in Human Myeloblastic and Lymphoid Cell Lines. **Biol. Pharm. Bull.**, 25(3), 383-385, Mar 2002.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. **World Health Organ Tech Rep Ser**, 894:1-253, 2000.

OSELIN, K. *et al.* Quantitative determination of MDR1 RNAm expression in peripheral blood lymphocytes: a possible role of genetic polymorphism in the MDR1 gene. **Eur J Clin Invest**, 33(3): 261-7, 2003.

PAULUSSEN, A. *et al.* Two linked mutations in transcriptional regulatory elements of the CYP3A5 gene constitute the major genetic determinant of polymorphic activity in humans. **Pharmacogenetics.**, 10(5):415-24, Jul. 2000.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

PINTO, A. G. *et al.* Inhibition of human intestinal wall metabolism by macrolide antibiotics: effect of clarithromycin on cytochrome P450 3A4/3A5 activity and expression. **Clin Pharmacol Ther**, 77(3): 178-88, 2005.

PRUEKSARITANONT, T. *et al.* Effects of fibrates on metabolism of statins in human hepatocytes. **Drug Metab Dispos**, 30:1280-7, 2002.

RESUMO das III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.**, 77 (Supl III):4-48, 2001.

RIFAI, N.; KING, M. E. Immunoturbidimetric assays of apolipoproteins A, AI, AII and B in serum. **Clin. Chem.**, 32: 957-61, 1986.

RODRIGUES, A. C. *et al.* High baseline serum total and LDL cholesterol levels are associated with MDR1 haplotypes in Brazilian hypercholesterolemic individuals of European descent. **Braz J Med Biol Res**, 38:1389-97, 2005.

SALAZAR, L. A. *et al.* Lipid-lowering response of the HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin is influenced by polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor gene in Brazilian patients with primary hypercholesterolemia. **J. Clin. Lab. Anal.**, 14:125-131, 2000a.

\_\_\_\_\_. 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, 2000b.

\_\_\_\_\_. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clin. Chem.**, v. 44, n. 8, p. 1748-1750, 1998.

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

SANDER, C. Genomic medicine and the future of health care. **Science**, 287:1977-8, 2000.

SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. **Fundam Clin Pharmacol.**, 19(1):117-25, 2004.

SCHMITZ, G.; DROBNIK, W. Pharmacogenomics and Pharmacogenetics of Cholesterol-Lowering Therapy. **Clin Chem Lab Med.**, 41(4):581-589, 2003.

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

SIEST, G.; FERRARI, L.; ACCAOUI, M. J. Pharmacogenomics of Drugs Affecting the Cardiovascular System. **Clin Chem Lab Med.**, 41(4):590-599, 2003.

SIEST, G. *et al.* Pharmacogenomics and cardiovascular drugs: need for integrated biological system with phenotypes and proteomic markers. **Eur J Pharmacol**, 527:1-22, 2005.

SIMONS, L. A. Interrelations of lipids and lipoprotein in patients with coronary artery disease in 19 countries. **Am J Cardiol**, 57(14):5G-10G, 1986.

SORKIN, S. C. *et al.* APOA1 polymorphisms are associated with variations in serum triglyceride concentrations in hypercholesterolemic individuals. **Clin Chem Lab Med**, 43:1339-45, 2005.

STEIN, E. A. Managing dyslipidemia in the high-risk patient. **Am J Cardiol**, 89:50C-7C, 2002.

THERVET, E. *et al.* Impact of cytochrome P450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. **Transplantation**, 6:1233-1235, 2003.

THOMPSON, G. R.; O'NEILL, F.; SEED, M. Why some patients respond poorly to statins and how this might be remedied. **Eur Heart J**, 23:200-6, 2002.

TOKUNAGA, K. *et al.* Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancers. **Cancer Res.**, 47(21):5616-9, 1987.

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

VAN SCHAİK, R. H. *et al.* CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians. **Clin Chem**, 48:1668-71, 2002.

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

VOHL, M. C.; SZOTS, F.; LEVIELE, M. Influence of LDL receptor gene mutation and apo E polymorphism on lipoprotein response to simvastatin treatment among adolescents with heterozygous familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, 160(2): 361-8, 2002.

WATANABE, M. Expression of CYP3A4 mRNA Is Correlated With CYP3A4 Protein Level and Metabolic Activity in Human Liver. **J. Pharmacol. Sci.**, 94, 459-462, 2004.

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

\_\_\_\_\_. Chemically blocked analog assays for free thyronines. II. Use of equilibrium dialysis to optimize the displacement by chemical blockers of T4 analog and T3 analog from albumin while avoiding displacement of T4 and T3 from thyroxin-binding globulin. **Clin Chem.**, 34(1):17-23, Jan. 1988.

WILKE, R. A.; MOORE, J. H.; BURMESTER, J. K. Relative impact of CYP3A genotype and concomitant medication on the severity of atorvastatin-induced muscle damage. **Pharmacogenet Genomics**, 15:415-21, 2005.

WILKE, R. A.; REIF, D. M.; MOORE, J. H. Combinatorial pharmacogenetics. **Nat Rev Drug Discov**, 4:911-8, 2005.

WILLIAMS, J. A. *et al.* Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. **Drug Metab Dispos.**, 30(8):883-91, Aug. 2002.

WILKINSON, G. R. Drug metabolism and variability among patients in drug response. **N Engl J Med.**, 352:2211-21, 2005.

XIE, H. G.; WOOD, A. J.; KIM, R. B. Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. **Pharmacogenomics**, 5(3):243-272, 2004.

ZHENG, H. *et al.* Tacrolimus dosing in adult lung transplant patients is related to cytochrome P4503A5 gene polymorphism. **J Clin Pharmacol.**, 44(2):135-40, 2004.

**OBRAS CONSULTADAS**

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of RNAm using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol.**, 25(2):169-93, Oct. 2000.

CAVALLI, S. A.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. Detection of MbolI polymorphism at the 5' promoter region of CYP3A4. **Clin Chem.**, 47(2):348-51, 2001.

GARCIA-MARTIN, E.; MARTINEZ, C.; PIZARRO, R. M. CYP3A4 variant alleles in white individuals with low CYP3A4 enzyme activity. **Clin Pharmacol Ther.**, 71:196-204, 2002.

GRUNDY, S. M. United States Cholesterol Guidelines 2001: expanded scope of intensive low-density lipoprotein-lowering therapy. **Am J Cardiol.**, 88(7B): 23J-27J, 2001.

KAJINAMI, K. *et al.* Pharmacogenetics of HMG-CoA reductase inhibitors: exploring the potential for genotype-based individualization of coronary heart disease management. **Atherosclerosis**, 177:219-34, 2004a.

KARMEN, A. A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxalacetic transaminase in human blood serum. **J. Clin. Invest.**, 34:131, 1955.

MARZ, W. *et al.* The significance of genetic polymorphisms in modulating the response to lipid-lowering drugs. **Pharmacogenomics**, May 2(2):107-21, 2001.

SUGIUCHI, H. *et al.* Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated  $\alpha$ -cyclodextrin. **Clin. Chem.**, 41:717-23, 1995.

WADELIUS, M.; SORLIN, K.; WALLERMAN, O. Warfarin sensitivity related to CYP2C9, CYP3A5 and ABCB1 (MDR1) and other factors. **The Pharmacogenomics J.**, 4(1): 40-8, 2004.

WANDEL, C. *et al.* CYP3A4 activity in African American and European American men: population differences and functional effect of the CYP3A4\*1B 5'-promoter region polymorphism. **Clin Pharmacol Ther.**, 68:82-91, 2000.



**APÊNDICES**

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	116
APÊNDICE B – Ficha para coleta de dados individuais do paciente .....	118

## APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

**NOME DO PACIENTE** \_\_\_\_\_  
**DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº** \_\_\_\_\_ **SEXO** M ( ) F ( )  
**DATA DE NASCIMENTO** \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
**ENDEREÇO** \_\_\_\_\_ **Nº** \_\_\_\_\_ **APTO** \_\_\_\_\_  
**BAIRRO** \_\_\_\_\_ **CIDADE** \_\_\_\_\_  
**CEP** \_\_\_\_\_ **TELEFONE:** \_\_\_\_\_

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

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

**2. PESQUISADOR:** Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata

CARGO/FUNÇÃO: docente (FCF-USP)

INSCRIÇÃO CRF: Nº 8876

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

**3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA**

Sem risco                       **Risco mínimo**                       Risco médio  
 Risco baixo                       Risco maior

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

**4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 ANOS**



## **Prezado Paciente,**

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

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

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

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

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

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

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

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200 \_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do sujeito de pesquisa

\_\_\_\_\_  
assinatura do pesquisador  
(carimbo ou nome legível)

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



## APÊNDICE B – Ficha para coleta de dados individuais do paciente

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

### HISTÓRICO FAMILIAR

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

Diabete Mellitus  Obesidade  Hipertensão  
 Doenças cardiovascular Quem? \_\_\_\_\_  
 Hipercolesterolemia Quem? \_\_\_\_\_  
 Não tem  Não sabe

### DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

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

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