

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 do gene
ABCA1 em indivíduos sob terapia hipolipemiante

Fabiana Dalla Vecchia Genvigir

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a. Dra. Rosario Dominguez Crespo
Hirata

São Paulo

2007

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 do gene
ABCA1 em indivíduos sob terapia hipolipemiante

Fabiana Dalla Vecchia Genvigir

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a. Dra. Rosario Dominguez Crespo
Hirata

São Paulo
2007

Ficha Catalográfica

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

G341e Genvigir, Fabiana Dalla Vecchia
Estudo da expressão gênica e de polimorfismos do gene ABCA1
em indivíduos sob terapia hipolipemiante / Fabiana Dalla Vecchia
Genvigir, -- São Paulo, 2007.
116p.

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

Orientador: Hirata, Rosario Dominguez Crespo

1. Análises clínicas : Medicina 2. Farmacogenética 3. Expressão
gênica I. T. II. Hirata, Rosario Dominguez Crespo, orientador.

616.0756-9 CDD

Fabiana Dalla Vecchia Genvigir

Estudo da expressão gênica e de polimorfismos do gene
ABCA1 em indivíduos sob terapia hipolipemiante

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata
orientadora/presidente

Prof^a. Dra. Lucia Nassi Castilho
1^a. examinadora

Prof^a. Dra. Nancy Amaral Rebouças
2^a. examinadora

São Paulo, 28 de junho de 2007.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Fabiana Dalla Vecchia Genvigir no Programa: Farmácia (Análises Clínicas), do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 28 dias do mês de junho de 2007, no(a) Auditório realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Fabiana Dalla Vecchia Genvigir, apresentada para a obtenção do título de Mestre em Farmácia - Área: Análises Clínicas, intitulada:

"Estudo da expressão gênica e de polimorfismos do gene ABCA1 em indivíduos sob terapia hipolipemiante"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado: *aprovada*

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Rosario Dominguez Crespo Hirata	Presidente	FCF - USP	<i>Aprovada</i>
Nancy Amaral Rebouças	Suplente	ICB - USP	<i>Aprovada</i>
Lucia Nassi Castilho	Titular	UNICAMP - Externo	<i>Aprovado</i>
Resultado Final:			
Parecer da Comissão Julgadora *			

Comentários da Defesa (opcional)

Eu, Jorge Alves de Lima, Técnico Acadêmico, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as), São Paulo, aos 28 dias do mês de junho de 2007.

Nancy Amaral Rebouças
Nancy Amaral Rebouças

Lucia Nassi Castilho
Lucia Nassi Castilho

Rosario D. C. Hirata
Rosario Dominguez Crespo Hirata
Orientador(a)

Comissão de Pós-Graduação
HOMOLOGADO
29 JUN. 2007
Presidente

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório. Nos termos do artigo 110, do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG, para homologação.

DEDICATÓRIA

A Deus, pela graça da salvação através de Jesus Cristo.

Aos meus pais, Saleto e Carmelinda, que são os dois maiores presentes de Deus para mim. São meus tesouros. Meus exemplos de vida. Pessoas íntegras e amorosas. Vocês me ensinaram que um lar deve ser sinônimo de carinho, aconchego e segurança. Foram mestres dos mestres. Tudo de melhor que eu aprendi, com certeza, foi na nossa casa.

Ao meu esposo Elias, que é uma verdadeira benção na minha vida. Nestes 10 anos de namoro, você tem me ajudado a ser uma pessoa melhor, mais compreensiva, mais paciente. Você é meu verdadeiro companheiro e a cada dia que passa consigo te admirar mais e mais. Eu te amo muito por tudo o que você é.

AGRADECIMENTOS

À prof^a. Assoc. Rosario D. C. Hirata, minha orientadora, por ter dedicado a mim horas preciosas... Obrigada pela oportunidade, pela confiança e pelo carinho. Você com certeza é um exemplo de dedicação e amor à ciência.

Ao prof. Tit. Mario H. Hirata, pelas longas conversas e pelos ensinamentos científicos e pessoais.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo, em nome da sua Diretora, Prof^a. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto.

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

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – CAPES, pela bolsa de mestrado concedida no período de março de 2005 a fevereiro de 2007.

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

Aos médicos do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia de São Paulo e da Divisão de Clínica Médica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em especial ao Dr. Egidio Lima Dorea.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas e da Unidade Básica de Atendimento à Saúde do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

Ao Helymar Machado, por sua ajuda com as análises estatísticas.

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

Às queridas Sarah A. Soares e Ivanise M. M. Rebecchi, pelo legado da ABCA1.

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

À Virgínia Alcântara, uma verdadeira amiga que fiz durante este tempo que morei em São Paulo. Obrigada por tanto apoio e incentivo.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP).

RESUMO

GENVIGIR, F.D.V. **Estudo da expressão gênica e de polimorfismos do gene ABCA1 em indivíduos sob terapia hipolipemiante.** 2007. 116 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

A *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1) é uma proteína transmembrana responsável pelo efluxo celular de colesterol e fosfolídeos, que é um passo essencial para o transporte reverso do colesterol e para a biogênese da HDL. Polimorfismos do gene ABCA1 foram associados com risco de doença arterial coronariana, variações no perfil lipídico e diferenças na resposta a fármacos hipolipemiantes. Com a finalidade de avaliar os efeitos de polimorfismos do ABCA1 sobre a expressão gênica e a resposta a vastatinas, foram selecionados indivíduos normolipidêmicos (NL, n=143) e hipercolesterolêmicos (HC, n=224). A resposta a atorvastatina (10 mg/dia/4 semanas) foi avaliada pelo perfil lipídico sérico em 141 indivíduos do grupo HC (ATORVA). DNA e RNA total foram extraídos de amostras de sangue periférico. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) G70943A (R219K), C-14T e C-105T, uma variante nova do ABCA1, foram detectados por PCR-RFLP e confirmados por seqüenciamento de DNA. A expressão de RNAm do ABCA1 em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foi analisada por PCR-*duplex* e PCR em tempo real, utilizando o gene GAPD como referência endógena. A frequência do alelo -105T foi 1,4% em NL e 2,0% em HC. O alelo 70943A (genótipos GA+AA) foi associado com maior concentração sérica basal de apoA1 (NL), de HDL-c (ATORVA) e com menores concentrações basais de triglicerídeos e VLDL-c e menor índice TG/HDL-c (HC e ATORVA) em comparação com o genótipo 70943GG ($p<0,05$). O polimorfismo C-105T está em desequilíbrio de ligação com o SNP C-14T ($p=0,006$). Portadores do alelo -105T (genótipos CT+TT), quando comparados aos portadores do genótipo -105CC, tiveram menores valores basais de triglicerídeos e VLDL-c, maior concentração de HDL-c e menor índice TG/HDL-c nos grupos HC e ATORVA e também maiores concentrações de apoA1 e menor índice apoB/apoA1 no grupo ATORVA ($p<0,05$). Nos grupos HC e ATORVA, os portadores do haplótipo -14CT+TT/-105CT+TT tiveram menores valores de triglicerídeos e VLDL-c basais, maiores concentrações de HDL-c e menor índice TG/HDL-c quando comparados aos portadores dos outros haplótipos ($p<0,05$). A expressão basal do ABCA1 foi menor nos HC que nos NL independentemente da taxa de expressão alta (GM1) ou baixa (GM2). Este efeito foi associado com os SNPs C-14T e G70943A SNPs. Após o tratamento com atorvastatina, a expressão de RNAm foi reduzida nos HC portadores do alelo -14T em comparação com os portadores de alelo -14C. Esses resultados são sugestivos de que ABCA1 SNPs estão envolvidos na variação do perfil lipídico sérico e na expressão de RNAm em resposta a atorvastatina.

Palavras-chave: ABCA1. Atorvastatina. Expressão gênica. Farmacogenética. HDL. Polimorfismo genético.

ABSTRACT

GENVIGIR, F.D.V. **ABCA1 gene expression and polymorphisms on patients under hypolipemic therapy.** 2007. 116 f. Dissertation (Masters Degree) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1) is a transmembrane protein involved on cholesterol and phospholipid cellular efflux, which is an essential step for the reverse cholesterol transport and HDL biogenesis. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the ABCA1 gene have been associated with increased risk of coronary heart disease, differences on serum lipid profile and response to lowering-cholesterol drugs. We have evaluated the influence of ABCA1 SNPs on mRNA expression and lipid-lowering response to atorvastatin. Normolipidemic (NL, n=143) hypercholesterolemic (HC, n=224) individuals were enrolled in this study and the response to atorvastatin (10 mg/day/4 weeks) was evaluated in HC individuals (ATORVA, n=141). Blood samples were collected for biochemical analyses, genomic DNA and total RNA extraction. SNPs G70943A (R219K), C-14T and C-105T, a novel variant of ABCA1, were detected by PCR-RFLP and confirmed for DNA sequencing. ABCA1 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was analysed by PCR-duplex and Real Time PCR, using the *GAPD* as the endogenous reference. In HC and NL, the frequency of -105T allele was 2.0% and 1.4%, respectively. The 70943A allele (genotypes GA+AA) was associated with higher basal concentrations of apoA1 (NL) and HDL-c (ATORVA) and lower triglyceride and VLDL-c and TG/HDL-c ratio (HC and ATORVA) than the 70943GG genotype ($p<0.05$). We found a linkage disequilibrium between C-14T and C-105T SNPs in HC group ($p=0.006$). Individuals carrying -105T allele (CT/TT genotypes), when compared with -105CC carriers, had lower basal concentrations of triglyceride and VLDL-c, higher concentration of HDL-c and lower TG/HDL-c ratio in HC and ATORVA groups and also higher concentration of apoA1 and lower apoB/apoA1 ratio in ATORVA group ($p<0.05$). In HC and ATORVA, individuals with -14CT+TT/-105CT+TT haplotype had lower basal values of triglyceride and VLDL-c, higher concentration of HDL-c and lower TG/HDL-c ratio than carries of others haplotypes ($p<0,05$). ABCA1 mRNA basal expression was lower in HC when compared to NL independently of high (GM1) or low (GM2) basal expression rate. This effect was associated with C-14T and G70943A SNPs. After atorvastatin treatment, mRNA expression was reduced in HC individuals carrying -14T allele in comparison with the -14C allele carriers. These results are suggestive that ABCA1 SNPs are involved on variation of serum lipid profile and mRNA expression in response to atorvastatin.

Keywords: ABCA1. Atorvastatin. Gene expression. Gene polymorphism. HDL. Pharmacogenetics.

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABCA1	<i>ATP-binding cassette A1</i>
ALT	Alanina aminotransferase
ApoA1	Apolipoproteína A1
ApoB	Apolipoproteína B
AST	Aspartato aminotransferase
ATORVA	Pacientes hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina
Bp	<i>Base pairs</i>
C	Citosina
CETP	<i>Cholesterol ester transfer protein</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CMSP	Células mononucleares de sangue periférico
CK	Creatino quinase
CT	Colesterol total
DAC	Doença arterial coronariana
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
DP	Desvio padrão
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
G	Guanina
GAPD	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
HC	Pacientes hipercolesterolêmicos
HCl	Ácido clorídrico
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HDL-c	Colesterol da HDL
HMG-CoA	3-hidróxi-3metilglutaril Coenzima A
HU	Hospital Universitário
IMC	Índice de massa corpórea
K	Lisina
KCl	Cloreto de potássio
LCAT	Lecitina Colesterol Acil Transferase
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LDL-c	Colesterol da LDL
LXR	<i>Liver-X-Receptor</i>
MGB	<i>Minor groove binder</i>

MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFQ	<i>Non-fluorescent quencher</i>
NL	Pacientes normolipidêmicos
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PLPT	<i>Phospholipid transfer protein</i>
R	Arginina
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNA _m	RNA mensageiro
RT	<i>Reverse transcription</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
T	Timina
T ₄	Tetraiodotironina
TG	Triglicerídeos
TRC	Transporte Reverso do Colesterol
TSH	<i>Thyroid-stimulating hormone</i>
UNG	Uracil N-glicosilase
USP	Universidade de São Paulo
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
VLDL-c	Colesterol da VLDL

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 CASUÍSTICA E PROTOCOLO TERAPÊUTICO	26
3.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS	27
3.3 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO	28
3.4 DETERMINAÇÕES DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	29
3.5 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE DNA GENÔMICO	31
3.6 ENSAIOS DE PCR	32
3.7 ENSAIOS DE RFLP	35
3.8 ENSAIOS DE SEQÜENCIAMENTO DE DNA	40
3.9 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO RNA TOTAL	43
3.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RNAM POR RT-PCR <i>DUPLEX</i>	44
3.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RNAM POR RT-PCR EM TEMPO REAL	49
3.12 CONTROLE DE QUALIDADE DOS ENSAIOS DE PCR-RFLP E RT-PCR	50
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	51
4 RESULTADOS	53
4.1 DADOS DOS INDIVÍDUOS DO ESTUDO	53
4.2 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS	55
4.3 RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ATORVASTATINA	56
4.4 INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS SOBRE O PERFIL LIPÍDICO SÉRICO ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM ATORVASTATINA	58
4.4.1 POLIMORFISMO R219K (G70943A)	58
4.4.2 POLIMORFISMO C-14T	62
4.4.3 POLIMORFISMO C-105T	65
4.4.4 ANÁLISE DE HAPLÓTIPOS	69
4.5 ESTUDO DA EXPRESSÃO DO RNAM DO ABCA1	75
5 DISCUSSÃO	85
6 CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
APÊNDICES	111
ANEXOS	115

1 INTRODUÇÃO

A doença arterial coronariana (DAC) é uma importante doença cardiovascular que tem elevado índice de mortalidade no mundo. De acordo com estimativas da *World Heart Federation* (2006), a doença cardiovascular é responsável, na população mundial, por 17 milhões de óbitos por ano. No Brasil (BRASIL, 2006), a mortalidade proporcional por doenças do aparelho circulatório foi de 31,5% no ano de 2003.

A relação inversa entre o colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-c) e o risco de eventos cardiovasculares tem sido bem estabelecida através de estudos epidemiológicos e clínicos (ASSMANN et al., 1996; FRICK et al., 1990; GORDON et al., 1989). Esta relação passou a ser mais largamente discutida desde a publicação dos dados do estudo de Framingham (HAYDEN; TYAGI, 2005).

Gordon e colaboradores (1989) analisaram a relação entre HDL-c e incidência de DAC em quatro estudos americanos : *Framingham Heart Study* (FHS), *Lipid Research Clinics Prevalence Mortality Follow-up Study* (LRCF), *Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial* (CPPT) e *Multiple Risk Factor Intervention Trial* (MRFIT). Os autores associaram o aumento de 1mg/dL nos valores de HDL-c com diminuição de 2% no risco de DAC em homens (FHS, CPPT, and MRFIT) e diminuição de 3% em mulheres (FHS).

A baixa concentração de HDL-c é um fator de risco independente para DAC (ASHEN; BLUMENTHAL, 2005). Em concordância com recentes estudos, a IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007) considera como baixos valores as

concentrações séricas de HDL-c inferior a 40 mg/dL em homens e 50 mg/dL em mulheres.

A principal causa de DAC é a aterosclerose, uma doença progressiva caracterizada pelo acúmulo de lipídeos e elementos fibróticos em grandes artérias (LIBBY, 2002). Em estudos com modelos animais e em humanos, foi sugerido que a HDL possui propriedades biológicas que protegem contra a aterosclerose, mantendo normal a homeostasia lipídica em macrófagos. Essa proteção resulta do papel da HDL no transporte reverso do colesterol (TRC) e em suas propriedades antioxidante, antiagregante plaquetária, antiinflamatória e imunomodulatória (HERSBERGER; VON ECKARDSTEIN, 2003; KRIMBOU; MARCIL; GENEST, 2006; LEWIS; RADER, 2005; RADER, 2006). Em particular, a função da HDL no TRC é considerada importante para prevenção de aterosclerose por transportar colesterol sintetizado ou armazenado nas células periféricas, incluindo macrófagos presentes na parede do vaso, para o fígado ou órgãos esteroidogênicos (HERSBERGER; VON ECKARDSTEIN, 2003; LEWIS; RADER, 2005; ORAM; HEINECKE, 2005).

O efluxo de colesterol celular, parte importante do TRC, pode ser realizado por mecanismos passivos ou ativos. Entre os processos ativos estão aqueles que envolvem a interação da HDL ou de polipeptídeos anfipáticos, incluindo apolipoproteínas, com os transportadores da família *ATP-binding cassette* (ABC), (CAVELIER et al., 2006).

A superfamília ABC é composta de proteínas que realizam o transporte transmembrana de uma variedade de moléculas utilizando ATP como fonte de energia (DEAN; HAMON; CHIMINI, 2001).

A ABCA1 é um transportador de membrana constituído de 2261 aminoácidos (PULLINGER et al., 2000; SANTAMARINA-FOJO et al., 2000) e

estruturalmente é dividido em duas metades similares, sendo cada metade composta por um domínio transmembrana, contendo seis hélices, e um domínio de ligação ao nucleotídeo, contendo duas regiões denominadas *Walker A* e *Walker B*, presentes em muitas proteínas que utilizam ATP, e uma região *Walker C*, presente unicamente nos transportadores ABC (**Figura 1**) (BUNGERT; MOLDAJ; MOLDAJ, 2001; DEAN; HAMON; CHIMINI, 2001; HAMON; CHAMBENOIT; CHIMINI, 2002; ORAM; HEINECKE, 2005).

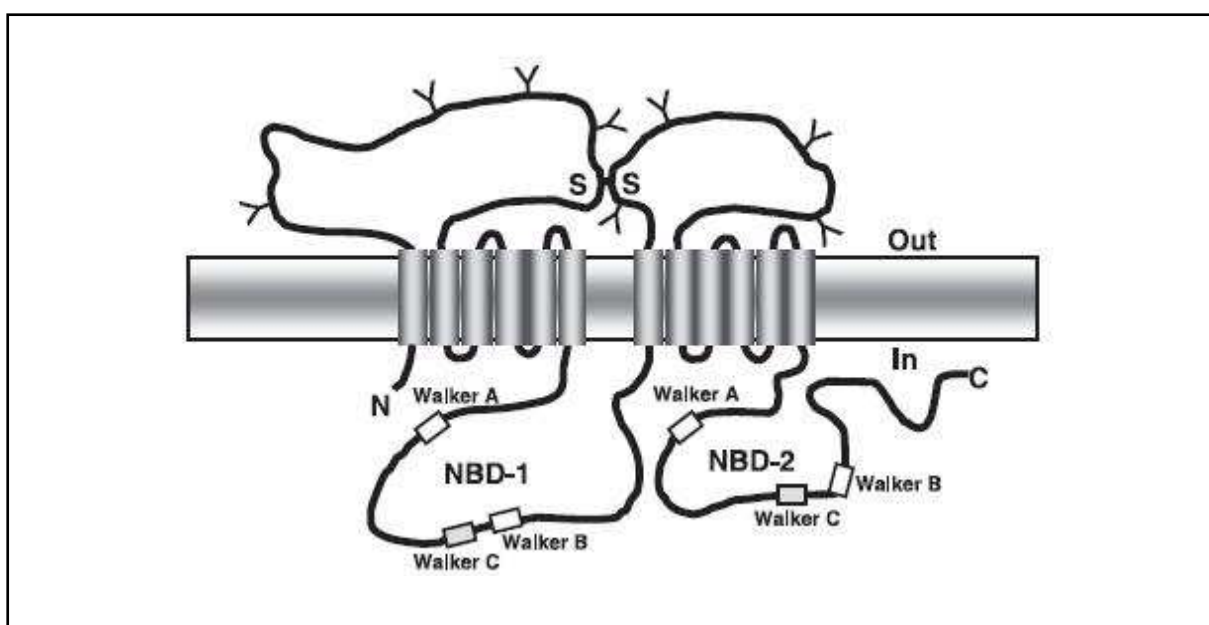


Figura 1. Modelo estrutural da proteína ABCA1

Fonte: ORAM; HEINECKE, 2005.

A proteína ABCA1 foi relatada pela primeira vez por Luciani e colaboradores (1994), mas a sua identificação como um importante regulador do metabolismo da HDL ocorreu cinco anos depois com a descoberta de que mutações do gene ABCA1 resultam na doença de Tangier (BODZIOCH et al., 1999; BROOKS-WILSON et al., 1999; REMALEY et al., 1999; RUST et al., 1999). Esta é uma rara doença autossômica recessiva, com cerca de 100 casos descritos na literatura, e caracterizada por quase completa ausência de HDL plasmática, pelo acúmulo de

ésteres de colesterol em vários tecidos, notavelmente no fígado, baço, tonsilas e mucosa intestinal, e, freqüentemente, por DAC prematura (BODZIOCH et al., 1999; BROOKS-WILSON et al., 1999; BRUNHAM; SINGARAJA; HAYDEN, 2006; NOFER; REMALEY, 2005; ORAM, 2000). Mutações do gene ABCA1 também podem resultar em Hipoalfalipoproteinemia Familiar (HAF), que é caracterizada por baixas concentrações plasmáticas de HDL-c e ausência das manifestações clínicas da doença de Tangier (BROOKS-WILSON et al., 1999).

Em estudo com camundongos transgênicos que expressam ABCA1 humana, Singaraja e colaboradores (2001) verificaram que o aumento de expressão desta proteína resultou em aumento do efluxo de colesterol em diferentes tecidos e elevação das concentrações de HDL-c, apoAI e apoAII (apolipoproteína AII). Estes dados são consistentes com outros estudos que mostram que a ausência de ABCA1 em camundongos resultou em drástica deficiência de HDL-c e apoAI, além de produzir um fenótipo similar ao observado em humanos com doença de Tangier (AIELLO; BREES; FRANCONI, 2003; MCNEISH et al., 2000). Franconi e colaboradores (2003) realizando estudos como estes, sugerem que a ausência de ABCA1 altera a estabilidade metabólica e a maturação da HDL.

O transportador ABCA1 é um componente crítico na formação da HDL e no efluxo celular de fosfolípidos e colesterol para apolipoproteínas, especialmente a apolipoproteína-AI (apoAI), a principal constituinte da partícula de HDL (ASZTALOS, 2004; CAVELIER et al., 2006; KRIMBOU; MARCIL; GENEST, 2006; LEE; PARKS, 2005).

Dois modelos têm sido propostos para explicar o mecanismo pelo qual a ABCA1 transfere fosfolípidos e colesterol livre para a apoAI livre ou pobremente associada a lipídeos. No primeiro modelo (**Figura 2A**) o efluxo lipídico ocorre por

exocitose. Colesterol livre, derivado da hidrólise de ésteres de colesterol, e fosfolípidos intracelulares são empacotados em vesículas de transporte, através do complexo de Golgi, e translocados para sítios na membrana plasmática contendo a proteína ABCA1 (CAVELIER et al., 2006; LEE; PARKS, 2005; ORAM, 2002; ORAM; HEINECKE, 2005). Em seguida, os lipídeos são transportados através da membrana plasmática e, através de interações com a apoA1 são removidos da célula, formando partículas nascentes de HDL.

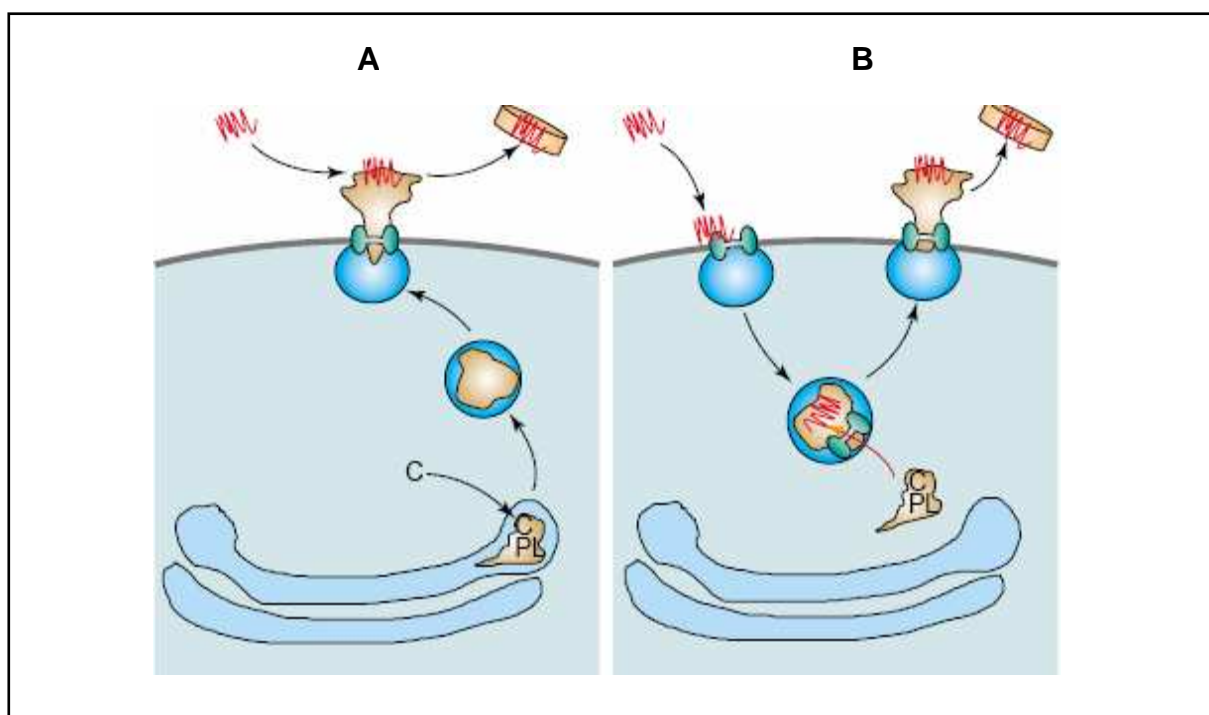


Figura 2. Modelos para o efluxo de lipídeos mediado pela ABCA1
(A) Mecanismo de efluxo lipídico por exocitose. (B) Mecanismo de efluxo por retroendocitose.

Nota: Em vermelho: apoA1; em verde: ABCA1. C, colesterol; PL, fosfolípidos.

Fonte: ORAM, 2002.

Alternativamente, no segundo modelo (**Figura 2B**), denominado retroendocitose, a apoA1 é interiorizada com a ABCA1, via endocitose, interage com *pools* lipídicos intracelulares para adquirir fosfolípidos e colesterol livre e o complexo apolipoproteína-lipídeos é liberado da célula após fusão da vesícula com a

membrana plasmática (CAVELIER et al., 2006; LEE; PARKS, 2005; ORAM, 2002; ORAM; HEINECKE, 2005). Neste modelo, alguns autores questionam se a ABCA1 influencia a endocitose da apoA1 diretamente ou indiretamente, por sinalização de outros receptores endocíticos (CAVELIER et al., 2006).

As partículas de HDL nascentes sofrem em seguida várias modificações em uma série complexa de passos para aquisição de mais lipídeos e proteínas. Uma destas modificações é a esterificação do colesterol livre, pela enzima lecitina colesterol acil transferase (LCAT), e sua transferência para o centro lipídico da partícula de HDL, formando partículas esféricas maduras conhecidas como HDL₃ (menor e mais densa) e HDL₂ (maior e menos densa) (HERSBERGER; VON ECKARDSTEIN, 2003; LINSEL-NITSCHKE; TALL, 2005; RADER, 2006).

É importante ressaltar que os precursores da HDL também podem ser produzidos a partir do metabolismo de quilomícrons ou da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), durante o processo de lipólise mediada pela lipase lipoproteica (LPL), ou ainda a partir da interconversão de HDL₂ e HDL₃ (HERSBERGER; VON ECKARDSTEIN, 2003).

O processamento e remodelamento das partículas de HDL maduras na circulação ocorrem por vários processos combinados. Proteínas de transferência de lipídeos, como a proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) e a proteína de transferência de fosfolipídeos (PLPT), lipases, como a lipase hepática (HL) e a lipase endotelial (EL), receptores de superfície celular, como o receptor *scavenger* BI (SR-BI), e as lipoproteínas não-HDL realizam ações determinantes do destino metabólico da HDL (HERSBERGER; VON ECKARDSTEIN, 2003; KWITEROVICH JUNIOR, 2000; LEWIS; RADER, 2005; RADER, 2007).

Aproximadamente 50% da variabilidade plasmática de HDL-c é determinada por fatores genéticos, mas a identificação destes fatores tem sido difícil (BRUNHAM; SINGARAJA; HAYDEN, 2006; PAJUKANTA, 2004). Entretanto, uma busca extremamente útil das variantes genéticas envolvidas no metabolismo da HDL tem sido o estudo de formas mendelianas raras de deficiência de HDL, como aquelas envolvendo os genes *LCAT*, *APOA1* e *ABCA1* (BRUNHAM; SINGARAJA; HAYDEN, 2006; PAJUKANTA, 2004).

O gene que codifica a *ABCA1* está localizado no cromossomo 9 e é composto por 50 éxons, sendo que 49 éxons são codificadores da proteína (DEAN; HAMON; CHIMINI, 2001; SANTAMARINA-FOJO et al., 2000). O gene *ABCA1* é largamente expresso em tecidos animais (KIELAR et al., 2001; WELLINGTON et al., 2002). Em humanos, Kielar e colaboradores (2001) verificaram maior abundância de RNAm do *ABCA1* no fígado, placenta, intestino delgado, pulmão e estômago. Além disso, esses autores realizaram estudo com cultura de células humanas e verificaram o aumento de expressão deste gene na diferenciação de monócitos e constataram que macrófagos carregados com lipoproteína de baixa densidade (LDL) modificada enzimaticamente (E-LDL) mostram maior expressão de RNAm do *ABCA1* do que qualquer tecido humano analisado.

A indução da transcrição do *ABCA1* em células carregadas com colesterol é consistente com o fato de que o transportador *ABCA1* está envolvido com a secreção do excesso de colesterol celular (LANGMANN, et al 1999; ORAM, 2002). O aumento de expressão de *ABCA1* resulta da ativação do receptor nuclear *liver-X-receptor* ($LXR\alpha/\beta$) por oxisteróis, gerados a partir do colesterol e em sua maioria por enzimas do citocromo P450 (BJORKHEM, 2002; DENIS et al., 2003; FU et al., 2001; RUSSELL, 2000; SCHMITZ; LANGMANN, 2005). O LXR forma heterodímeros

com o *retinoid-X-receptor* (RXR) que se ligam em elementos responsivos, presentes na região promotora e no primeiro íntron do gene ABCA1, aumentando a transcrição deste gene (DENIS et al., 2003; SCHMITZ; LANGMANN, 2005). O LXR também regula vários outros genes envolvidos na homeostasia do colesterol, como o gene da ABCG1, ABCG5, ABCG8, SREBP-1c (*sterol regulatory element binding protein 1c*), CETP, PLPT, entre outros (EDWARDS; KENNEDY; MAK, 2002; TALL; COSTET; WANG, 2002).

Várias outras substâncias naturais ou sintéticas e reguladores metabólicos, como ligantes de PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*), hormônios, citocinas e drogas, também influenciam a transcrição do ABCA1, sugerindo um sofisticado mecanismo transcricional para este gene (SCHMITZ; LANGMANN, 2005). Além disso, a presença de regulação pós transcricional faz com que a quantidade de proteína ABCA1 nas células nem sempre seja correlacionada com a quantidade de RNAm expresso (FORCHERON et al., 2005; WELLINGTON et al., 2002).

Até o momento foram encontrados mais de 70 mutações e numerosos polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*, SNP) no gene ABCA1 (ATTIE, 2007; BRUNHAM; SINGARAJA; HAYDEN, 2006; IIDA et al., 2001). Entre esses polimorfismos, um dos mais estudados é a substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A) na posição 70943 do gene (éxon 7), que resulta na troca de uma arginina (R) por lisina (K) no resíduo de aminoácido de número 219, localizado no domínio extracelular da proteína (BENTON et al., 2006; HODOGLUGIL et al., 2005).

O polimorfismo G70943A (R219K) foi associado com proteção contra o risco de DAC e de infarto do miocárdio, com menor gravidade de DAC e com menor

prevalência de calcificação coronariana (BENTON et al., 2006; BERTOLINI et al., 2004; CENARRO et al., 2003; CLEE et al., 2001; EVANS; BEIL, 2003; TREGOUET et al., 2004). Esta proteção parece estar relacionada com aumento da concentração de HDL-c e/ou diminuição de triglicérides na presença da variante 219K (BENTON et al., 2006; CLEE et al., 2001; MANTARING et al., 2007; YAMAKAWA-KOBAYASHI et al., 2004), mas estes resultados não foram reproduzidos em todos os trabalhos (BERTOLINI et al., 2004; CENARRO et al., 2003; SALEHEEN et al., 2007).

Outro SNP, o C-14T (anteriormente denominado C69T), localizado na região promotora do *ABCA1*, foi associado com aumento de eventos coronarianos e progressão da aterosclerose sem, contudo, estar associado com alterações nos lipídeos séricos em homens holandeses com DAC (ZWARTS et al., 2002). Tan e colaboradores (2003) estudaram a população masculina de três etnias residentes em Cingapura e observaram que o SNP C-14T foi relacionado ao aumento de risco de DAC em indianos, em amostras de caso e controle, e ao aumento de HDL-c em chineses saudáveis. A associação do SNP C-14T com aumento de HDL-c também foi descrita na população turca, sendo esta associação verificada apenas em homens (HODOGLUGIL et al., 2005).

Vários outros polimorfismos do *ABCA1* também têm sido associados a alterações no perfil lipídico e risco de DAC. Variantes como V771M, V825I e I883M têm sido associadas a aumento de HDL-c, diminuição de triglicérides (I883M) e aumento de apoA1 (V771M) (BRUNHAM; SINGARAJA; HAYDEN, 2006; SINGARAJA et al., 2003). Os SNPs E1172D e R1587K foram relacionados à diminuição de HDL-c e os SNPs como o C-565T e G-278C (também denominados C-477T e G-191C) foram associados com diferenças na gravidade de DAC (KYRIAKOU et al., 2005; SINGARAJA et al., 2003).

A hipercolesterolemia é um importante fator de risco para aterosclerose (LINTON; FAZIO, 2003) e mudanças no estilo de vida são recomendadas para reduzir a colesterolemia e, conseqüentemente, diminuir o risco de doenças cardiovasculares. Tais mudanças incluem: redução de ingestão de gordura saturada e de colesterol, redução de peso e prática de atividade física regular (GRUNDY, 2001). Entretanto, essas condutas nem sempre são eficazes e há necessidade de intervenção farmacológica com medicamentos hipocolesterolemiantes, sendo as vastatinas os mais largamente utilizados devido ao seu potente efeito hipocolesteremiante.

As vastatinas são potentes inibidores da 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A (HMGCoA) redutase que é a enzima chave na síntese de colesterol (VAUGHAN; GOTTO JUNIOR, 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 LDL e, com isso, há o aumento da captação de partículas de LDL pelas células hepáticas e extra-hepáticas, reduzindo a colesterolemia (BROWN; GOLDSTEIN, 2004).

A atorvastatina é um inibidor sintético reversível da HMG-CoA redutase, administrado via oral como sal cálcico da forma ativa hidróxi-ácida

(JACOBSEN et al., 2000; LENNERNAS, 2003). Ela é biotransformada primariamente por enzimas de fase I do citocromo P450, no intestino e no fígado (LENNERNAS, 2003). 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 droga é realizado pelos transportadores de fase III, representados principalmente pela glicoproteína P, uma outra proteína da família ABC (BOGMAN et al., 2001; CHEN et al., 2005).

De um modo geral, as vastatinas têm um poder de ação relativamente fraco para aumentar a HDL plasmática. Em um estudo comparativo entre sinvastatina e atorvastatina, em doses equipotentes, a sinvastatina mostrou uma elevação da HDL plasmática significativamente maior que a atorvastatina. Contudo, em doses elevadas de atorvastatina, ao contrário da sinvastatina, a HDL plasmática diminuiu como resultado da diminuição da expressão de apoA1 (TOTH, 2001). A heterogeneidade de respostas observadas em monoterapias com vastatinas, com relação ao HDL-c plasmático, pode ser uma possível explicação para o fato de alguns pacientes em tratamento com vastatinas terem eventos coronarianos, apesar da redução nas concentrações de LDL-c (ASZTALOS, 2004).

Os estudos são conflitantes quanto aos efeitos das vastatinas na modulação da expressão do *ABCA1*. Em células de hepatoma de rato (Fu5AH) a pitavastatina e a compactina induziram efluxo de colesterol e fosfolípidos para a apoA1 (ZANOTTI et al., 2004), enquanto que em células humanas de hepatoma, HepG2, a pitavastatina e a fluvastatina aumentaram a expressão de RNAm do gene da *ABCA1* (MAEJIMA et al., 2004; SONE et al., 2004). Ando e colaboradores (2004), no

entanto, não constatarem alterações de expressão de RNAm do *ABCA1* e de proteína quando estudaram células HepG2 tratadas com pravastatina.

Em macrófagos murinos e humanos, (RAW264.7, THP-1 e HMDM - *Human monocyte-derived macrophages*) várias vastatinas regularam negativamente a expressão de *ABCA1* (ANDO et al., 2004; SONE et al., 2004; WONG; QUINN; BROWN, 2004) e a compactina também diminuiu o efluxo de colesterol em macrófagos THP-1 e HMDM (WONG; QUINN; BROWN, 2004). No entanto, Argmann e colaboradores (2005) mostraram um aumento de efluxo de colesterol para a apoA1 em macrófagos THP-1 induzido pela sinvastatina e pela atorvastatina, sendo que esta última também aumentou a expressão de RNAm do *ABCA1*.

Em células Swiss 3T3 (linhagem celular de fibroblastos de camundongo) e em HEK293 (célula humana embrionária de rim 293) não foram detectadas nenhuma alteração de expressão de RNAm do *ABCA1* após incubação com fluvastatina (SONE et al., 2004). E em um estudo *in vivo* publicado, Ando e colaboradores (2004) verificaram que a pravastatina não alterou a expressão do *ABCA1* e nem a concentração da proteína em leucócitos e no fígado de camundongos.

Considerando o papel crítico da *ABCA1* na formação da partícula de HDL, que é um importante marcador de risco de doenças cardiovasculares e possível alvo terapêutico, é de grande interesse avaliar, na nossa população, os efeitos de polimorfismos genéticos e da expressão gênica da *ABCA1* no metabolismo do colesterol e na variabilidade de resposta ao tratamento com atorvastatina.

2 OBJETIVOS

- 2.1 Determinar as freqüências genóticas de polimorfismos do *ABCA1* em indivíduos hipercolesterolêmicos e normolipidêmicos.
- 2.2 Avaliar os efeitos de polimorfismos do *ABCA1* sobre a expressão gênica e sobre o perfil lipídico sérico de indivíduos hipercolesterolêmicos e normolipidêmicos.
- 2.3 Avaliar a influência dos polimorfismos do *ABCA1* sobre o perfil lipídico sérico após o tratamento com atorvastatina.
- 2.4 Analisar o efeito da atorvastatina sobre a expressão de RNAm do *ABCA1* em células mononucleares de sangue periférico de indivíduos hipercolesterolêmicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA E PROTOCOLO TERAPÊUTICO

Foram selecionados para o estudo 367 indivíduos, de ambos os gêneros, com idades entre 29 e 81 anos. Desses indivíduos, 224 são hipercolesterolêmicos (HC), com hipercolesterolemia primária segundo os critérios da 3^a Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias (SANTOS; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2001) e sem uso de medicação hipolipemiante, e 143 são normolipidêmicos (NL). Os indivíduos foram selecionados na Seção de Lipoproteínas do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) de São Paulo (HC, n= 76), no período de 2002 a 2004, e na Divisão de Clínica Médica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP) (HC, n=148; NL, n=143), de 2004 a 2007.

Os indivíduos foram informados sobre o protocolo do estudo que foi previamente aprovado pelos comitês de ética das instituições envolvidas (HU/USP, IDPC e Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, **Anexo C**) e somente participaram os que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Nesse momento, foram obtidos os dados de etnia, sexo, idade, peso, altura, menopausa, tabagismo, hipertensão, história familiar de DAC, prática de exercícios físicos e medicações em uso.

Indivíduos com índice de massa corpórea (IMC) igual ou superior a 30kg/m² foram classificados como obesos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000) e aqueles que apresentaram pressão sistólica/diastólica igual ou

superior a 140/90 mmHg ou estavam sob tratamento anti-hipertensivo foram considerados hipertensos (ARTERIAL HYPERTENSION WORK GROUPS, 2004). A etnia foi autodeclarada e os indivíduos que se autodenominaram pardos ou negros foram incluídos em um único grupo.

Foram excluídos do estudo indivíduos com distúrbios da tireóide, diabetes melito, doenças hepática e renal graves conhecidas antes ou após avaliação laboratorial. Indivíduos que se declararam orientais, indivíduos com doenças cardiovasculares, mulheres grávidas ou em uso de contraceptivos orais não participaram do estudo.

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

Dentre os 224 indivíduos HC, 141 foram tratados com atorvastatina (ATORVA) e 83 não foram tratados por não atenderem os critérios para o tratamento farmacológico.

3.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Foram coletadas amostras de sangue, após jejum de 12 a 14 horas, no período basal e após o tratamento com atorvastatina. Foram obtidos 15 mL de sangue, em tubo com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, 1 mg/mL de

sangue), para extração de DNA e RNA. Foram também obtidos cerca de 9 mL de sangue para a determinação de concentrações séricas de colesterol total e frações, triglicerídeos, apolipoproteína A1 (apoA1), apolipoproteína B (apoB), TSH (hormônio estimulante da tireóide), T4 livre (tetraiodotironina ou tiroxina livre), glicose, uréia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e creatino quinase (CK).

As concentrações séricas de colesterol total e frações, triglicerídeos, apoA1 e apoB foram utilizadas a fim de avaliar a resposta terapêutica a atorvastatina. A avaliação de TSH e T4 livre foi utilizada para exclusão de pacientes com hipo ou hipertireoidismo. A glicemia foi determinada para excluir os indivíduos com diabetes melito. A dosagem de uréia e creatinina e avaliação da atividade das enzimas ALT e AST foram utilizadas para exclusão de pacientes com lesão renal e/ou hepática, respectivamente. As atividades das enzimas ALT e CK foram utilizadas para monitorar o aparecimento de hepatotoxicidade e miotoxicidade, as duas principais reações adversas do tratamento com atorvastatina (BELLOSTA; PAOLETTI; CORSINI, 2004).

3.3 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Neste estudo, foi utilizada a linhagem de células imortalizadas Caco-2, isolada de adenocarcinoma colorretal, que foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Essa linhagem celular foi utilizada como calibrador nas análises de expressão do RNAm do *ABCA1* utilizando PCR em tempo real.

Para garantir a homogeneidade das características morfofisiológicas, as células Caco-2 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 (*Dulbecco's modified Eagle medium*) (pH 7,4) com 10% de soro fetal bovino, a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de gás carbônico. 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 10×10^5 células por mL, uma vez por semana.

3.4 DETERMINAÇÕES DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

As concentrações séricas de colesterol total e triglicerídeos foram determinadas por métodos enzimáticos-colorimétricos (FOSSATI; PRENCIPE, 1982; SIEDEL et al., 1983) utilizando conjuntos diagnósticos (Siemens Medical/Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY, EUA), em analisador automático Advia 1650[®] (Siemens Medical/Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY, EUA). A determinação de HDL-c foi realizada por método enzimático (NAUCK; MARZ; WIELAND, 1998) com o conjunto diagnóstico da DiaSys[®] (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Alemanha). As concentrações séricas de colesterol da VLDL (VLDL-c) e de LDL-c foram calculadas segundo a fórmula de Friedewald e colaboradores (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972) para valores de triglicerídeos inferiores a 400 mg/dL. Nenhum paciente apresentou concentração sérica de triglicerídeos superior a esse valor.

As atividades das enzimas (ALT, AST e CK) e a concentração de uréia foram determinadas por métodos cinéticos (BERGMEYER; SCHEIBE; WAHLFELD, 1978; HORDER et al., 1991; TALKE; SCHUBERT, 1965). As dosagens de glicose e creatinina foram realizadas por métodos enzimáticos-colorimétricos (FABINY; ERTINGSHAUSEN, 1971; TRINDER, 1969). Estas análises também foram realizadas em analisador automático Advia 1650[®] (Siemens Medical/Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY, EUA).

As determinações de T4 livre e TSH foram realizadas por imunensaio competitivo e método imunométrico, respectivamente (HAY et al., 1991; WITHERSPOON et al., 1988a, 1988b) utilizando conjuntos diagnósticos e analisador automático Immulite 2000[®] (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 IDPC. 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 (SBAC), e o IDPC, do Programa de Excelência para Laboratórios Médicos (PELM) da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC).

Amostras de soro foram enviadas ao Laboratório Álvaro, em Cascavel no estado do Paraná, para determinação das concentrações de apoAI e apoB por métodos nefelométricos (RIFAI; KING, 1986) utilizando conjuntos diagnósticos da Dade Behring (Dade Behring GmbH, Marburg, Alemanha), em analisador automático BN II[®] (Dade Behring GmbH, Marburg, Alemanha). Este laboratório é membro participante dos programas PNCQ e PELM.

A presença de LDL pequena foi estimada pela razão triglicérides/HDL-c (TG/HDL-c) (MARUYAMA; IMAMURA; TERAMOTO, 2003)

e o risco para DAC foi avaliado através da relação apoB/apoAI (THOMPSON; DANESH, 2006; WALLDIUS et al., 2004).

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 10 mmoles/L (pH 8,0), KCl a 10 mmoles/L; MgCl₂ a 10 mmoles/L e EDTA a 2 mmoles/L] adicionado de Triton X-100 a 2,5%. Posteriormente, os núcleos celulares foram lisados com tampão Tris-2 (Tris-HCl a 10 mmoles/L, pH 8,0, KCl a 10 mmoles/L, MgCl₂ a 10 mmoles/L, EDTA a 2 mmoles/L pH 8,0 e NaCl a 0,4 moles/L) adicionado de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%. A seguir, foi adicionado NaCl a 5moles/L e a suspensão foi centrifugada durante 5min a 12000rpm. Ao sobrenadante, foi adicionado 1mL de etanol absoluto e o DNA precipitado foi centrifugado durante 5min a 12000rpm, lavado com etanol 70% e ressuspendido em tampão TE pH 8,0 [Tris-HCl a 10 mmoles/L e EDTA 1 mmol/L (pH 8,0)]. As amostras de DNA foram 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 45 mmoles/L, ácido bórico a 45 mmoles/L e EDTA a 1 mmol/L (pH 8,0)] (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A separação eletroforética foi realizada a 100 V, 60 mA, por 30 min, em cuba de eletroforese horizontal (Gibco BRL Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA) e fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra). Como referência foi utilizado um marcador de

tamanho molecular de DNA de 1000 bp (1Kb) (Invitrogen Corporation, CA, EUA).

As bandas eletroforéticas foram visualizadas sob luz ultravioleta, após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/mL) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem 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 *ABCA1* foram estudados: C-14T (região promotora), C-105T (região promotora) e G70943A (R219K, éxon 7). A nomenclatura dessas regiões polimórficas está de acordo com a seqüência disponível (número de acesso AF275948) no Banco de genes (*GenBank*) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (USA, 2007).

As 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 ensaios de seqüenciamento de DNA.

Para os ensaios de PCR dos SNPs foram desenhados iniciadores com auxílio do programa Primer Premier® v.5.0 (PREMIER Biosoftware International, CA, EUA). Para essa finalidade, utilizou-se a seqüência disponível citada acima. Para as reações de seqüenciamento dos SNPs C-14T e C-105T foram

utilizados os mesmos iniciadores desenhados para os ensaios de PCR. Na **Tabela 1**, estão descritos os iniciadores utilizados nos ensaios de PCR-RFLP e seqüenciamento de DNA.

Tabela 1 – Iniciadores utilizados nos ensaios de PCR e seqüenciamento de DNA

Polimorfismos	Métodos	Seqüências dos Iniciadores	Tamanho do Produto de PCR
C-14T e C-105T	PCR-RFLP e Seqüenciamento	<i>Sense</i> : 5'-CTCCACGTGCTTTCTGCTGA-3' <i>Antisense</i> : 5'-CACTCACTCTCGCTCGCAAT-3'	173 bp
R219K (G70943A)	PCR-RFLP	<i>Sense</i> : 5'-GAAGAGATGATTCAACTTGGTGAC-3' <i>Antisense</i> : 5'-GCCCAAAGTCTGAAAGAACAC-3'	295 bp

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.

Nos ensaios de PCR, foram utilizados 50 a 100 ng de DNA genômico, iniciadores a 200 nmoles/L (Invitrogen Corporation, CA, EUA), desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) a 200 µmoles/L (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra), DNA polimerase 0,5 a 1 U e tampão de PCR [Tris-HCl a 75 mmoles/L (pH 9,0), MgCl₂ a 2 mmoles/L, KCl a 50 mmoles/L, sulfato de amônio a 20 mmoles/L] (Biotools, Madrid, Espanha), em volume final de 50 µL completado com água MilliQ autoclavada.

Os ensaios de PCR foram realizados utilizando-se termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., MA, EUA), sob as seguintes condições: etapa inicial a 98°C por 3

min (desnaturação inicial); amplificação por 29-32 ciclos a 94°C por 45 s a 1 min (desnaturação), 57,4 a 58,0°C por 1 min e 30 s a 2 min (hibridização dos iniciadores) e 72°C por 1 min a 1 min e 30 s (extensão); etapa final a 72°C por 10 min (extensão final).

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5X e analisados conforme descrito no item 3.5. Como referência foi utilizado um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp (Invitrogen Corporation, CA, EUA).

O ensaio de PCR para o polimorfismo *ABCA1* R219K foi otimizado com 100 ng de DNA genômico e 1 U de DNA polimerase (Biotools, Madrid, Espanha). A reação mostrou melhor eficiência com 32 ciclos de amplificação com a etapa de desnaturação a 94°C por 45 s, hibridização a 58°C por 1 min e 30 s e etapa de extensão a 72°C por 1 min e 30 s . O produto gerado tem tamanho de 295 bp (**Figura 3**).

Nos ensaios de PCR dos polimorfismos C-14T e C-105T, foram utilizados 50 ng de DNA genômico e 0,5 U DNA polimerase (Biotools, Madrid, Espanha). O ensaio apresentou condições ótimas em 29 ciclos de amplificação com etapa de desnaturação a 94°C por 1 min, hibridização a 57,4°C por 2 min e etapa de extensão a 72°C por 1 min. O produto gerado tem tamanho de 173 bp (**Figura 4**).

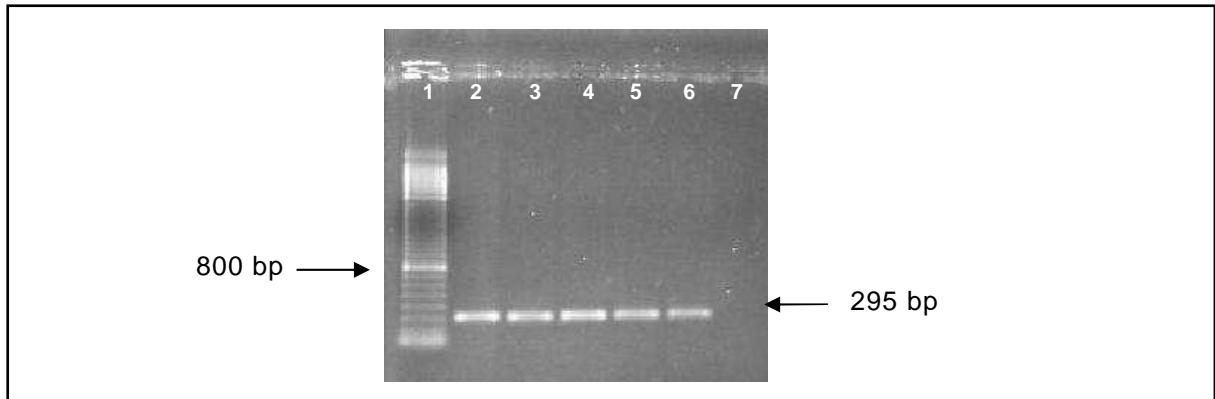


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose a 1% de produtos de PCR do SNP R219K

Nota: Linha 1: marcador de tamanho molecular de DNA de 100bp. Linha 2 a 6: produtos de PCR. Linha 7: controle negativo.

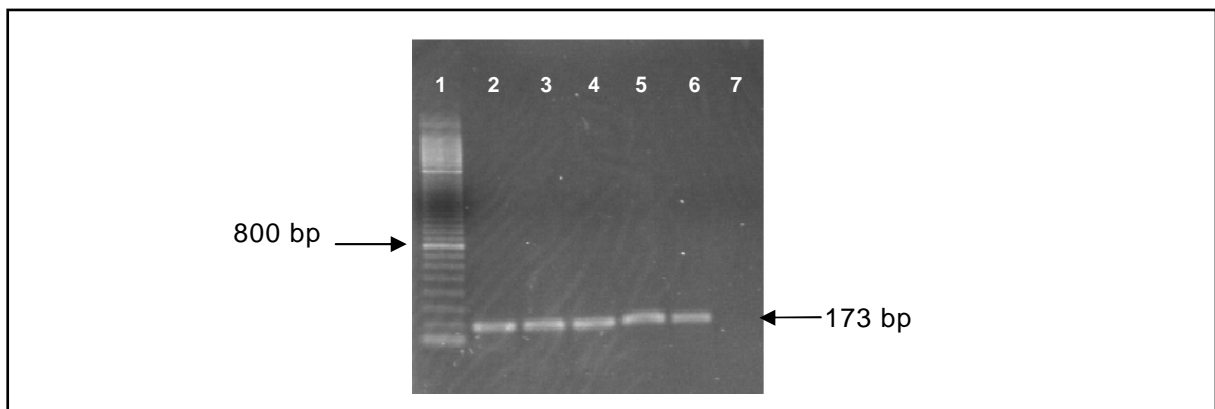


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR dos SNPs C-14T e C-105T

Nota: Linha 1: marcador de tamanho molecular de DNA de 100bp. Linha 2 a 6: produtos de PCR. Linha 7: controle negativo.

3.7 ENSAIOS DE RFLP

Os alelos dos SNPs C-14T, C-105T e R219K foram identificados por RFLP. Os produtos de PCR foram digeridos com enzimas de restrição, específicas para análise de cada polimorfismo. Os ensaios de digestão enzimática foram realizados por 4 h, em banho de água (FANEM Ltda., São Paulo, SP, Brasil) a 37 ou 55°C, em volume final de reação de 20 μ L.

Os produtos de restrição foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, em TBE 1 X (Tris-HCl 90 mmoles/L, ácido bórico 90 mmoles/L e EDTA 2 mmoles/L (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, Buckinghamshire, Inglaterra) a 120 V, 16 mA durante 4 h. Foi utilizado marcador de tamanho molecular de 10 bp (Invitrogen Corporation, CA, EUA) para monitorar o tamanho dos fragmentos gerados pela restrição enzimática.

O gel foi, posteriormente, corado com nitrato de prata (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e documentado por meio de sistema de digitalização de imagem (HP Scan Jet 3400C, Hewlett-Packard®, Hong Kong, China).

A digestão do produto de PCR do SNP R219K foi realizada com 5 U da enzima de restrição *StyI* (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, EUA), a 37°C, gerando fragmentos com tamanhos de 183, 131, 112 e 52 bp (**Figura 5**). O fragmento de 112 bp é gerado pela presença do sítio constitutivo e visualizado em todas as amostras.

O SNP C-14T, inicialmente, foi digerido com 5 U da enzima *MspI* (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, EUA), a 37°C, originando os fragmentos de 128, 92, 45 e 36 bp. O fragmento de 45 bp era gerado pelo sítio constitutivo e visualizado em todas as amostras, conforme o esquema representado na **Figura 6A**. No entanto, a digestão enzimática deste SNP com *MspI* revelou um padrão de bandas diferente do esperado em algumas amostras (**Figura 6B**).

As amostras com perfil RFLP diferente foram então seqüenciadas e os resultados mostraram um polimorfismo, até então não descrito na literatura, no local proposto como sítio constitutivo da estratégia inicialmente desenhada

para o SNP C-14T. Este novo polimorfismo foi denominado C-105T, de acordo com o sítio de início da transcrição descrito por Santamarina-Fojo e colaboradores (2000) e disponível no Banco de genes do NCBI (número de acesso AF275948) (USA, 2007).

Foram então desenhadas novas estratégias de RFLP para identificação dos alelos dos polimorfismos C-14T e C-105T, utilizando os mesmos iniciadores já descritos. Os alelos do polimorfismo SNP C-105T foram identificados após digestão enzimática dos produtos de PCR com 4 U da enzima *A/wNI* (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, EUA), a 37°C, e os fragmentos gerados continham 173, 129 e 44 bp (**Figura 7A**). Para o SNP C-14T a reação de digestão enzimática foi realizada com 15 U da enzima de restrição *BsmAI* (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, EUA), a 55°C, gerando fragmentos com tamanhos de 173, 139 e 34 bp (**Figura 7B**). Na **Tabela 2**, são apresentados os tamanhos dos fragmentos dos produtos de restrição para os SNPs do *ABCA1*.

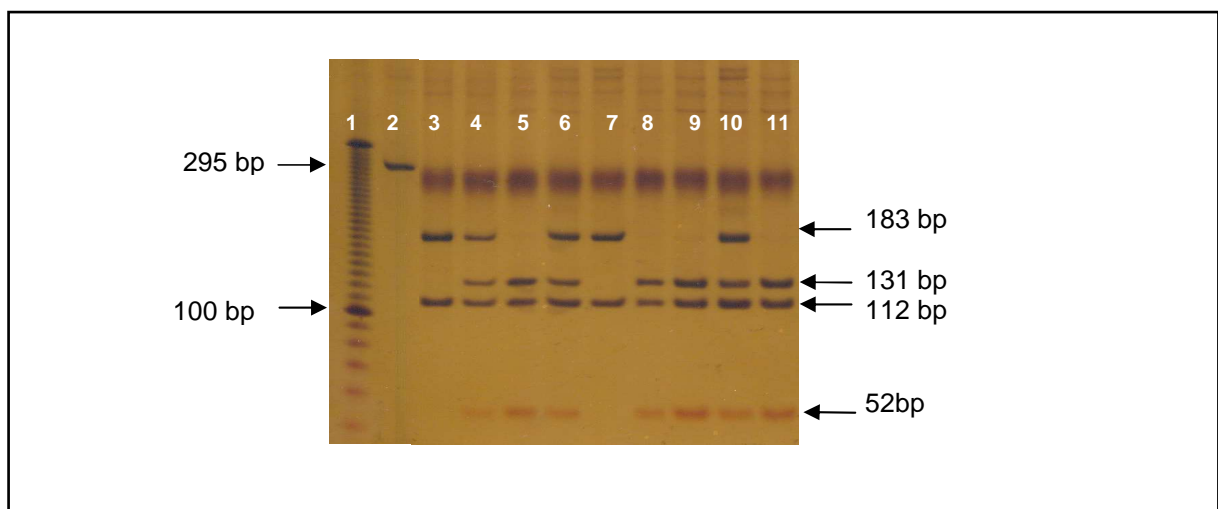


Figura 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata, dos produtos de restrição do SNP *ABCA1* G70943A (R219K) com a enzima de restrição *StyI*

Nota: Linha 1: marcador de tamanho molecular de DNA de 10 bp. Linha 2: produto de PCR. Linhas 3 e 7: genótipo AA. Linhas 4, 6 e 10: genótipo GA. Linhas 5, 8, 9 e 11: genótipo GG.

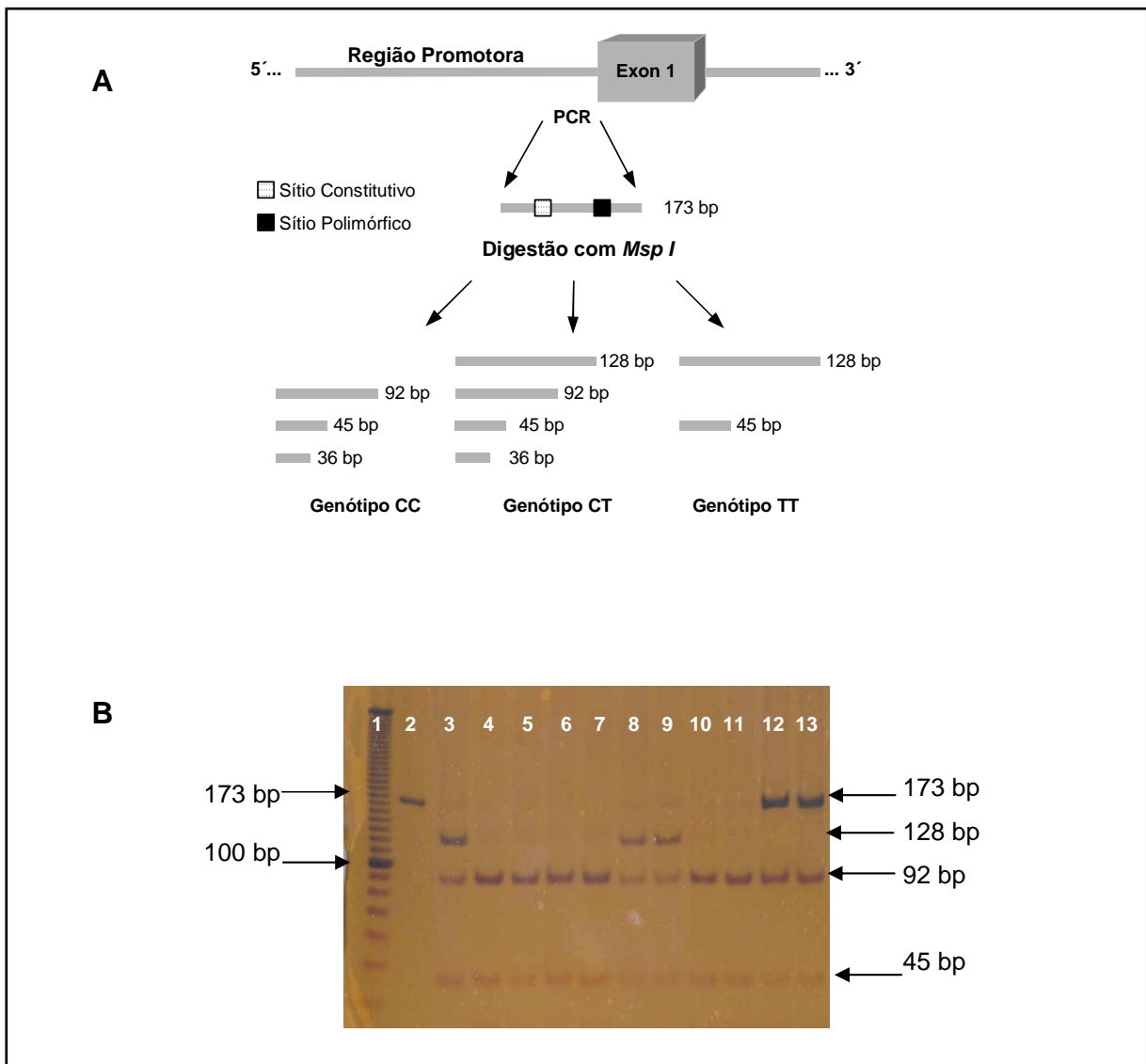


Figura 6. Análise de RFLP do polimorfismo *ABCA1* C-14T com a enzima *MspI*
 (A) Esquema representativo da digestão enzimática do produto de PCR. (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata, dos produtos de restrição do SNP.

Nota: (B) Linha 1: marcador de tamanho molecular de DNA de 10 bp. Linha 2: produto de PCR. Linhas 3, 8 e 9: genótipo esperado CT. Linhas 4 a 7, 10 e 11: genótipo esperado CC. Linhas 12 e 13: fragmentos não esperados para a digestão. Genótipo esperado TT não é mostrado na figura.

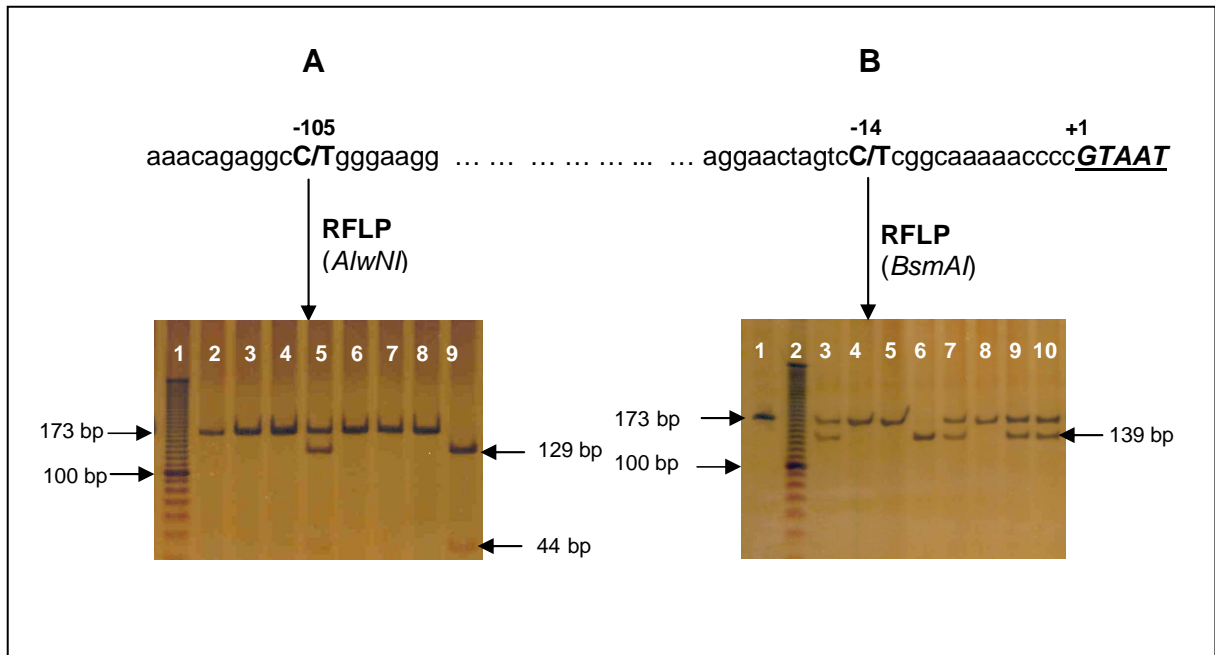


Figura 7. Representação esquemática da identificação dos polimorfismos *ABCA1* C-14T e C-105T por RFLP
(A) SNP *ABCA1* C-105T. (B) SNP *ABCA1* C-14T.

Nota: (A) Linha 1: marcador de tamanho molecular de DNA de 10 bp. Linha 2: produto de PCR. Linhas 3, 4, 6 a 8: genótipo CC. Linha 5: genótipo CT. Linha 9: genótipo TT.
(B) Linha 1: produto de PCR. Linha 2: marcador de tamanho molecular de DNA de 10 bp. Linhas 3, 7, 9 e 10: genótipo CT. Linhas 4, 5 e 8: genótipo CC. Linha 6: genótipo TT.
O sítio de início da transcrição está indicado (G^{+1}) (SANTAMARINA-FOJO et al., 2000).

Tabela 2 – Fragmentos dos produtos de restrição dos SNPs do *ABCA1*

Polimorfismo	Homozigoto comum	Heterozigoto	Homozigoto polimórfico	Produto de PCR íntegro
C-14T	173 bp	173 bp 139 bp 34 bp	139 bp 34 bp	173 bp
C-105T	173 bp	173 bp 129 bp 44 bp	129 bp 44 bp	173 bp
R219K (G70943A)	131 bp 112 bp 52 bp	183 bp 131 bp 112 bp 52 bp	183 bp 112 bp	295 bp

Nota: Digestão enzimática do polimorfismo C-14T foi realizada com *BsmAI*.

3.8 ENSAIOS DE SEQÜENCIAMENTO DE DNA

O polimorfismo C-105T foi inicialmente confirmado por seqüenciamento de DNA. Algumas amostras genotipadas por PCR-RFLP para os SNPs C-14T e C-105T foram confirmadas também por seqüenciamento de DNA.

Para o seqüenciamento dos SNP, os produtos de PCR foram gerados nas condições descritas no item 3.6, com exceção do número de ciclos de amplificação que aumentou de 29 para 32. Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se colunas de purificação por tamanho molecular (*Microspin S300HR Columns*, GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra), 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, Buckinghamshire, Inglaterra). As bandas foram visualizadas conforme descrito no item 3.5.

A concentração dos produtos de PCR foi determinada comparando-se as intensidades das bandas eletroforéticas geradas com as do marcador de massa molecular de DNA (*Low Mass DNA Ladder*, Invitrogen Corporation, CA, EUA) (**Figura 8**).

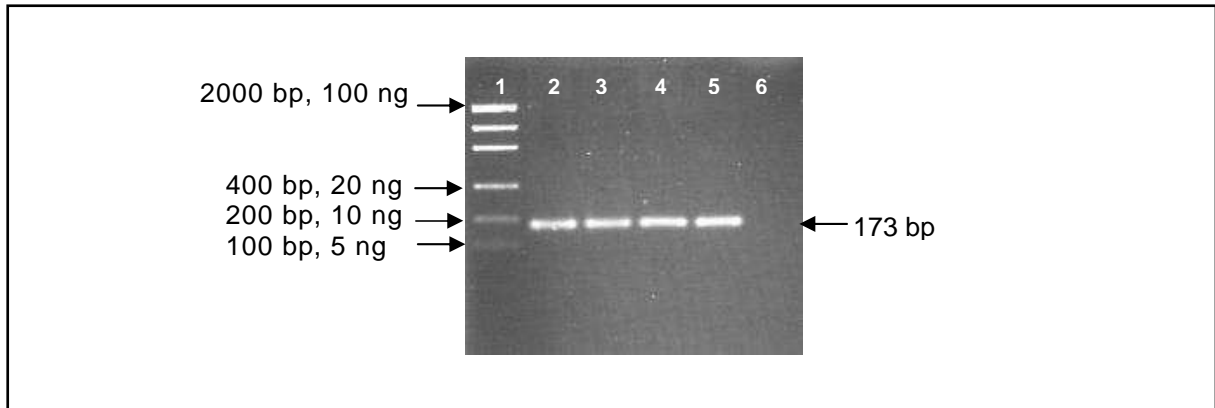


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de PCR purificados para a reação de seqüenciamento dos SNPs C-14T e C-105T

Nota: Linha 1: *Low Mass DNA Ladder*. Linhas 2 a 5: produtos de PCR purificados. Linha 6: controle negativo.

O ensaio de seqüenciamento de DNA foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano (Instituto de Biociências, USP, São Paulo, Brasil), a partir do produto de PCR purificado produzido em nosso laboratório. Para essa finalidade, foram utilizados aproximadamente 30 ng de produto de PCR purificado, 2,5 pmoles de iniciador, 4,0 μ L de *DYEnamic ET Terminator Reagent Premix* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra) e água MilliQ para completar o volume de 10 μ L. Os ensaios foram realizados no termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., MA, EUA) utilizando-se o seguinte protocolo: 30 ciclos de incubação a 95°C por 20 s, 57,4°C por 15 s e 60°C por 1 min.

Os produtos de seqüenciamento foram purificados por precipitação utilizando acetato de amônio a 7,5 moles/L e etanol absoluto. Esses produtos purificados foram ressuspensos em solução de aplicação (*Mega BACE loading solution*—formamida 70%, EDTA a 1mmol/L) e foram injetados no sistema de eletroforese capilar *Mega BACE 1000* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra). Para a injeção das amostras foram aplicados 2 kV durante 60 s e, a seguir, a eletroforese foi realizada a 8 kV por 120 min. A análise dos dados brutos foi feita pelo software *Sequence Analyser* do

MegaBACE utilizando o BaseCaller Cimarron 3.12. Posteriormente, as seqüências foram analisadas no nosso laboratório utilizando-se o programa BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.5 (HALL, 2005).

Os eletroferogramas representativos dos seqüenciamentos de indivíduos portadores dos genótipos do SNP C-14T estão ilustrados na **Figuras 9**. Na **Figura 10**, são apresentados os eletroferogramas dos portadores dos diferentes genótipos do novo polimorfismo C-105T.

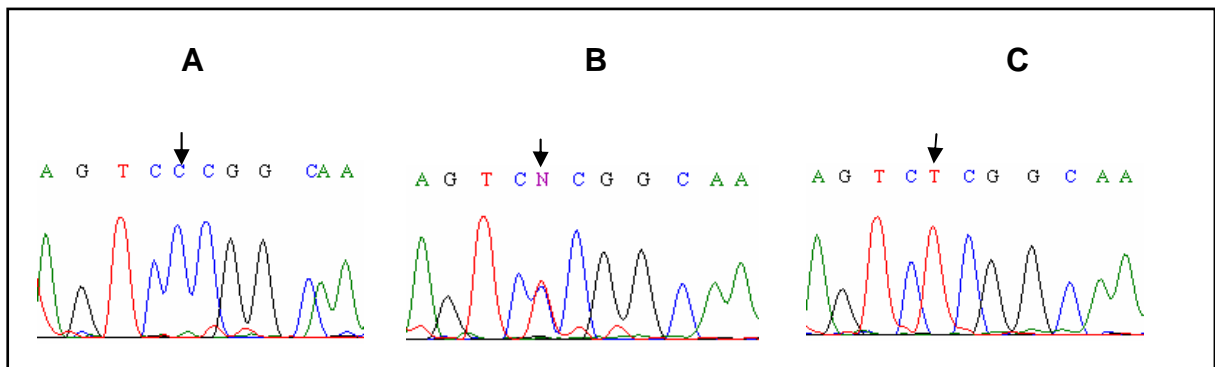


Figura 9. Eletroferogramas de seqüenciamento de DNA para o SNP C-14T (A) Genótipo CC. (B) Genótipo CT. (C) Genótipo TT.

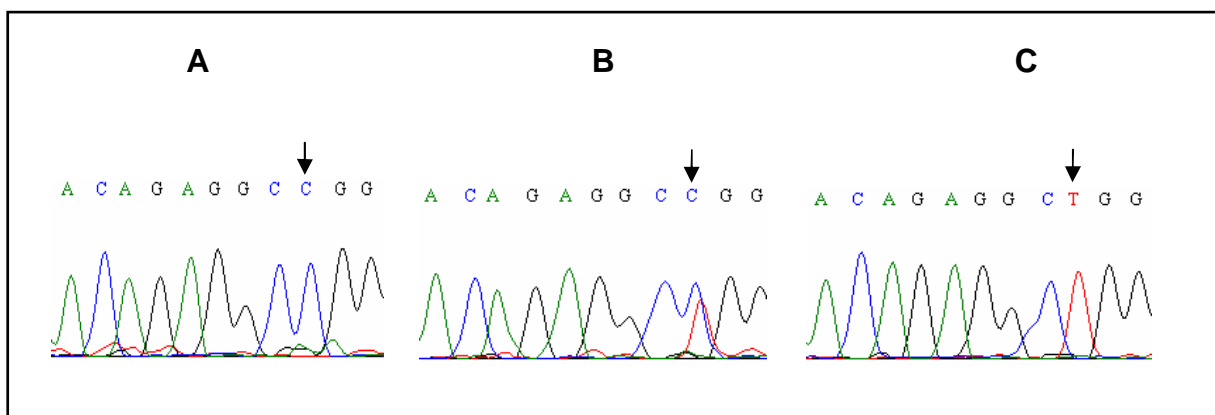


Figura 10. Eletroferogramas de seqüenciamento de DNA para o SNP C-105T (A) Genótipo CC. (B) Genótipo CT. (C) Genótipo TT.

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 (NAVARRETE; HIRATA; HIRATA, 2000). Resumidamente, 5 mL de sangue colhido em EDTA foram diluídos 1:2 (v/v) com tampão Tris-EDTA (Tris-HCl a 10 mmoles/L, pH 7,4, e EDTA 10 mmoles/L, 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, 30 min, a temperatura ambiente. As células mononucleares foram recolhidas, lavadas 3 vezes com o dobro do seu volume com tampão Tris-EDTA, contadas em câmara de Neubauer e imediatamente submetidas à extração do RNA total.

Entre 1 (um) e 5×10^6 CMSP e células da linhagem Caco-2 foram lisadas com 1 mL de TRIZOL[®] (Invitrogen Corporation, CA, EUA) de acordo com procedimento previamente padronizado em nosso laboratório (MASSIRER et al., 2004). Resumidamente, 200 μ L de clorofórmio foram adicionados aos lisados e os extratos foram homogeneizados e centrifugados 12.000 g, 15 min, a 4°C. O RNA total presente na fase aquosa foi precipitado com isopropanol gelado, centrifugado a 10.000 g, por 10 min, a 4°C e lavado com etanol a 75% (v/v). A seguir, o RNA foi seco à temperatura ambiente, ressuspendido em 50 μ L água esterilizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e armazenado a -70°C para posterior análise.

O RNA total foi quantificado por espectrofotometria no ultravioleta (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 a 20 mmoles/L (pH 7,0), acetato de sódio a 8 mmoles/L e EDTA 1 mmol/L (pH 8,0)] contendo formaldeído a 2,2 moles/L (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Como referência, foi utilizado um marcador de tamanho molecular de RNA (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra). A eletroforese foi realizada a 32 V por 40 min utilizando cuba de eletroforese horizontal (Gibco BRL Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA) e fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra). As bandas eletroforéticas foram visualizadas sob luz ultravioleta conforme descrito no item 3.5.

3.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RNAm POR RT-PCR *duplex*

A expressão de RNAm do *ABCA1* em CMSP foi medida por transcrição reversa (RT) seguida de PCR. Em paralelo, foi medida a expressão de RNAm do gene gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPD*) como referência endógena. A análise conjunta de RNAm de *ABCA1* e *GAPD* foi realizada no formato de PCR-*duplex*.

O cDNA foi gerado a partir de 1 µg de RNA, utilizando-se 200 ng de iniciadores aleatórios (*random primers*) (Invitrogen Corporation, CA, EUA), ditiotretol (DTT) a 10 mmoles/L (Invitrogen Corporation, CA, EUA), dNTPs a 500 µmoles/L (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra), 200 U de

transcriptase reversa (SuperScript™ II Reverse Transcriptase RNase H⁻) e tampão de RT [Tris-HCl a 250 mmoles/L (pH 8,3), KCl a 375 mmoles/L e MgCl₂ 15 mmoles/L] (Invitrogen Corporation, CA, EUA). O ensaio de RT foi realizado em termociclador PTC-200 (MJ Resarch Inc., MA, EUA), com as seguintes etapas: 25°C por 10 min, 42°C por 50 min e 70°C por 15 min. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a realização da PCR.

Os iniciadores usados para amplificar o cDNA do *ABCA1* por PCR-*duplex* foram desenhados utilizando-se o programa Primer Premier v.5.0 (PREMIER Biosoftware International, CA, EUA) com base na seqüência gênica disponível (número de acesso NM_005502) no banco de genes do NCBI (USA, 2007) e estão descritos na **Tabela 3**. O cDNA do *GAPD* foi amplificado utilizando os iniciadores previamente descritos (TOKUNAGA et al., 1987) (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Iniciadores utilizados nas reações de PCR-*duplex* e PCR em Tempo Real

Genes	RT-PCR	Iniciadores	Fragmento
<i>ABCA1</i>	<i>Duplex</i>	5' GAAGAGATGATTCAACTTGGTGAC 3' 5' CAGACAATACGAGACACAGCCT 3'	326 bp
<i>GAPD</i>	<i>Duplex</i>	5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3' 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'	452 bp
<i>ABCA1</i>	<i>Tempo real</i>	5' GCTGCATAGTCTTGGGACTCT 3' 5' AGAAGCTGGAGTGACATGCG 3' 5'FAM™ CAGGAGCTGTTCAGCAT NFQ-MGB3'	63 bp
<i>GAPD</i>	<i>Tempo real</i>	Catálogo 4326317E (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) Fluoróforos: 5'VIC® e NFQ-MGB 3'	Dado não informado pelo fabricante

Nota: FAM™, fluoróforo 6-carboxifluoresceína; MGB, *minor groove binder*; NFQ, *non-fluorescent quencher*; VIC®, fluoróforo disponibilizado pela Applied Biosystems®.

Nos ensaios de PCR-*duplex*, foram utilizados 1 μ L de cDNA, iniciadores para *ABCA1* a 400 nmoles/L, iniciadores para o *GAPD* a 17 nmoles/L (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, EUA), dNTPs a 0,2 mmoles/L (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra), DNA polimerase 1 U e tampão de PCR (Biotools, Madrid, Espanha).

Os ensaios foram realizados no termociclador PTC-200 (MJ Research, Inc., MA, EUA), utilizando-se o programa: etapa inicial a 98^oC por 3 min; 34 ciclos de: 94^oC por 1 min, 60^oC por 2 min, e 72^oC por 2 min; e etapa final a 72^oC por 10 min.

Os produtos de PCR-*duplex* foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TBE 0,5 X por 40 min a 100 V e analisados conforme descrito no item 3.5. Como referência foram utilizados marcadores de tamanho molecular de DNA de 100 bp (Invitrogen Corporation, CA, EUA).

Inicialmente foram estabelecidas as condições de ensaio de RT-PCR para os genes individuais. Os iniciadores desenhados para a expressão do *ABCA1* foram testados para verificar sua especificidade. Foram testadas as temperaturas de hibridização (57^oC - 62^oC) dos ensaios de PCR de *ABCA1* e *GAPD*, com 32 ciclos e iniciadores a 200 nmoles/L. Nessas condições houve um sinal fraco de amplificação do gene *ABCA1* entre 59 - 62^oC (Figura não mostrada) e, ao contrário, o gene *GAPD* mostrou ter uma expressão bastante significativa em todas as temperaturas testadas (**Figura 11A**).

Utilizando-se o intervalo de temperatura no qual havia sinal de amplificação do *ABCA1*, aumentou-se o número de ciclos para 35, mas, ainda assim, o sinal de amplificação manteve-se fraco. Diante desses resultados, a concentração de iniciadores foi aumentada para 400 nmoles/L e foram testados o número de ciclos (Figura não mostrada) e a temperatura de hibridização (gradiente de 55^oC a 62^oC)

(Figura 11B). As condições selecionadas para o ensaio de PCR do gene ABCA1 foram iniciadores a 400 nmoles/L, 35 ciclos e temperatura de hibridização de 60°C.

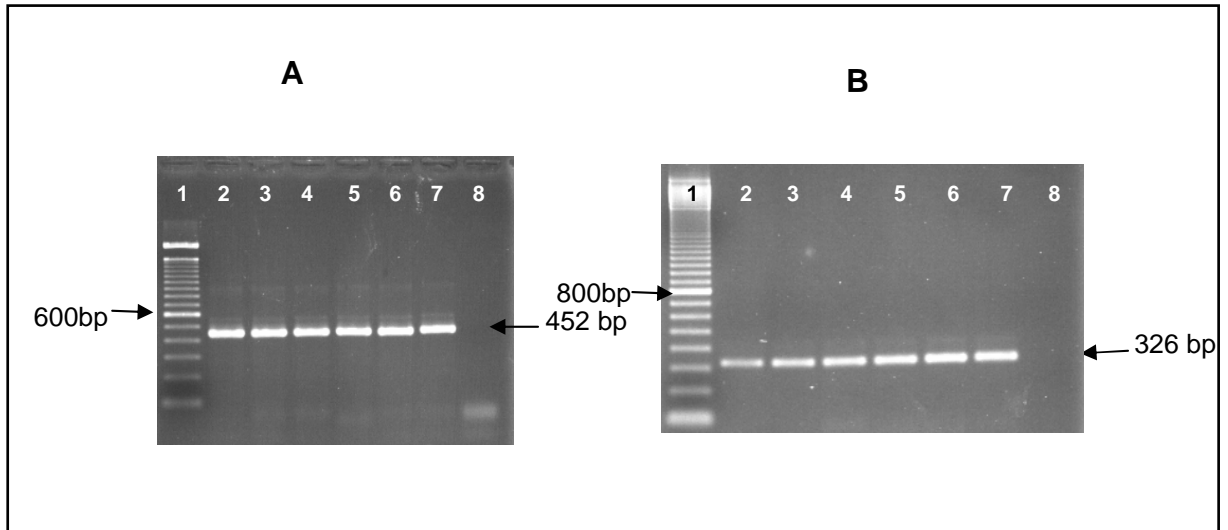


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de RT-PCR dos genes ABCA1 e GAPD

(A) Teste de temperaturas de hibridização para o *GAPD*. (B) Teste de temperaturas para o *ABCA1*.

Nota: (A) Linha 1: marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp. Linha 2: 57,5°C. Linha 3: 58,8°C. Linha 4: 60,0°C. Linha 5: 60,8°C. Linha 6: 61,4°C. Linha 7: 62,0°C. Linha 8: controle negativo.

(B) Linha 1: marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp. Linha 2: 55,3°C. Linha 3: 57,5°C. Linha 4: 58,8°C. Linha 5: 60,0°C. Linha 6: 61,4°C. Linha 7: 62,0°C. Linha 8: controle negativo.

Para a otimização da PCR-*duplex*, foram testadas as concentrações de iniciadores para o gene GAPD (3,1 a 100,0 nmoles/L) mantendo-se a constante a do gene ABCA1 (400 nmoles/L) (Figura 12A). Inicialmente foi selecionada a concentração de iniciadores a 12,5 nmoles/L para o gene GAPD, porém nessa concentração o gene ABCA1 apresentou sinal significativamente mais intenso que o gene GAPD. Resultados de ensaios posteriores mostraram que a melhor concentração de iniciadores para o *GAPD* é 17,0 nmoles/L.

Em seguida foram testados os números de ciclos necessários para avaliar em quais deles que reação de RT-PCR se desenvolve na fase exponencial. Na Figura 12B, podem ser observadas as intensidades das bandas dos ensaios de RT-

PCR para ciclos de amplificação que variam de 31 a 37. O número de ciclos necessários para gerar produtos de PCR com intensidades e leituras densitométricas adequadas (gráfico não mostrado), para avaliação da razão entre *ABCA1* e *GAPD*, foi estabelecido em 34 ciclos.

Estes ensaios foram realizados com o objetivo de conhecer a expressão do *ABCA1* em CMSP. Para o estudo quantitativo da expressão do *ABCA1* em CMSP utilizou-se o método de PCR em tempo real.

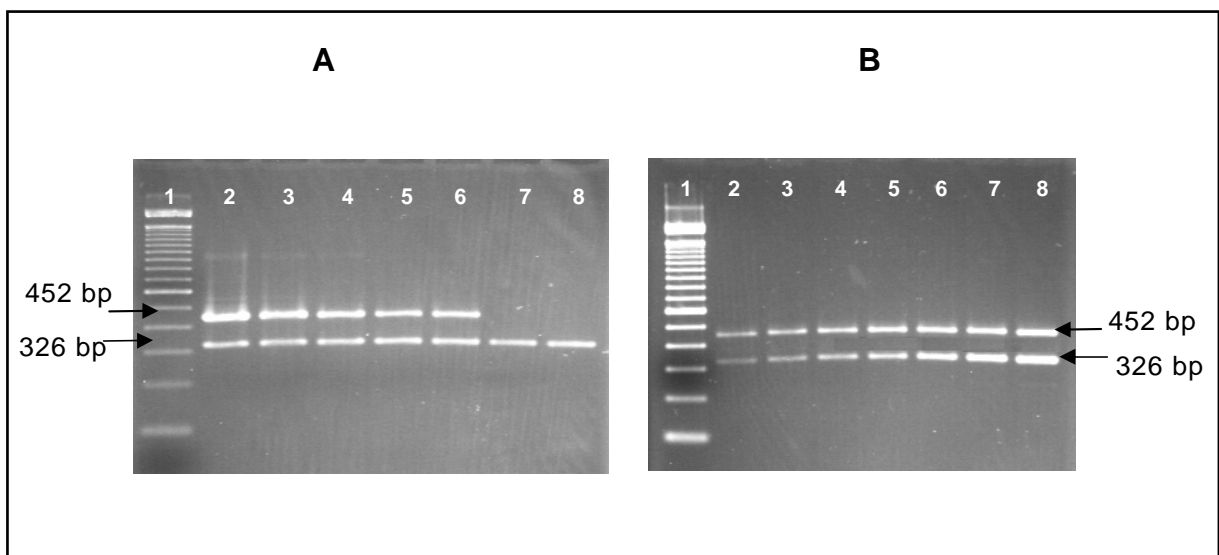


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de RT-PCR *duplex* dos genes *ABCA1* e *GAPD*
(A) Variação da concentração dos iniciadores do *GAPD*. (B) Teste de ciclos.

Nota: (A) Linha 1: marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp. Linha 2 a 7: 100nmoles/L, 50nmoles/L, 25nmoles/L, 12,5nmoles/L, 6,25nmoles/L e 3,125nmoles/L, respectivamente. Linha 8: ausência de iniciadores para o gene *GAPD*.

(B) Linha 1: marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp. Linha 2 a 8: 31, 32, 33, 34, 35, 36 e 37 ciclos, respectivamente.

3.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RNAm POR RT-PCR EM TEMPO REAL

A medida quantitativa da expressão do RNAm do *ABCA1* em CMSP foi realizada por PCR em tempo real utilizando o sistema de amplificação *TaqMan*[®] PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O sinal de fluorescência emitido pelo fluoróforo da sonda *TaqMan*[®] foi detectado em tempo real. A análise da expressão gênica foi realizada por método de quantificação relativa utilizando o gene GAPD como referência endógena.

As seqüências dos iniciadores e das sondas marcadas com fluoróforo foram fornecidas em solução 20 vezes concentrada pelo serviço “*Assay by design*” (*ABCA1*) e “*Assay on demand*” (*GAPD*) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As seqüências dos iniciadores e das sondas fornecidas pelo fabricante estão descritas na **Tabela 3** (anterior).

Para os ensaios de PCR em tempo real, o cDNA foi obtido conforme descrito no item 3.10. Os cDNA dos genes *ABCA1* 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 *ABCA1* utilizou-se iniciadores a 900 nmoles/L e sonda de detecção marcada com FAM[™] (6-carboxifluoresceína) a 250 nmoles/L. Para o *GAPD*, utilizou-se a sonda de detecção (250 nmoles/L) marcada com VIC[®] e os iniciadores a 150 nmoles/L. Os demais reagentes foram fornecidos em solução 2x concentrada denominada *Master Mix* contendo dNTPs com dUTP (desoxiuridina trifosfato), AmpErase[®] UNG (Uracil N-glicosilase), enzima AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase, uma referência passiva 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 s a 95°C (desnaturação) e 1 min a 60°C (hibridização e extensão). Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos das sondas TaqMan[®] 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 utilizada nos ensaios foi otimizada a partir de uma curva-padrão, realizada com diferentes concentrações de amostra de cDNA. 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 (*slope*) da curva-padrão deve ser próximo de -3,3. A eficiência de cada ensaio foi considerada adequada para valores acima de 90%.

As análises de expressão de RNAm do gene ABCA1 foram realizadas com base na fórmula: $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O valor médio de expressão relativa do ABCA1 em células da linhagem Caco-2 foi utilizado como calibrador nesta fórmula e a variação interensaio da PCR em tempo real foi analisada com o uso do cDNA desta linhagem celular.

3.12 CONTROLE DE QUALIDADE DOS ENSAIOS DE PCR-RFLP E RT-PCR

Os ensaios de PCR foram monitorizados utilizando-se um controle negativo (tubo no qual não se adiciona a amostra) em cada conjunto de

reações. Os ensaios de PCR-*duplex* foram realizados em triplicata para cada amostra. Os ensaios de PCR em tempo real foram realizados em duplicata para cada amostra e a variação interensaio encontrada, avaliada com células da linhagem Caco-2, foi de 2,42% para o *ABCA1* e 3,56% para o *GAPD*.

Os ensaios de PCR-RFLP foram repetidos aleatoriamente para 30% das amostras testadas e não foi encontrado nenhum erro de genotipagem. 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 foram realizadas análises descritivas dos parâmetros bioquímicos basais para todos os grupos, dos parâmetros bioquímicos após tratamento com atorvastatina no grupo hipercolesterolêmico tratado e dos valores de expressão gênica para normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos (pré- e pós-terapia farmacológica). Para as análises dos polimorfismos genéticos os genótipos heterozigotos foram agrupados com os genótipos raros, para aumentar o poder estatístico dos testes.

As variáveis com distribuição assimétrica ou sem distribuição normal foram transformadas em logaritmo (\log_{10}). O teste t de Student foi utilizado 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. Este teste também foi utilizado para comparar os valores de expressão gênica entre

normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos ou entre os diferentes grupos genotípicos. No grupo de hipercolesterolêmicos tratados, as análises de eficácia da terapia com atorvastatina e as comparações entre valores de expressão basal e pós-tratamento foram realizadas com a utilização do teste t de Student para amostras pareadas. No caso de análises, bioquímicas ou de expressão gênica, envolvendo três grupos haplotípicos utilizou-se a Análise de Variância Simples (*One-Way ANOVA*) seguida de teste de comparação múltipla de Tukey, quando necessário.

Variáveis categóricas foram comparadas por Qui-quadrado (χ^2) ou Teste Exato de Fisher. O teste Qui-quadrado também foi utilizado para avaliar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e para comparar as frequências alélicas do nosso grupo de estudo com as de outras populações.

O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 DADOS DOS INDIVÍDUOS DO ESTUDO

As características antropométricas e clínicas e as concentrações séricas basais de lipídeos de indivíduos dos grupos NL, HC e ATORVA estão descritas na **Tabela 4**. Oito pacientes não informaram seu grupo étnico (3 NL, 4 HC e 1 ATORVA).

A média de idade foi maior em pacientes HC ou ATORVA quando comparados ao grupo NL ($p < 0,001$). Isso porque, alterações metabólicas ocorrem com maior frequência em indivíduos com idade mais avançada.

Os grupos HC ou ATORVA, quando comparados ao NL, apresentaram distribuições similares quanto a gênero, etnia, hábito de fumar, consumo de álcool ou prática de exercícios físicos ($p > 0,05$). No entanto, os valores de IMC e as proporções de indivíduos obesos, hipertensos, com história familiar de DAC ou de mulheres em menopausa foram maiores nos grupos HC e ATORVA ($p < 0,05$).

Como esperado, os grupos HC e ATORVA apresentaram concentrações séricas de lipídeos superiores as do grupo NL ($p < 0,001$), com exceção dos valores de HDL-c que foram similares entre os grupos. No grupo NL, os valores de apoA1 foram maiores que os do grupo ATORVA ($p = 0,003$), mas foram similares aos HC total ($p > 0,05$). Os índices apoB/apoA1 e TG/HDL-c de indivíduos hipercolesterolêmicos (ATORVA ou HC) foram superiores aos dos indivíduos do grupo NL ($p < 0,001$).

Tabela 4 – Características clínicas, variáveis antropométricas e perfil lipídico sérico dos grupos estudados

Variável	NL (143)	HC (224)	p^1	ATORVA (141)	p^2
Sexo (Masculino/feminino)(%)	27,3/72,7	32,6/67,4	0,281	32,6/67,4	0,325
Idade (anos)	46,9±7,3	55,2±10,9	<0,001	57,4±11,2	<0,001
Etnia* (Branco/Negros) (%)	62,9/37,1	66,8/33,2	0,512	67,1/32,9	0,531
IMC (kg/m ²)	26,2±4,1	27,5±4,2	0,004	27,6±4,3	0,006
Obesidade (%)	13,0	26,5	0,003	27,3	0,003
Hipertensão arterial (%)	40,7	54,8	0,009	58,3	0,003
Menopausa (%)	31,5	73,9	<0,001	85,2	<0,001
Fumante (%)	18,9	14,8	0,449	15,6	0,646
Consumo de álcool (%)	32,4	28,8	0,470	29,1	0,545
Prática de atividade física (%)	46,9	48,2	0,802	46,0	0,892
DAC (%)	40,6	53,8	0,013	57,1	0,005
CT (mg/dL)	173,2±18,1	257,0±46,6	<0,001	281,0±38,4	<0,001
TG (mg/dL)	83,5±28,5	148,0±65,3	<0,001	158,9±65,4	<0,001
HDL-c (mg/dL)	57,3±13,1	57,1±14,7	0,703	56,2±14,0	0,390
LDL-c (mg/dL)	99,1±17,7	170,1±43,3	<0,001	192,8±35,3	<0,001
VLDL-c (mg/dL)	16,7±5,7	29,6±13,1	<0,001	31,8±13,1	<0,001
ApoAI (mg/dL)	142,4±28,0	138,8±29,3	0,211	132,1±26,2	0,003
ApoB (mg/dL)	85,5±22,4	130,7±29,8	<0,001	143,8±26,2	<0,001
ApoB/ApoAI	0,6±0,2	1,0±0,4	<0,001	1,1±0,4	<0,001
TG/HDL-c	1,6±0,8	2,9±1,9	<0,001	3,1±1,9	<0,001

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Os indivíduos com IMC ≥ 30 kg/m² foram classificados como obesos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000) e aqueles com pressão sistólica e diastólica igual ou superior a 140/90 mmHg ou submetidos a terapia anti-hipertensiva foram considerados hipertensos (ARTERIAL HYPERTENSION WORK GROUPS, 2004). Variáveis contínuas são apresentadas como média \pm DP, foram transformadas em logaritmo (\log_{10}) para os testes estatísticos (com exceção da idade) e comparadas por Teste t de Student. Variáveis categóricas foram comparadas por qui-quadrado (χ^2).

*A etnia foi autodeclarada e 1 indivíduo ATORVA, 4 indivíduos HC e 3 NL não informaram o grupo étnico.

ApoAI, apolipoproteína AI; ApoB, apolipoproteína B; ATORVA, pacientes hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina; CT, colesterol total; DAC, história familiar de doença arterial coronariana; HC, pacientes hipercolesterolêmicos; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; IMC, índice de massa corpórea; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; NL, pacientes normolipidêmicos; TG, triglicerídeos; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

p^1 : NL vs HC. p^2 : NL vs ATORVA.

4.2 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS

A análise da frequência dos alelos e a distribuição dos genótipos dos SNPs C-105T, C-14T e R219K do *ABCA1*, nos pacientes dos grupos HC e NL, podem ser observadas na **Tabela 5**. As frequências genotípicas ou alélicas dos SNPs de indivíduos hipercolesterolêmicos foram similares as de normolipidêmicos ($p>0,05$). Os SNPs C-14T e R219K apresentaram EHW nos grupos NL e HC. Já o SNP C-105T apresentou EHW no grupo NL ($\chi^2 = 0,03$, $p>0,05$), mas não no grupo HC ($\chi^2 = 9,53$, $p<0,01$).

As distribuições de genótipos e as frequências de alelos dos SNPs dos grupos HC e NL entre homens e mulheres foram similares ($p>0,05$) (dados não mostrados). Resultados similares foram encontrados quando parâmetros como hipertensão, menopausa, obesidade, histórico de DAC, hábito de fumar, consumo de álcool e prática de exercícios físicos foram analisados.

Devido a grande miscigenação étnica em nossa população (ZEMBRZUSKI; CALLEGARI-JACQUES; HUTZ, 2006; PARRA et al., 2003), para as análises genéticas os indivíduos não foram separados de acordo com a etnia.

Tabela 5 – Distribuição de genótipos e freqüência de alelos dos SNPs C-105T, C-14T e R219K do gene ABCA1, em HC e NL

Polimorfismo	Distribuição dos genótipos (%)			Freqüência de alelos	
C-105T	CC	CT	TT	C	T
HC	96,4%	3,1%	0,5%	98,0%	2,0%
(224)	(216)	(7)	(1)		
NL	97,2%	2,8%	0,0%	98,6%	1,4%
(143)	(139)	(4)	(0)		
Teste exato de Fisher $p=1,000$				$\chi^2=0,4$ (1gl, $p=0,541$)	
C-14T	CC	CT	TT	C	T
HC	43,3%	43,3%	13,4%	65,0%	35,0%
(224)	(97)	(97)	(30)		
NL	42,0%	48,9%	9,1%	66,4%	33,6%
(143)	(60)	(70)	(13)		
$\chi^2=2,0$ (2gl, $p=0,363$)				$\chi^2=0,1$ (1gl, $p=0,740$)	
R219K (G70943A)	GG	GA	AA	G	A
HC	33,9%	48,2%	17,9%	58,0%	42,0%
(224)	(76)	(108)	(40)		
NL	37,8%	43,3%	18,9%	59,4%	40,6%
(143)	(54)	(62)	(27)		
$\chi^2=0,9$ (2gl, $p=0,652$)				$\chi^2=0,1$ (1gl, $p=0,764$)	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. HC, pacientes hipercolesterolêmicos; NL, pacientes normolipidêmicos.

Equilíbrio de Hardy-Weinberg:

SNP C-105T: HC, $\chi^2 = 9,53$ ($p < 0,01$) e NL, $\chi^2 = 0,03$ ($p > 0,05$).

SNP C-14T: HC, $\chi^2 = 0,53$ ($p > 0,05$) e NL, $\chi^2 = 1,36$ ($p > 0,05$).

SNP R219K: HC, $\chi^2 = 0,02$ ($p > 0,05$) e NL, $\chi^2 = 1,45$ ($p > 0,05$).

4.3 RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ATORVASTATINA

A resposta ao tratamento com atorvastatina (10mg/dia/4 semanas) pode ser observada na **Tabela 6**. Após o tratamento, houve redução significativa dos lipídeos séricos ($p < 0,05$), com exceção dos valores da apoAI que não se alteraram. As relações apoB/apoAI e TG/HDL-c também reduziram significativamente após o tratamento ($p < 0,001$).

A atividade de CK sérica não variou com o tratamento ($p>0,05$). Embora houve aumento da ALT sérica ($p<0,001$), os valores médios estiveram abaixo do limite superior de referência para homens ou mulheres (43 U/L e 36 U/L, respectivamente). Portanto, esses resultados sugerem que, na dose utilizada e durante o período de estudo, a atorvastatina não promoveu reações adversas.

Tabela 6 – Perfil lipídico e outros parâmetros bioquímicos dos indivíduos ATORVA (n=141), antes e após tratamento com atorvastatina (10 mg/dia/4semanas)

Variável	Pré Tratamento	Pós Tratamento	Variação (%)	P
CT (mg/dL)	281,0±38,4	199,2±31,3	-28,7±9,6	<0,001
TG (mg/dL)	158,9±65,4	132,3±52,5	-12,4±27,3	<0,001
HDL-c (mg/dL)	56,2±14,0	54,1±12,7	-2,8±11,4	0,004
LDL-c (mg/dL)	192,8±35,3	118,5±27,6	-38,0±12,4	<0,001
VLDL-c (mg/dL)	31,8±13,1	26,5±10,5	-12,4±27,3	<0,001
ApoAI (mg/dL)	132,1±26,2	135,7±27,5	4,6±25,7	0,151
ApoB (mg/dL)	143,8±26,2	100,6±20,0	-28,7±17,7	<0,001
ApoB/ApoAI	1,1±0,4	0,8±0,2	-30,6±16,5	<0,001
TG/HDL-c	3,1±1,9	2,6±1,3	-8,5±31,0	<0,001
CK (U/L)	97,0±79,3	96,5±85,3	2,2±34,9	0,460
ALT (U/L)	20,8±9,2	24,5±15,0	24,9±63,0	<0,001

Nota: Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Média de variação com sinal negativo indica redução dos valores das variáveis. Variáveis pré e pós tratamento transformadas em logaritmo (\log_{10}) para os testes estatísticos e comparadas por teste t de Student para amostras pareadas. ALT, alanina aminotransferase; ApoAI, apolipoproteína AI; ApoB, apolipoproteína B; ATORVA, pacientes hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina; CK, creatino quinase; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; TG, triglicerídeos; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

4.4 INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS SOBRE O PERFIL LIPÍDICO SÉRICO ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM ATORVASTATINA

4.4.1 Polimorfismo R219K (G70943A)

Na **tabela 7**, são mostrados os resultados do perfil lipídico sérico entre os normolipidêmicos portadores de genótipos do SNP G70943A. Os portadores dos genótipos 70943GA/AA apresentaram maiores valores séricos de apoAI ($p=0,035$) que os portadores do genótipo 70943GG.

Nos grupos HC e ATORVA, portadores dos genótipos 70943GA/AA apresentaram menores concentrações séricas basais de triglicerídeos (HC, $p=0,039$; ATORVA, $p=0,023$) e VLDL-c (HC, $p=0,036$; ATORVA, $p=0,023$) e menor índice TG/HDL-c (HC, $p=0,030$; ATORVA, $p=0,011$) quando comparados aos portadores do genótipo 70943GG (**Tabelas 7 e 8**). Além disso, no grupo ATORVA, portadores do alelo 70943A apresentaram maior concentração basal de HDL-c ($p=0,033$) (**Tabela 8 e Figura 13**). Esses resultados são sugestivos de que o SNP R219K (G70943A) está associado com um perfil lipídico sérico menos aterogênico em nossa população.

Após o tratamento com atorvastatina, os indivíduos portadores dos genótipos 70943GA/AA continuaram com menores concentrações séricas de triglicerídeos ($p=0,026$) e VLDL-c ($p=0,026$), maiores valores séricos de HDL-c ($p=0,024$) e menor índice TG/HDL-c ($p=0,007$) quando comparados aos portadores do genótipo 70943GG (**Tabela 8 e Figura 14**). Não houve diferenças na resposta ao tratamento com atorvastatina entre portadores dos genótipos G70943A ($p>0,05$, **Tabela 8**).

Tabela 7 – Efeito do SNP R219K (G70943A) no perfil lipídico sérico dos grupos NL e HC

Variável	Genótipos			
	NL (143)	70943GG (54)	70943GA/AA (89)	<i>p</i>
CT (mg/dL)		172,7±19,6	173,5±17,3	0,723
TG (mg/dL)		85,2±28,6	82,4±28,6	0,557
HDL-c (mg/dL)		55,3±12,5	58,5±13,3	0,150
LDL-c (mg/dL)		100,1±18,7	98,5±17,1	0,696
VLDL-c (mg/dL)		17,1±5,7	16,5±5,7	0,557
ApoAI (mg/dL)		136,2±28,9	146,1±26,9	0,035
ApoB (mg/dL)		87,6±24,1	84,2±21,3	0,416
ApoB/ApoAI		0,7±0,2	0,6±0,2	0,074
TG/HDL-c		1,7±0,8	1,5±0,8	0,266
HC (224)	70943GG (76)	70943GA/AA (148)	<i>p</i>	
CT (mg/dL)		257,7±45,3	256,6±47,4	0,822
TG (mg/dL)		164,4±77,5	139,6±56,5	0,039
HDL-c (mg/dL)		55,3±14,6	58,1±14,7	0,157
LDL-c (mg/dL)		169,4±42,8	170,4±43,7	0,890
VLDL-c (mg/dL)		32,9±15,5	27,9±11,3	0,036
ApoAI (mg/dL)		136,6±27,9	139,9±30,1	0,513
ApoB (mg/dL)		130,8±33,2	130,7±28,0	0,876
ApoB/ApoAI		1,0±0,3	1,0±0,4	0,732
TG/HDL-c		3,4±2,2	2,7±1,6	0,030

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Variáveis transformadas em logaritmo (\log_{10}) para os testes estatísticos e comparadas por teste t de Student.

ApoAI, apolipoproteína AI; ApoB, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HC, pacientes hipercolesterolêmicos; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; NL, pacientes normolipidêmicos; TG, triglicerídeos; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Tabela 8 – Efeito do SNP R219K (G70943A) no perfil lipídico sérico de indivíduos do grupo ATORVA, antes após o tratamento com atorvastatina

Variável		70943GG (49)	70943GA/AA (92)	<i>p</i>
CT (mg/dL)	<i>Basal</i>	281,1±37,0	281,0±39,3	0,960
	<i>Atorvastatina</i>	196,7±28,7	200,6±32,7	0,550
	<i>Variação (%)</i>	-29,7±8,4	-28,2±10,2	0,386
TG (mg/dL)	<i>Basal</i>	177,2±72,0	149,2±59,7	0,023
	<i>Atorvastatina</i>	148,7±66,0	123,6±41,5	0,026
	<i>Variação (%)</i>	-12,8±27,8	-12,2±27,2	0,896
HDL-c (mg/dL)	<i>Basal</i>	53,1±14,3	57,8±13,7	0,033
	<i>Atorvastatina</i>	51,0±12,3	55,7±12,7	0,024
	<i>Variação (%)</i>	-2,9±9,8	-2,8±12,2	0,938
LDL-c (mg/dL)	<i>Basal</i>	192,4±33,3	193,0±36,6	0,978
	<i>Atorvastatina</i>	116,3±26,0	119,7±28,5	0,530
	<i>Variação (%)</i>	-39,3±10,8	-37,4±13,2	0,388
VLDL-c (mg/dL)	<i>Basal</i>	35,4±14,4	29,8±12,0	0,023
	<i>Atorvastatina</i>	29,7±13,2	24,7±8,3	0,026
	<i>Variação (%)</i>	-12,8±27,8	-12,2±27,2	0,896
ApoAI (mg/dL)	<i>Basal</i>	129,8±25,6	133,3±26,5	0,556
	<i>Atorvastatina</i>	130,6±24,9	139,1±28,8	0,078
	<i>Variação (%)</i>	1,7±11,7	6,1±30,6	0,736
ApoB (mg/dL)	<i>Basal</i>	145,1±31,1	142,8±23,3	0,806
	<i>Atorvastatina</i>	100,5±18,5	100,4±20,4	0,935
	<i>Variação (%)</i>	-28,2±25,0	-29,0±12,3	0,511
ApoB/ApoAI	<i>Basal</i>	1,2±0,3	1,1±0,4	0,506
	<i>Atorvastatina</i>	0,8±0,2	0,7±0,2	0,193
	<i>Variação (%)</i>	-29,6±19,4	-31,2±14,8	0,653
TG/HDL-c	<i>Basal</i>	3,7±2,1	2,8±1,7	0,011
	<i>Atorvastatina</i>	3,2±1,7	2,4±1,0	0,007
	<i>Variação (%)</i>	-8,7±33,2	-8,4±30,0	0,959

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Média de variação com sinal negativo indica redução dos valores das variáveis. Variáveis transformadas em logaritmo (\log_{10}) para os testes estatísticos e comparadas por teste t de Student. ApoAI, apolipoproteína AI; ApoB, apolipoproteína B; ATORVA, pacientes hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; TG, triglicerídeos; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

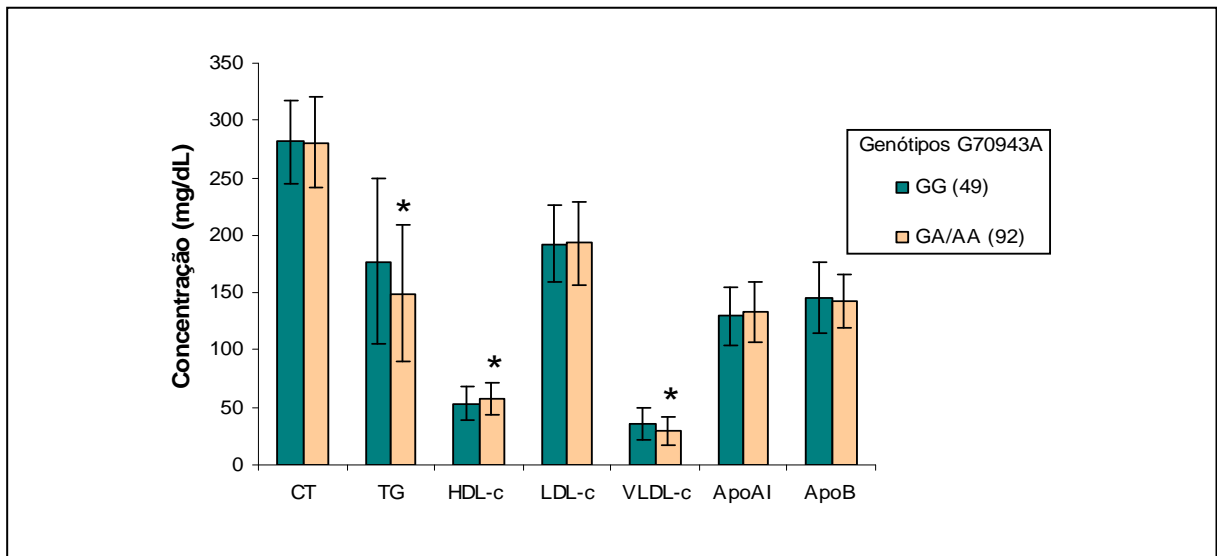


Figura 13. Perfil lipídico sérico basal de indivíduos do grupo ATORVA segundo genótipos do SNP *ABCA1* G70943A

Nota: ApoAI, apolipoproteína AI; ApoB, apolipoproteína B; ATORVA, pacientes hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; TG, triglicerídeos; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

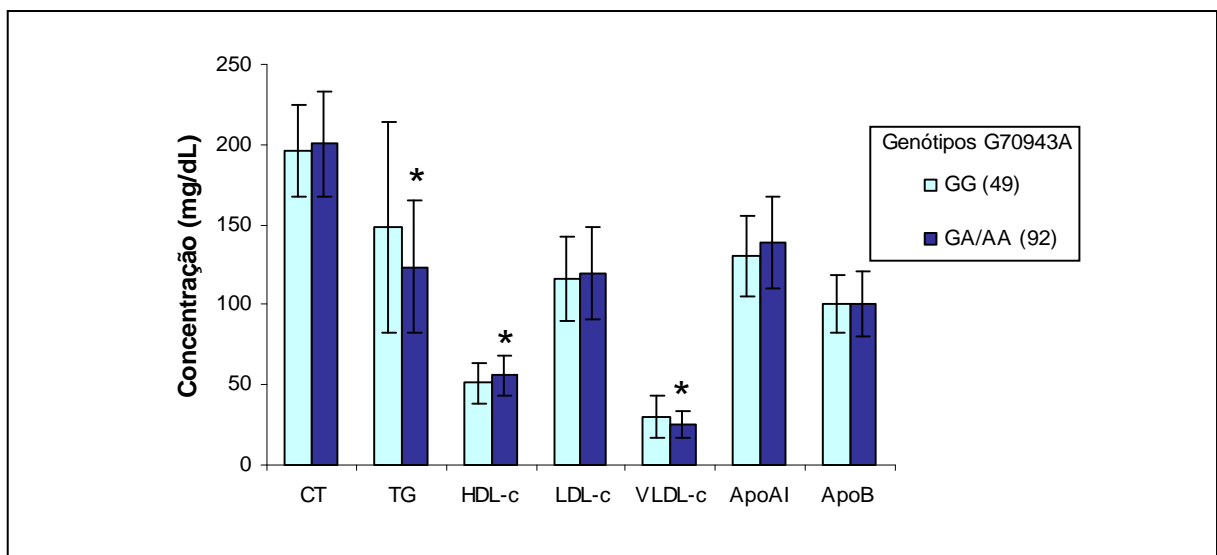


Figura 14. Perfil lipídico sérico de indivíduos do grupo ATORVA após o tratamento com atorvastatina (10mg/dia/4semanas) segundo genótipos do SNP *ABCA1* G70943A

Nota: ApoAI, apolipoproteína AI; ApoB, apolipoproteína B; ATORVA, pacientes hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; TG, triglicerídeos; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

4.4.2 Polimorfismo C-14T

Nos grupos NL e HC, não foram observadas associações do SNP C-14T com o perfil lipídico sérico basal ou com os índices apoB/apoA1 ou TG/HDL-c (**Tabela 9**).

Da mesma forma, os resultados de perfil lipídico foram similares entre os portadores de genótipos -14CC e -14CT/TT do grupo ATORVA, no pré e no pós-tratamento com atorvastatina, e não houve diferenças significativas com relação a variação porcentual dos parâmetros bioquímicos analisados após a terapia farmacológica ($p>0,05$) (**Tabela 10**). Estes resultados são sugestivos de que o SNP C-14T não está relacionado com variações no perfil lipídico ou com a resposta ao tratamento com atorvastatina.

Tabela 9 – Efeito do SNP C-14T no perfil lipídico sérico dos grupos NL e HC

Variável	Genótipos			
	NL (143)	-14CC (60)	-14CT / TT (83)	<i>p</i>
CT (mg/dL)		172,3±15,5	173,9±19,9	0,739
TG (mg/dL)		83,1±28,7	83,8±28,5	0,922
HDL-c (mg/dL)		58,8±13,6	56,2±12,7	0,262
LDL-c (mg/dL)		96,8±16,1	100,8±18,7	0,276
VLDL-c (mg/dL)		16,6±5,7	16,8±5,7	0,922
ApoAI (mg/dL)		145,5±29,9	140,3±26,5	0,367
ApoB (mg/dL)		81,3±19,6	88,5±23,8	0,064
ApoB/ApoAI		0,6±0,2	0,7±0,2	0,065
TG/HDL-c		1,6±0,8	1,6±0,8	0,546
HC (224)	-14CC (97)	-14CT / TT (127)	<i>p</i>	
CT (mg/dL)		258,5±49,9	255,8±44,1	0,778
TG (mg/dL)		143,4±70,4	151,5±61,1	0,151
HDL-c (mg/dL)		58,2±15,8	56,3±13,8	0,466
LDL-c (mg/dL)		171,3±45,3	169,1±41,8	0,796
VLDL-c (mg/dL)		28,6±14,1	30,3±12,2	0,138
ApoAI (mg/dL)		140,3±32,4	137,7±27,0	0,639
ApoB (mg/dL)		130,4±33,2	130,9±27,2	0,705
ApoB/ApoAI		1,0±0,3	1,0±0,4	0,599
TG/HDL-c		2,8±2,0	3,0±1,8	0,186

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Variáveis transformadas em logaritmo (\log_{10}) para os testes estatísticos e comparadas por teste t de Student.

ApoAI, apolipoproteína AI; ApoB, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HC, pacientes hipercolesterolêmicos; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; NL, pacientes normolipidêmicos; TG, triglicérides; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Tabela 10 – Efeito do SNP C-14T no perfil lipídico sérico de indivíduos do grupo ATORVA, antes após o tratamento com atorvastatina

Variável		-14CC (60)	-14CT / TT (81)	p
CT (mg/dL)	<i>Basal</i>	284,3±42,3	278,6±35,4	0,433
	<i>Atorvastatina</i>	203,6±31,2	196,0±31,2	0,152
	<i>Variação (%)</i>	-27,8±10,4	-29,4±9,0	0,319
TG (mg/dL)	<i>Basal</i>	157,0±72,9	160,3±59,6	0,497
	<i>Atorvastatina</i>	131,5±57,8	132,9±48,6	0,685
	<i>Variação (%)</i>	-11,1±29,1	-13,4±26,0	0,623
HDL-c (mg/dL)	<i>Basal</i>	56,6±14,6	55,9±13,7	0,869
	<i>Atorvastatina</i>	54,3±12,9	53,9±12,7	0,860
	<i>Variação (%)</i>	-2,8±11,6	-2,8±11,3	0,994
LDL-c (mg/dL)	<i>Basal</i>	195,8±37,5	190,5±33,7	0,394
	<i>Atorvastatina</i>	122,8±28,0	115,4±27,2	0,111
	<i>Variação (%)</i>	-36,6±12,9	-39,1±12,0	0,239
VLDL-c (mg/dL)	<i>Basal</i>	31,4±14,6	32,1±11,9	0,497
	<i>Atorvastatina</i>	26,3±11,6	26,6±9,7	0,685
	<i>Variação (%)</i>	-11,1±29,1	-13,4±26,0	0,623
ApoAI (mg/dL)	<i>Basal</i>	132,8±24,0	131,5±27,8	0,631
	<i>Atorvastatina</i>	134,1±24,7	137,7±29,8	0,541
	<i>Variação (%)</i>	1,2±11,5	7,0±32,1	0,104
ApoB (mg/dL)	<i>Basal</i>	147,5±27,9	140,9±24,8	0,138
	<i>Atorvastatina</i>	103,5±18,2	98,1±20,5	0,079
	<i>Variação (%)</i>	-29,0±12,0	-28,6±20,9	0,340
ApoB/ApoAI	<i>Basal</i>	1,1±0,2	1,1±0,4	0,493
	<i>Atorvastatina</i>	0,8±0,2	0,7±0,2	0,081
	<i>Variação (%)</i>	-29,4±12,9	-31,5±18,6	0,445
TG/HDL-c	<i>Basal</i>	3,1±2,1	3,2±1,7	0,581
	<i>Atorvastatina</i>	2,7±1,6	2,6±1,1	0,604
	<i>Variação (%)</i>	-7,1±33,5	-9,5±29,2	0,649

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Média de variação com sinal negativo indica redução dos valores das variáveis. Variáveis transformadas em logaritmo (\log_{10}) para os testes estatísticos e comparadas por teste t de Student. ApoAI, apolipoproteína AI; ApoB, apolipoproteína B; ATORVA, pacientes hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; TG, triglicerídeos; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

4.4.3 Polimorfismo C-105T

O perfil lipídico basal de indivíduos NL foi similar entre os portadores de genótipos -105CC e -105CT/TT (**Tabela 11**). No entanto, no grupo HC, portadores dos genótipos -105CT/TT apresentaram menores concentrações séricas de triglicerídeos ($p=0,010$) e VLDL-c ($p=0,010$), menor índice TG/HDL-c ($p<0,001$) e maiores concentrações de HDL-c ($p=0,009$) do que os portadores do genótipo -105CC (**Tabela 11** e **Figura 15**). Da mesma forma, no grupo ATORVA portadores dos genótipos -105CT/TT apresentaram menores valores basais de triglicerídeos ($p=0,015$) e VLDL-c ($p=0,015$), maior concentração de HDL-c ($p=0,010$) e apoAI ($p=0,040$) e menores valores para os índices apoB/apoAI ($p<0,001$) e TG/HDL-c ($p=0,004$) quando comparados aos portadores do genótipo -105CC (**Tabela 12** e **Figura 16**). Estes achados sugerem que o alelo -105T pode estar associado a um perfil lipídico sérico menos aterogênico.

Além disso, após o tratamento com atorvastatina, os indivíduos portadores do alelo -105T mantiveram maiores as concentrações de HDL-c ($p=0,007$) e apoAI ($p=0,004$) e menores índices apoB/apoAI ($p=0,014$) e TG/HDL-c ($p=0,042$) que os portadores do genótipo -105CC (**Tabela 12** e **Figura 17**). Mas, após o tratamento farmacológico, não foram observadas diferenças nas variações médias de perfil lipídico entre os genótipos, sugerindo que o SNP C-105T não está associado com diferenças na resposta à terapia com atorvastatina.

Tabela 11 – Efeito do SNP C-105T no perfil lipídico sérico dos grupos NL e HC

Variável	Genótipos			
	NL (143)	-105CC (139)	-105CT / TT (4)	<i>p</i>
CT (mg/dL)		172,8±18,1	188,5±10,8	0,098
TG (mg/dL)		83,1±28,4	95,5±32,4	0,360
HDL-c (mg/dL)		57,3±13,1	58,3±11,6	0,825
LDL-c (mg/dL)		98,8±17,8	111,3±9,5	0,175
VLDL-c (mg/dL)		16,6±5,7	19,1±6,5	0,360
ApoAI (mg/dL)		142,3±28,2	147,7±21,4	0,636
ApoB (mg/dL)		85,5±22,7	86,8±10,1	0,736
ApoB/ApoAI		0,6±0,2	0,6±0,2	0,977
TG/HDL-c		1,6±0,8	1,8±1,1	0,576
HC (224)	-105CC (216)	-105CT / TT (8)	<i>p</i>	
CT (mg/dL)		257,4±47,0	245,9±33,2	0,570
TG (mg/dL)		150,0±65,6	95,3±19,8	0,010
HDL-c (mg/dL)		56,6±14,6	70,5±12,4	0,009
LDL-c (mg/dL)		170,6±43,8	156,4±27,3	0,469
VLDL-c (mg/dL)		30,0±13,1	19,1±4,0	0,010
ApoAI (mg/dL)		138,1±29,3	156,0±24,9	0,090
ApoB (mg/dL)		131,0±29,8	124,3±31,3	0,557
ApoB/ApoAI		1,0±0,4	0,8±0,1	0,138
TG/HDL-c		3,0±1,9	1,4±0,4	<0,001

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Variáveis transformadas em logaritmo (\log_{10}) para os testes estatísticos e comparadas por teste t de Student.

ApoAI, apolipoproteína AI; ApoB, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HC, pacientes hipercolesterolêmicos; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; NL, pacientes normolipidêmicos; TG, triglicerídeos; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Tabela 12 – Efeito do SNP C-105T no perfil lipídico sérico de indivíduos do grupo ATORVA, antes após o tratamento com atorvastatina

Variável		-105CC (136)	-105 CT / TT (5)	p
CT (mg/dL)	<i>Basal</i>	281,8±38,5	259,8±33,6	0,182
	<i>Atorvastatina</i>	199,1±31,4	203,6±32,9	0,736
	<i>Variação (%)</i>	-29,0±9,5	-21,6±8,7	0,091
TG (mg/dL)	<i>Basal</i>	161,2±65,4	97,2±17,7	0,015
	<i>Atorvastatina</i>	133,5±53,0	100,0±15,2	0,203
	<i>Variação (%)</i>	-13,0±27,3	5,4±23,6	0,139
HDL-c (mg/dL)	<i>Basal</i>	55,6±13,6	73,0±15,4	0,010
	<i>Atorvastatina</i>	53,5±12,5	69,6±10,0	0,007
	<i>Variação (%)</i>	-2,8±11,5	-3,4±9,0	0,907
LDL-c (mg/dL)	<i>Basal</i>	193,7±35,4	167,4±23,0	0,069
	<i>Atorvastatina</i>	118,7±27,9	114,0±22,7	0,783
	<i>Variação (%)</i>	-38,3±12,4	-31,9±10,4	0,262
VLDL-c (mg/dL)	<i>Basal</i>	32,2±13,1	19,4±3,5	0,015
	<i>Atorvastatina</i>	26,7±10,6	20,0±3,1	0,203
	<i>Variação (%)</i>	-13,0±27,3	5,4±23,6	0,139
ApoAI (mg/dL)	<i>Basal</i>	131,1±25,8	158,0±25,4	0,040
	<i>Atorvastatina</i>	134,7±26,3	174,4±39,7	0,004
	<i>Variação (%)</i>	4,4±26,1	10,0±11,5	0,134
ApoB (mg/dL)	<i>Basal</i>	143,9±26,1	137,2±33,4	0,520
	<i>Atorvastatina</i>	100,6±19,9	94,9±13,0	0,610
	<i>Variação (%)</i>	-28,8±17,8	-28,0±16,9	0,970
ApoB/ApoAI	<i>Basal</i>	1,1±0,4	0,9±0,1	<0,001
	<i>Atorvastatina</i>	0,8±0,2	0,6±0,2	0,014
	<i>Variação (%)</i>	-30,6±16,5	-33,1±19,7	0,732
TG/HDL-c	<i>Basal</i>	3,2±1,9	1,4±0,4	0,004
	<i>Atorvastatina</i>	2,7±1,3	1,5±0,3	0,042
	<i>Variação (%)</i>	-9,2±31,2	9,2±21,9	0,195

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Média de variação com sinal negativo indica redução dos valores das variáveis. Variáveis transformadas em logaritmo (\log_{10}) para os testes estatísticos e comparadas por teste t de Student. ApoAI, apolipoproteína AI; ApoB, apolipoproteína B; ATORVA, pacientes hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; TG, triglicerídeos; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

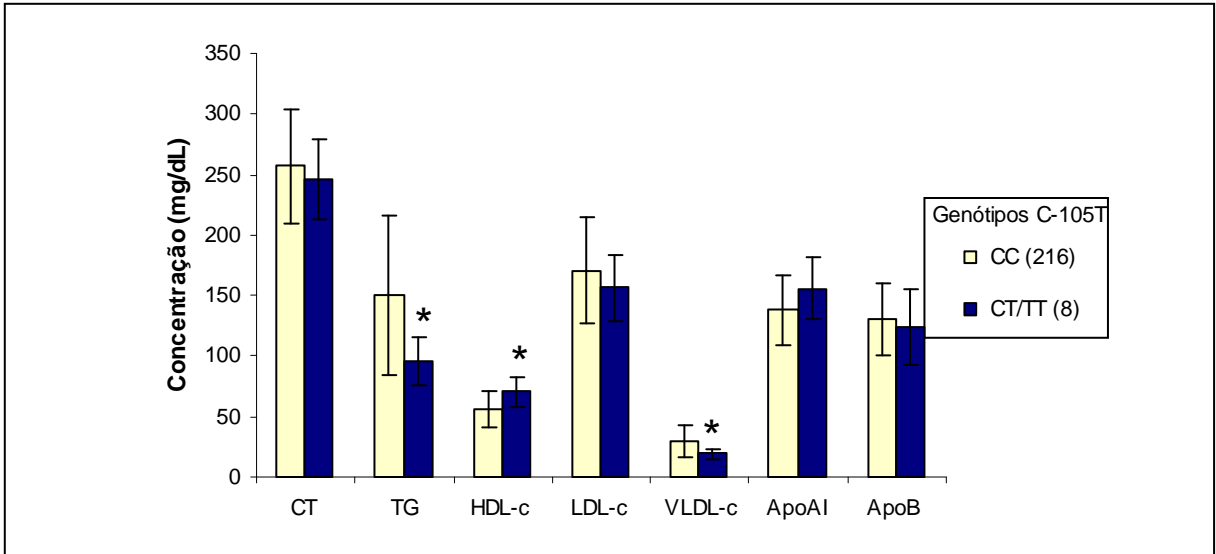


Figura 15. Perfil lipídico sérico basal de indivíduos do grupo HC segundo genótipos do SNP *ABCA1* C-105T

Nota: ApoAI, apolipoproteína AI; ApoB, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HC, pacientes hipercolesterolêmicos; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; TG, triglicerídeos; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

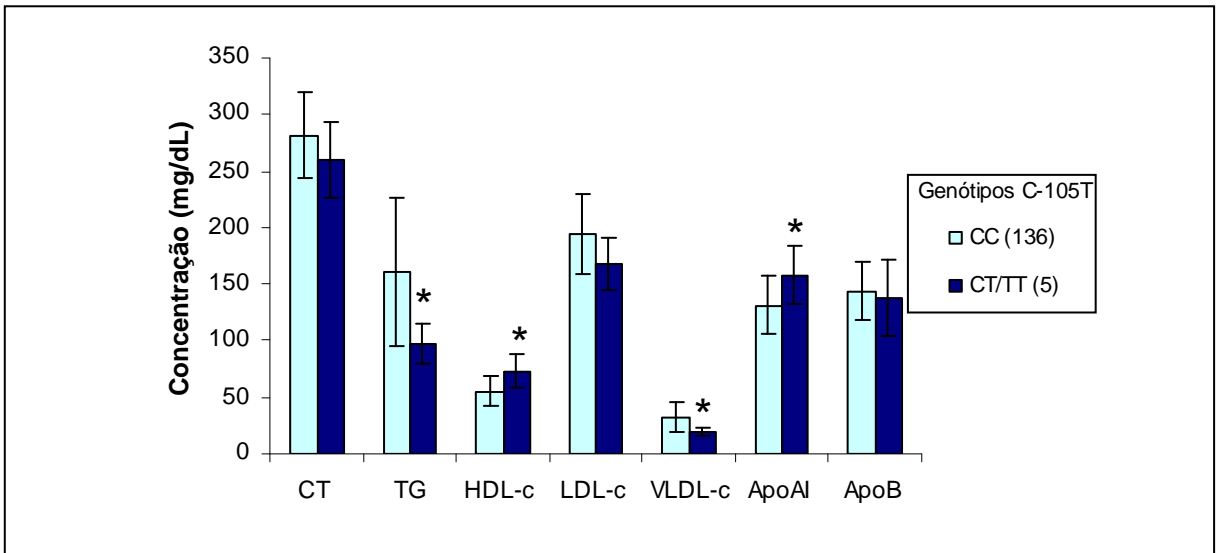


Figura 16. Perfil lipídico sérico basal de indivíduos do grupo ATORVA segundo genótipos do SNP *ABCA1* C-105T

Nota: ApoAI, apolipoproteína AI; ApoB, apolipoproteína B; ATORVA, pacientes hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; TG, triglicerídeos; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

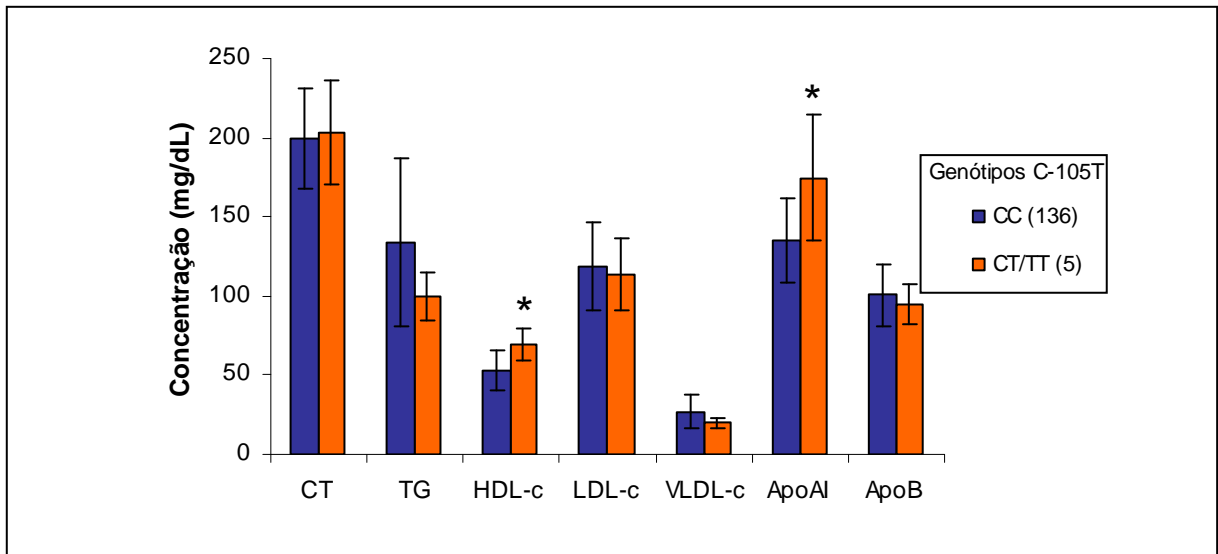


Figura 17. Perfil lipídico sérico de indivíduos do grupo ATORVA após o tratamento com atorvastatina (10mg/dia/4semanas) segundo genótipos do SNP *ABCA1* C-105T

Nota: ApoA1, apolipoproteína A1; ApoB, apolipoproteína B; ATORVA, pacientes hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; TG, triglicerídeos; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

4.4.4 Análise de haplótipos

O polimorfismo *ABCA1* C-105T, descoberto em nosso laboratório, mostrou não estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo de pacientes hipercolesterolêmicos ($\chi^2 = 9,53$, $p < 0,01$) (**Tabela 5** anterior). Neste mesmo grupo, este polimorfismo aparece associado ao SNP C-14T, conforme demonstrado na **Tabela 13**.

A análise dos dados utilizando-se o programa *Estimating Haplotype* (USA, 2006) confirmou a existência de associação (desequilíbrio de ligação) entre os alelos dos polimorfismos C-14T e C-105T no grupo HC ($\chi^2 = 12,28$, $p < 0,01$) mas não no grupo NL ($\chi^2 = 3,29$, $p > 0,05$). O fato de não ter sido observada associação entre os SNPs no grupo NL deve-se, provavelmente, ao fato da baixa freqüência do alelo -

105T neste grupo. É possível que a inclusão de mais indivíduos NL modifique este resultado.

Ao analisar as interações do SNP R219K (G70943A), verificou-se ausência de associação tanto com o SNP C-105T quanto com o SNP C-14T nos grupos HC e NL ($p>0,05$). Portanto, o SNP R219K parece não estar em desequilíbrio de ligação com os SNPs da região promotora avaliados neste estudo.

Com base nos dados de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos C-14T e C-105T, seis haplótipos foram encontrados (**Tabela 13**), sendo que os haplótipos -14CC/-105CC e -14CT/-105CC foram os mais freqüentes e os -14TT/-105CT e -14TT/-105TT os menos freqüentes. Para melhor visualização da possível interferência da associação destes dois polimorfismos no perfil lipídico dos pacientes estudados e na resposta à terapia com atorvastatina, foram formados três grupos, sendo os haplótipos agrupados da seguinte forma: -14CC/-105CC; -14CT+TT/-105CC e -14CT+TT/-105CT+TT. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o perfil lipídico de pacientes normolipidêmicos portadores dos diferentes haplótipos (**Tabela 14**).

Tanto no grupo HC total quanto no grupo ATORVA, os portadores dos haplótipos -14CT+TT/-105CT+TT apresentaram menores concentrações séricas basais de triglicerídeos (HC, $p=0,006$; ATORVA, $p=0,027$) e VLDL-c (HC, $p=0,005$; ATORVA, $p=0,027$), menor índice TG/HDL-c basal (HC, $p=0,002$; ATORVA, $p=0,010$) e maior concentração basal de HDL-c (HC, $p=0,017$; ATORVA, $p=0,030$) quando comparado aos portadores dos outros haplótipos (**Tabelas 14 e 15, Figuras 18 e 19**).

Após o tratamento farmacológico, os portadores dos haplótipos -14CT+TT/-105CT+TT mantiveram maior concentração sérica de HDL-c ($p=0,021$) e passaram a apresentar maior concentração de apoA1 ($p=0,015$) que os portadores dos outros

haplótipos; além disso, apresentaram menor índice apoB/apoAI ($p=0,019$) quando comparados aos portadores do haplótipo -14CC/-105CC (**Tabela 15 e Figura 20**).

A maior concentração plasmática de apoAI dos portadores dos haplótipos -14CT+TT/-105CT+TT (**Tabela 15**), significativa somente após o tratamento com atorvastatina, sugere que a associação dos dois SNPs (C-14T e C-105T) pode estar relacionada com a resposta à terapia com atorvastatina.

Tabela 13 – Frequência de genótipos e haplótipos dos polimorfismos *ABCA1* C-105T e C-14T, em HC e NL

NL (143)		C-14T		
C-105T	CC	CT	TT	
CC	42,0 % (60)	46,1 % (66)	9,1 % (13)	
CT	0,0 % (0)	2,8 % (4)	0,0 % (0)	
TT	0,0 % (0)	0,0 % (0)	0,0 % (0)	
Teste exato de Fisher $p=0,195$				
HC (224)		C-14T		
C-105T	CC	CT	TT	
CC	43,3 % (97)	41,1 % (92)	12,1 % (27)	
CT	0,0 % (0)	2,2 % (5)	0,9 % (2)	
TT	0,0 % (0)	0,0 % (0)	0,4 % (1)	
Teste exato de Fisher $p=0,006$				
Haplotipos	HC	NL		
-14CC/-105CC	43,3% (97)	42,0% (60)		
-14CT/-105CC	41,1% (92)	46,1% (66)		
-14CT/-105CT	2,2% (5)	2,8% (4)	Teste exato de Fisher $p=0,765$	
-14TT/-105CC	12,1% (27)	9,1% (13)		
-14TT/-105CT	0,9% (2)	0,0% (0)		
-14TT/-105TT	0,4% (1)	0,0% (0)		

Nota: Número de indivíduos em parênteses. HC, pacientes hipercolesterolêmicos; NL, pacientes normolipidêmicos.

Tabela 14 – Influência de haplótipos *ABCA1* C-14T e C-105T sobre o perfil lipídico sérico de indivíduos NL e HC

Variável	Haplótipos			p
	NL (143)	-14CC/-105CC (60)	-14CT+TT/-105CC (79)	
CT (mg/dL)	172,3±15,5	173,1±20,0	188,5±10,8	0,254
TG (mg/dL)	83,1±28,7	83,2±28,4	95,5±32,4	0,662
HDL-c (mg/dL)	58,8±13,6	56,1±12,8	58,2±11,6	0,496
LDL-c (mg/dL)	96,8±16,1	100,3±18,9	111,3±9,5	0,265
VLDL-c (mg/dL)	16,6±5,7	16,6±5,7	19,1±6,5	0,662
ApoAI (mg/dL)	145,5±29,9	139,9±26,8	147,7±21,4	0,553
ApoB (mg/dL)	81,3±19,6	88,6±24,4	86,8±10,1	0,181
ApoB/ApoAI	0,6±0,2	0,7±0,2	0,6±0,2	0,176
TG/HDL-c	1,6±0,8	1,6±0,8	1,8±1,1	0,744
HC (224)	-14CC/-105CC (97)	-14CT+TT/-105CC (119)	-14CT+TT/-105CT+TT (8)	p
CT (mg/dL)	258,5±49,9	256,5±44,7	245,9±33,2	0,836
TG (mg/dL)	143,4±70,4 ^b	155,3±61,1 ^b	95,3±19,8 ^a	0,006
HDL-c (mg/dL)	58,2±15,8 ^b	55,4±13,4 ^b	70,5±12,4 ^a	0,017
LDL-c (mg/dL)	171,3±45,4	170,0±42,6	156,4±27,3	0,763
VLDL-c (mg/dL)	28,6±14,1 ^b	31,1±12,2 ^b	19,1±4,0 ^a	0,005
ApoAI (mg/dL)	140,3±32,4	136,4±26,8	156,0±24,9	0,177
ApoB (mg/dL)	130,4±33,2	131,4±27,0	124,3±31,3	0,749
ApoB/ApoAI	1,0±0,3	1,0±0,4	0,8±0,1	0,245
TG/HDL-c	2,8±2,0 ^b	3,1±1,8 ^b	1,4±0,4 ^a	0,002

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Variáveis transformadas em logaritmo (\log_{10}) para os testes estatísticos e comparadas por *One-Way* ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey. ^{a,b} Letras diferentes na mesma linha apontam médias significativamente diferentes.

ApoAI, apolipoproteína AI; ApoB, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HC, pacientes hipercolesterolêmicos; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; NL, pacientes normolipidêmicos; TG, triglicerídeos; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Tabela 15 – Influência de haplótipos *ABCA1* C-14T e C-105T sobre o perfil lipídico sérico de indivíduos do grupo ATORVA, antes e após o tratamento com atorvastatina

Variável		-14CC/ -105CC (60)	-14CT+TT/ 105CC (76)	-14CT+TT / -105CT+TT (5)	<i>p</i>
CT (mg/dL)	<i>Basal</i>	284,3±42,3	279,8±35,3	259,8±33,6	0,349
	<i>Atorvastatina</i>	203,6±31,2	195,5±31,2	203,6±32,9	0,304
	<i>Variação (%)</i>	-27,8±10,4	-29,9±8,8	-21,6±8,7	0,102
TG (mg/dL)	<i>Basal</i>	157,0±72,9 ^b	164,5±59,1 ^b	97,2±17,7 ^a	0,027
	<i>Atorvastatina</i>	131,5±57,7	135,1±49,3	100,0±15,2	0,367
	<i>Variação (%)</i>	-11,1±29,1	-14,6±25,8	5,4±23,6	0,253
HDL-c (mg/dL)	<i>Basal</i>	56,6±14,6 ^b	54,8±12,9 ^b	73,0±15,4 ^a	0,030
	<i>Atorvastatina</i>	54,3±12,9 ^b	52,8±12,2 ^b	69,6±10,0 ^a	0,021
	<i>Variação (%)</i>	-2,8±11,6	-2,8±11,5	-3,4±9,0	0,993
LDL-c (mg/dL)	<i>Basal</i>	195,8±37,5	192,1±33,8	167,4±23,0	0,165
	<i>Atorvastatina</i>	122,8±28,0	115,4±27,5	114,0±22,7	0,282
	<i>Variação (%)</i>	-36,6±12,9	-39,6±12,0	-31,9±10,4	0,204
VLDL-c (mg/dL)	<i>Basal</i>	31,4±14,6 ^b	32,9±11,8 ^b	19,4±3,5 ^a	0,027
	<i>Atorvastatina</i>	26,3±11,6	27,0±9,9	20,0±3,2	0,367
	<i>Variação (%)</i>	-11,1±29,1	-14,6±25,8	5,4±23,6	0,253
ApoAI (mg/dL)	<i>Basal</i>	132,8±24,0	129,8±27,2	158,0±25,4	0,085
	<i>Atorvastatina</i>	134,1±24,7 ^b	135,2±27,6 ^b	174,4±39,7 ^a	0,015
	<i>Variação (%)</i>	1,2±11,5	6,8±33,0	10,0±11,6	0,428
ApoB (mg/dL)	<i>Basal</i>	147,5±27,9	141,1±24,4	137,2±33,4	0,308
	<i>Atorvastatina</i>	103,5±18,2	98,3±20,9	94,9±13,0	0,209
	<i>Variação (%)</i>	-29,0±12,0	-28,6±21,3	-28,0±16,9	0,990
ApoB/ApoAI	<i>Basal</i>	1,1±0,3	1,2±0,4	0,9±0,1	0,117
	<i>Atorvastatina</i>	0,8±0,2 ^b	0,7±0,2 ^{ab}	0,6±0,2 ^a	0,019
	<i>Variação (%)</i>	-29,4±12,9	-31,4±18,7	-33,1±19,7	0,753
TG/HDL-c	<i>Basal</i>	3,1±2,1 ^b	3,3±1,7 ^b	1,4±0,4 ^a	0,010
	<i>Atorvastatina</i>	2,7±1,6	2,7±1,1	1,5±0,3	0,075
	<i>Variação (%)</i>	-7,1±33,5	-10,8±29,3	9,2±21,9	0,344

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Média de variação com sinal negativo indica redução dos valores das variáveis. Variáveis transformadas em logaritmo (\log_{10}) para os testes estatísticos e comparadas por *One-Way* ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey. ^{a,b} Letras diferentes na mesma linha apontam médias significativamente diferentes.

ApoAI, apolipoproteína AI; ApoB, apolipoproteína B; ATORVA, pacientes hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; TG, triglicerídeos; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

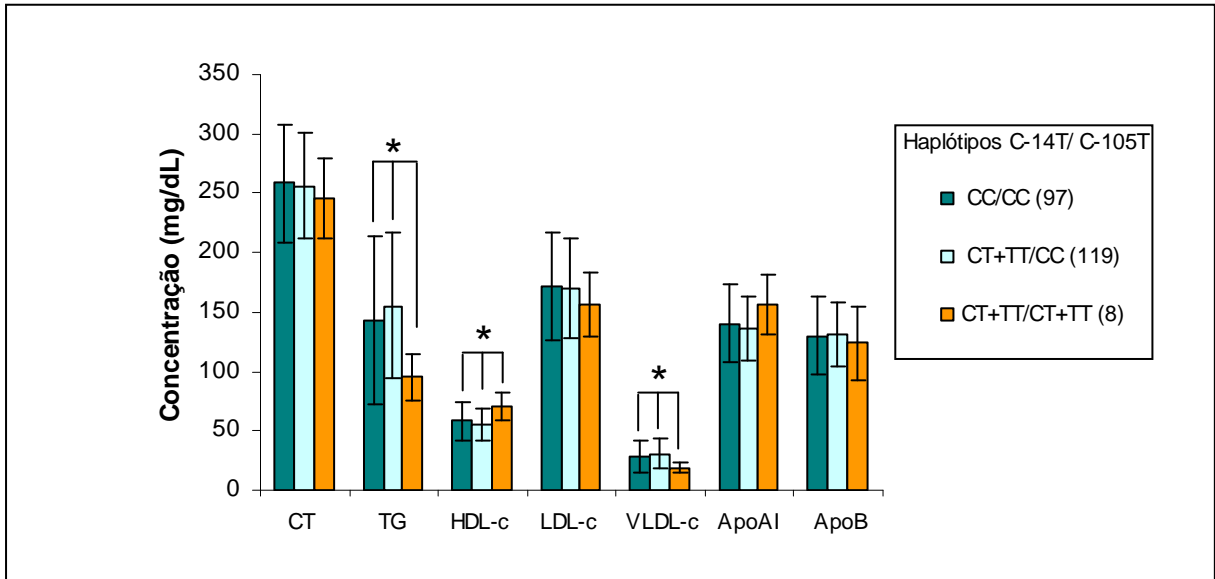


Figura 18. Perfil lipídico sérico basal de indivíduos do grupo HC segundo haplótipos *ABCA1* C-14T/C-105T

Nota: ApoAI, apolipoproteína AI; ApoB, apolipoproteína B; CT, colesterol total; HC, pacientes hipercolesterolêmicos; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; TG, triglicerídeos; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

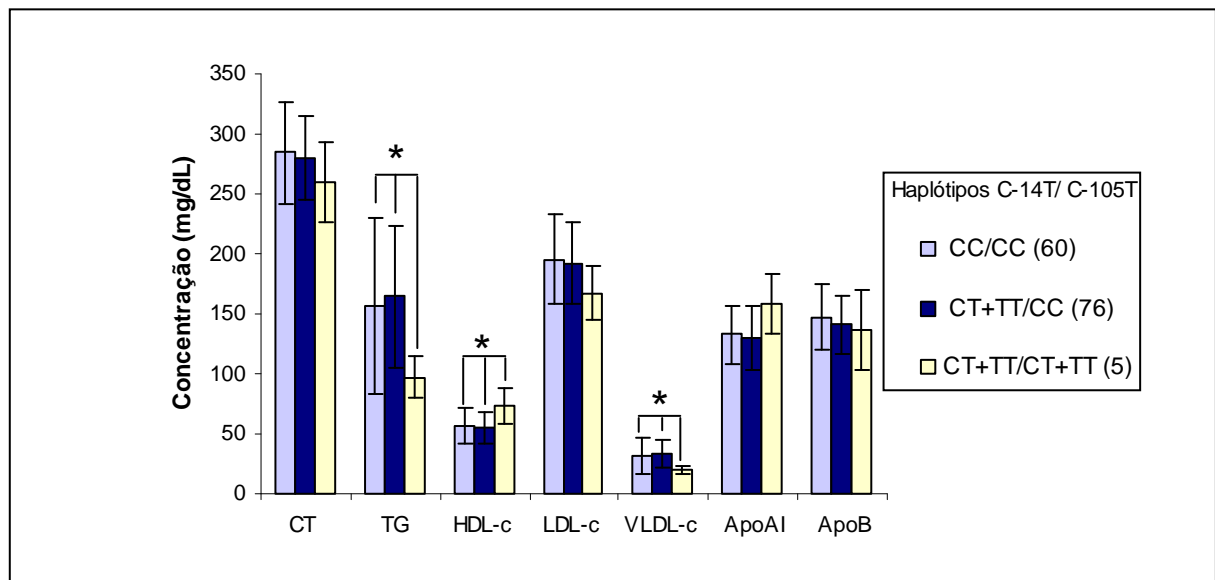


Figura 19. Perfil lipídico sérico basal de indivíduos do grupo ATORVA segundo haplótipos *ABCA1* C-14T/C-105T

Nota: ApoAI, apolipoproteína AI; ApoB, apolipoproteína B; ATORVA, pacientes hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; TG, triglicerídeos; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

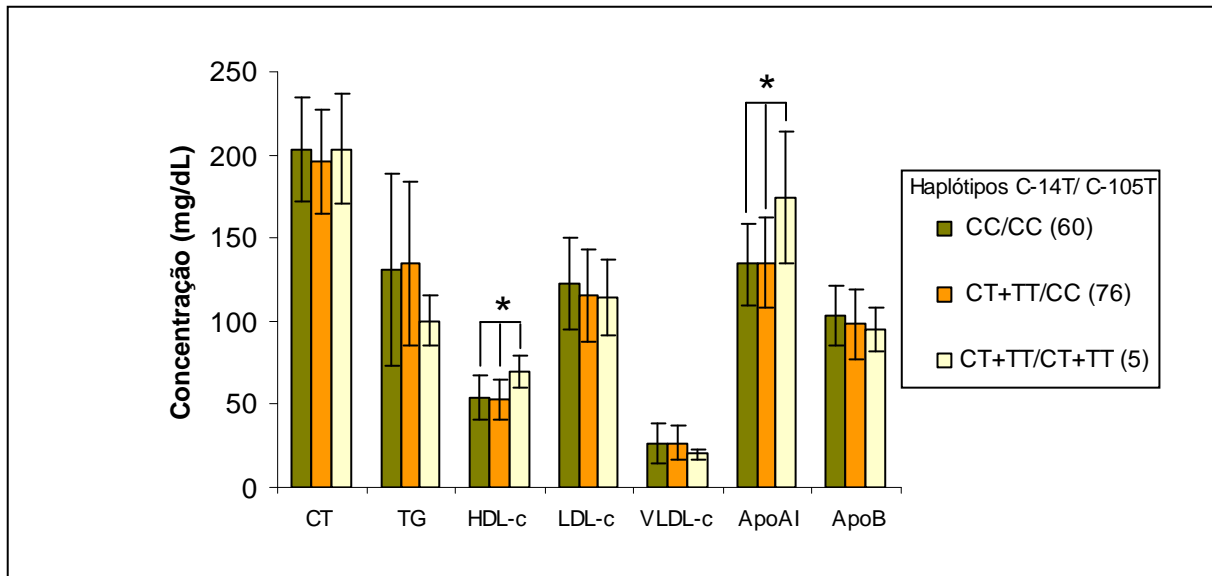


Figura 20. Perfil lipídico sérico de indivíduos do grupo ATORVA após o tratamento com atorvastatina (10mg/dia/4semanas) segundo haplótipos *ABCA1* C-14T/C-105T

Nota: ApoAI, apolipoproteína AI; ApoB, apolipoproteína B; ATORVA, pacientes hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; TG, triglicerídeos; VLDL-c, colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

4.5 ESTUDO DA EXPRESSÃO DO RNAm DO *ABCA1*

As análises da expressão de RNAm do *ABCA1* em CMSP, por PCR em Tempo Real, foram realizadas com 132 pacientes normolipidêmicos (NL) e 128 pacientes hipercolesterolêmicos (ATORVA), no tempo basal (HC-Basal) e após o tratamento com atorvastatina (HC-Atorva).

Os valores de expressão de RNAm do *ABCA1* em CMSP apresentaram alta dispersão. Em virtude disto, as análises de expressão gênica foram realizadas separadamente para dois grupos: um com valores de expressão basal maiores que o valor da mediana (GM1) e outro com valores de expressão basal menores do que o valor da mediana (GM2). É importante ressaltar que o valor da mediana de expressão gênica foi determinado a partir da união de todos os

valores basais de expressão gênica dos grupos NL e HC. Este procedimento evita o aparecimento de falsas diferenças entre os grupos.

Pacientes HC apresentaram menor expressão basal de RNAm do *ABCA1* em CMSP do que indivíduos NL tanto no grupo GM1 ($p=0,010$) quanto no grupo GM2 ($p<0,001$) (**Tabela 16 e Figura 21**). A média da expressão basal foi aproximadamente três vezes maior no grupo GM1 do que no GM2, em ambos os grupos NL e HC ($p<0,001$) (**Tabela 16**).

A expressão do *ABCA1* não foi modificada pelo tratamento com atorvastatina, em ambos os grupos GM1 e GM2 ($p>0,05$) (**Tabela 16 e Figura 21**).

As relações entre os SNPs do *ABCA1* e a expressão de RNAm em CMSP também foram avaliadas. No GM1, não foram observadas diferenças de expressão basal entre os portadores dos genótipos do SNP G70943A (R219K) dos grupos NL e HC (**Tabela 17**). No entanto, no GM2, verificou-se que os HC portadores do alelo 70943A (genótipos GA + AA) apresentaram menores valores de expressão basal quando comparados aos NL ($p=0,024$). Isso não foi encontrado nos portadores do genótipo GG. Não se observou relação entre o SNP G70943A (R219K) e a expressão de RNAm do *ABCA1* em resposta a atorvastatina, em ambos os grupos GM1 e GM2 (**Tabela 17**).

Na **Tabela 18**, são apresentados os dados de expressão de RNAm do *ABCA1* para o SNP C-14T. Nos grupos GM1 e GM2, a expressão gênica basal foi menor em pacientes HC portadores do genótipo CC quando comparados aos indivíduos NL (GM1, $p=0,029$; GM2, $p<0,001$), o que não foi observado nos portadores do alelo -14T (genótipos CT+TT) (**Figura 22**). Por outro lado, no grupo GM1, a atorvastatina reduziu cerca de 33% a expressão gênica nos

portadores do alelo -14T ($p=0,009$). Esse efeito não foi observado no grupo GM2.

Para análises de expressão gênica envolvendo o novo SNP C-105T ou os haplótipos dos SNPs C-14T e C-105T, os pacientes não foram subdivididos em grupos com base no valor da mediana da distribuição dos valores de expressão gênica. Isso devido à baixa frequência do alelo -105T neste estudo (NL, 1,4%; HC, 2,0%).

Os indivíduos HC portadores do alelo -105C (genótipo CC) apresentaram menor expressão basal (50%) que os NL ($p<0,001$), mas isso não foi observado para os portadores do alelo -105T (genótipo CT + TT) (**Tabela 19 e Figura 23**). Após o tratamento com atorvastatina, a redução da expressão gênica também foi observada nos portadores do alelo -105C ($p=0,019$), mas não nos portadores do alelo -105T; no entanto, em virtude das médias dos valores de expressão estarem muito próximas e pelo fato de haver uma grande dispersão de valores, este dado precisa ser reavaliado.

Na **Tabela 20** observa-se que a expressão basal de RNAm do *ABCA1* dos portadores dos haplótipos comuns (-14CC/-105CC e -14CT+TT/-105CC) foi menor no grupo HC quando comparado à do grupo NL ($p<0,001$) (**Figura 24**). Essa diferença não foi observada no grupo de portadores do haplótipo raro (-14CT+TT/-105CT+TT) porém, devido ao pequeno número de indivíduos portadores desse haplótipo, esses resultados devem ser analisados com cautela.

A expressão gênica após o tratamento com atorvastatina foi significativamente reduzida em indivíduos portadores do haplótipo -14CT+TT/-105CC ($p=0,041$) mas não nos portadores de haplótipos -14CC/-105CC e -14CT+TT/-105CT+TT (**Tabela 20**).

É importante salientar que embora a variabilidade desses resultados tenha sido maior devido ao não agrupamento de GM1 e GM2 nesta análise, observa-se que a presença do alelo -14T está associada à redução da expressão do ABCA1 em resposta a atorvastatina, confirmando os resultados previamente apresentados para o polimorfismo C-14T no grupo GM1 (**Tabela 18**).

Tabela 16 – Valores da expressão basal de RNAm do *ABCA1* em CMSP de pacientes normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos, antes e após o tratamento com atorvastatina

		GM1	GM2	<i>p</i>
NL	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct^{NL} - \Delta Ct^{Caco2}$)	48,8±27,8 (90)	13,1±3,3 (42)	<0,001
HC-Basal	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct^{HC-Basal} - \Delta Ct^{Caco2}$)	37,3±21,8 (40)	11,0±3,9 (88)	<0,001
<i>p</i>		0,010	<0,001	
HC-Atorva	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct^{HC-Atorva} - \Delta Ct^{Caco2}$)	31,2±26,8 (40)	12,2±12,7 (88)	<0,001
<i>p</i> *		0,198	0,364	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Variáveis transformadas em logaritmo (\log_{10}) para os testes estatísticos e comparadas por teste t de Student.

*p** referente ao teste t de Student para amostras pareadas entre valores de expressão basais e após tratamento com atorvastatina.

Caco2, linhagem celular Caco2; CMSP, células mononucleares do sangue periférico; GM1, grupo com valores de expressão maiores do que o valor da mediana dos valores basais; GM2, grupo com valores de expressão menores do que o valor da mediana dos valores basais; HC-Atorva, hipercolesterolêmicos após tratamento com atorvastatina; HC-Basal, hipercolesterolêmicos, no tempo basal; NL, normolipidêmicos; RNAm, RNA mensageiro.

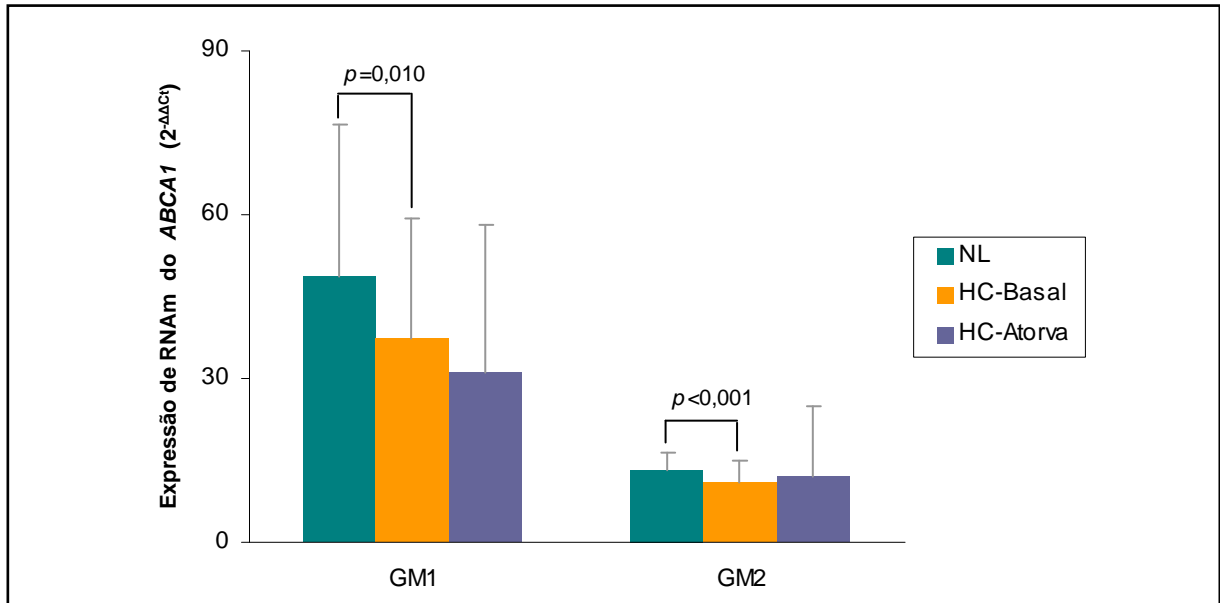


Figura 21. Valores da expressão relativa de RNAm do *ABCA1* em CMSP de pacientes normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos, antes e após o tratamento com atorvastatina, nos grupos GM1 e GM2

Nota: CMSP, células mononucleares do sangue periférico; GM1, grupo com valores de expressão maiores do que o valor da mediana dos valores basais; GM2, grupo com valores de expressão menores do que o valor da mediana dos valores basais; HC-Atorva, hipercolesterolêmicos após tratamento com atorvastatina; HC-Basal, hipercolesterolêmicos, no tempo basal; NL, normolipidêmicos; RNAm, RNA mensageiro.

Tabela 17 – Influência do SNP G70943A (R219K) na expressão basal de RNAm do *ABCA1* em CMSP de pacientes normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos, antes e após o tratamento com atorvastatina

GM1		70943GG	70943GA/AA	<i>p</i>
NL	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct^{NL} - \Delta Ct^{Caco2}$)	52,4±31,1 (33)	46,7±25,8 (57)	0,383
HC-Basal	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct^{HC-Basal} - \Delta Ct^{Caco2}$)	38,8±22,4 (16)	36,2±21,8 (24)	0,678
<i>p</i>		0,090	0,053	
HC-Atorva	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct^{HC-Atorva} - \Delta Ct^{Caco2}$)	29,3±19,2 (16)	32,5±31,1 (24)	0,816
<i>p</i> *		0,114	0,585	
GM2		70943GG	70943GA/AA	<i>p</i>
NL	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct^{NL} - \Delta Ct^{Caco2}$)	13,2±3,4 (18)	13,0±3,4 (24)	0,807
HC-Basal	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct^{HC-Basal} - \Delta Ct^{Caco2}$)	11,2±3,7 (28)	10,9±4,0 (60)	0,665
<i>p</i>		0,055	0,024	
HC-Atorva	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct^{HC-Atorva} - \Delta Ct^{Caco2}$)	11,8±7,1 (28)	12,4±14,7 (60)	0,629
<i>p</i> *		0,726	0,406	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Variáveis transformadas em logaritmo (\log_{10}) para os testes estatísticos e comparadas por teste t de Student.

*p** referente ao teste t de Student para amostras pareadas entre valores de expressão basais e após tratamento com atorvastatina.

Caco2, linhagem celular Caco2; CMSP, células mononucleares do sangue periférico; GM1, grupo com valores de expressão maiores do que o valor da mediana dos valores basais; GM2, grupo com valores de expressão menores do o valor da mediana dos valores basais; HC-Atorva, hipercolesterolêmicos após tratamento com atorvastatina; HC-Basal, hipercolesterolêmicos, no tempo basal; NL, normolipidêmicos; RNAm, RNA mensageiro; SNP, polimorfismo de nucleotídeo único.

Tabela 18 – Influência do SNP C-14T na expressão basal de RNAm do *ABCA1* em CMSP de pacientes normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos, antes e após o tratamento com atorvastatina

GM1		-14CC	-14CT / TT	p
NL	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct^{NL} - \Delta Ct^{Caco2}$)	45,6±23,5 (38)	51,1±30,6 (52)	0,543
HC-Basal	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct^{HC-Basal} - \Delta Ct^{Caco2}$)	33,8±21,3 (18)	40,1±22,2 (22)	0,271
p		0,029	0,139	
HC-Atorva	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct^{HC-Atorva} - \Delta Ct^{Caco2}$)	36,4±31,2 (18)	27,0±22,4 (22)	0,345
p*		0,759	0,009	
GM2		-14CC	-14CT / TT	
NL	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct^{NL} - \Delta Ct^{Caco2}$)	14,1±2,7 (16)	12,6±3,6 (26)	0,122
HC-Basal	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct^{HC-Basal} - \Delta Ct^{Caco2}$)	10,7±3,5 (36)	11,2±4,2 (52)	0,711
p		<0,001	0,125	
HC-Atorva	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct^{HC-Atorva} - \Delta Ct^{Caco2}$)	10,4±5,9 (36)	13,5±15,8 (52)	0,424
p*		0,786	0,295	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Variáveis transformadas em logaritmo (\log_{10}) para os testes estatísticos e comparadas por teste t de Student.

p* referente ao teste t de Student para amostras pareadas entre valores de expressão basais e após tratamento com atorvastatina.

Caco2, linhagem celular Caco2; CMSP, células mononucleares do sangue periférico; GM1, grupo com valores de expressão maiores do que o valor da mediana dos valores basais; GM2, grupo com valores de expressão menores do que o valor da mediana dos valores basais; HC-Atorva, hipercolesterolêmicos após tratamento com atorvastatina; HC-Basal, hipercolesterolêmicos, no tempo basal; NL, normolipidêmicos; RNAm, RNA mensageiro; SNP, polimorfismo de nucleotídeo único.

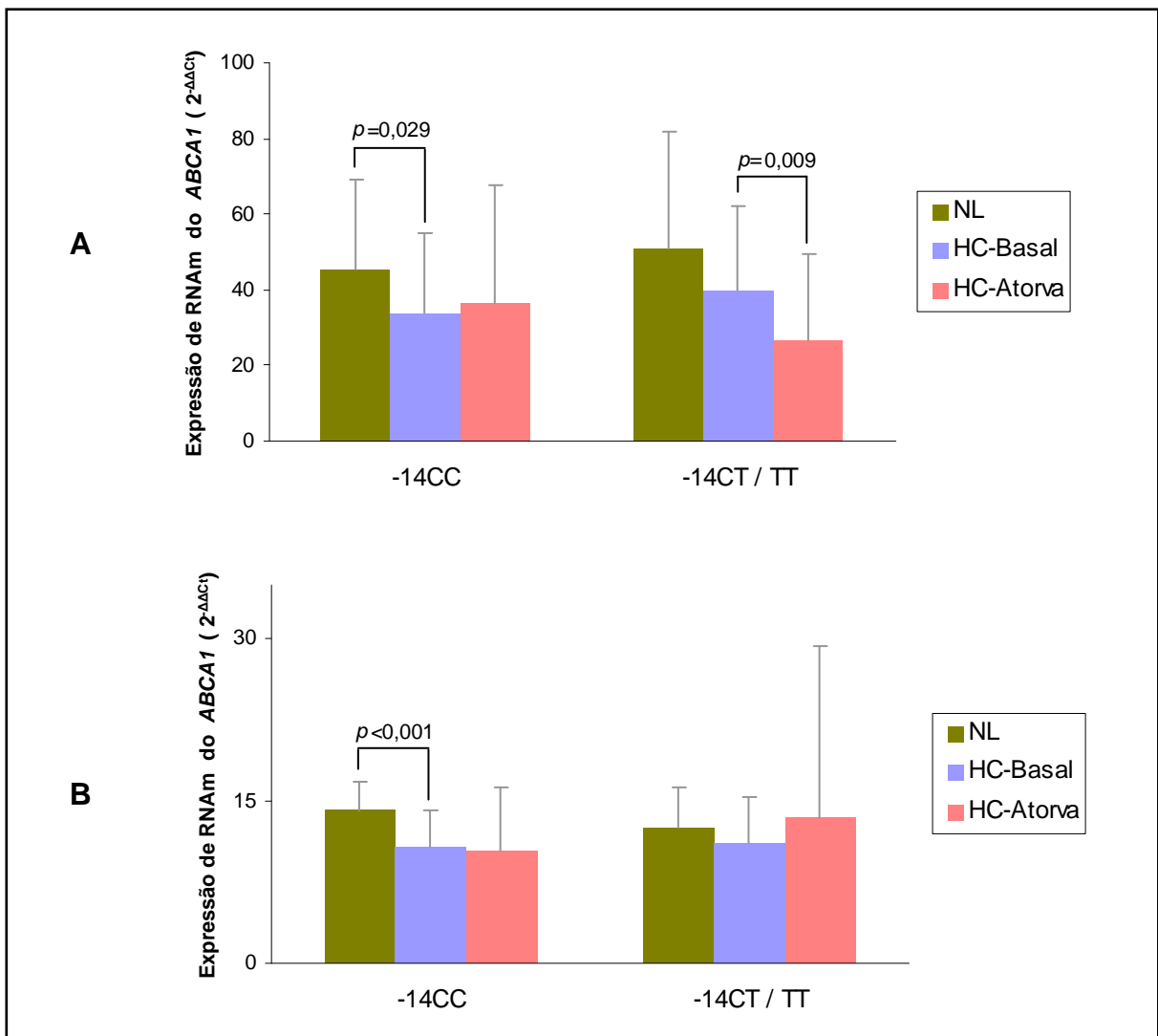


Figura 22. Influência do polimorfismo C-14T nos valores da expressão relativa de RNAm do *ABCA1* em CMSP de pacientes normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos, antes e após o tratamento com atorvastatina (A) Grupo GM1. (B) Grupo GM2.

Nota: CMSP, células mononucleares do sangue periférico; GM1, grupo com valores de expressão maiores do que o valor da mediana dos valores basais; GM2, grupo com valores de expressão menores do que o valor da mediana dos valores basais; HC-Atorva, hipercolesterolêmicos após tratamento com atorvastatina; HC-Basal, hipercolesterolêmicos, no tempo basal; NL, normolipidêmicos; RNAm, RNA mensageiro.

Tabela 19 – Influência do SNP C-105T na expressão de RNAm do *ABCA1* em CMSP de pacientes normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos, antes e após o tratamento com atorvastatina

		-105CC	-105CT/TT	<i>p</i>
NL	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct^{NL} - \Delta Ct^{Caco2}$)	37,6±28,6 (129)	32,6±19,0 (3)	0,920
HC-Basal	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct^{HC-Basal} - \Delta Ct^{Caco2}$)	18,8±17,4 (123)	27,3±18,0 (5)	0,180
<i>p</i>		<0,001	0,707	
HC-Atorva	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct^{HC-Atorva} - \Delta Ct^{Caco2}$)	17,9±20,5 (123)	22,7±13,8 (5)	0,237
<i>p</i> *		0,019	0,699	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Variáveis transformadas em logaritmo (\log_{10}) para os testes estatísticos e comparadas por teste t de Student.

*p** referente ao teste t de Student para amostras pareadas entre valores de expressão basais e após tratamento com atorvastatina.

Caco2, linhagem celular Caco2; CMSP, células mononucleares do sangue periférico; HC-Atorva, hipercolesterolêmicos após tratamento com atorvastatina; HC-Basal, hipercolesterolêmicos, no tempo basal; NL, normolipidêmicos; RNAm, RNA mensageiro; SNP, polimorfismo de nucleotídeo único.

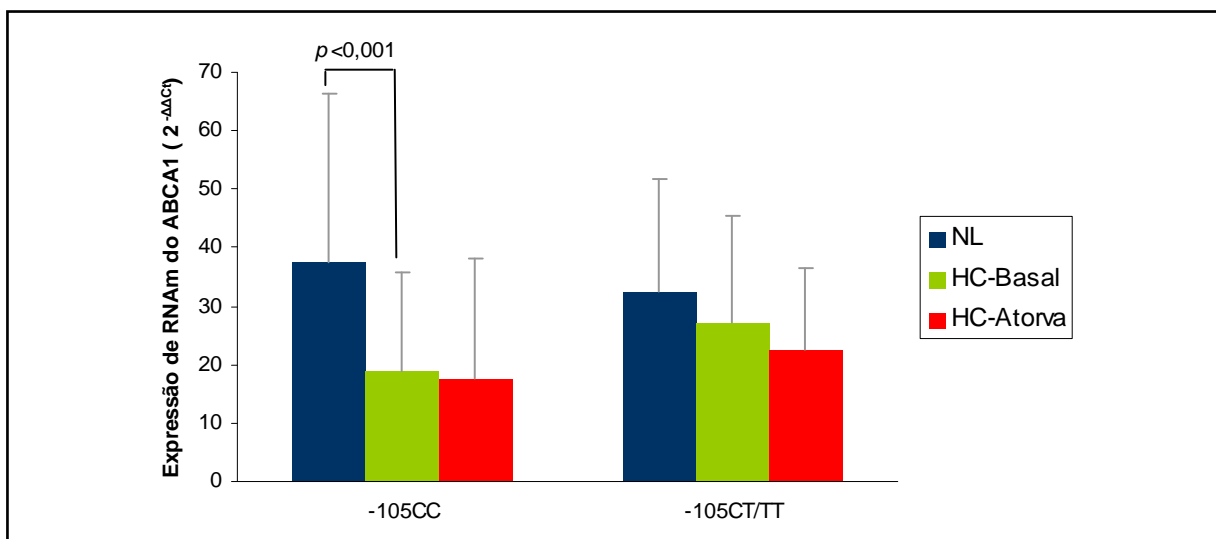


Figura 23. Influência do polimorfismo C-105T nos valores da expressão relativa de RNAm do *ABCA1* em CMSP de pacientes normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos, antes e após o tratamento com atorvastatina

Nota: CMSP, células mononucleares do sangue periférico; HC-Atorva, hipercolesterolêmicos após tratamento com atorvastatina; HC-Basal, hipercolesterolêmicos, no tempo basal; NL, normolipidêmicos; RNAm, RNA mensageiro.

Tabela 20 – Influência dos haplótipos (C-14T/C-105T) na expressão de RNAm do *ABCA1* em CMSP de pacientes normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos, antes e após o tratamento com atorvastatina

		-14CC/ -105CC	-14CT+TT/ -105CC	-14CT+TT/ -105CT+TT	<i>p</i>
NL	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct^{NL} - \Delta Ct^{Caco2}$)	36,3±24,5 (54)	38,5±31,4 (75)	32,6±19,0 (3)	0,953
HC-Basal	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct^{HC-Basal} - \Delta Ct^{Caco2}$)	18,4±16,6 (54)	19,3±18,2 (69)	27,3±18,0 (5)	0,408
<i>p</i>		<0,001	<0,001	0,707	
HC-Atorva	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct^{HC-Atorva} - \Delta Ct^{Caco2}$)	19,1±22,1 (54)	17,1±19,2 (69)	22,7±13,8 (5)	0,449
<i>p</i> *		0,234	0,041	0,699	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Valores são apresentados como média ± DP dos dados. Variáveis transformadas em logaritmo (\log_{10}) para os testes estatísticos e comparadas nas linhas por *One-Way* ANOVA e nas colunas por teste t de Student. *p** referente ao teste t de Student para amostras pareadas entre valores de expressão basal e após tratamento com atorvastatina. Caco2, linhagem celular Caco2; CMSP, células mononucleares do sangue periférico; HC-Atorva, hipercolesterolêmicos após tratamento com atorvastatina; HC-Basal, hipercolesterolêmicos, no tempo basal; NL, normolipidêmicos; RNAm, RNA mensageiro; SNP, polimorfismo de nucleotídeo único.

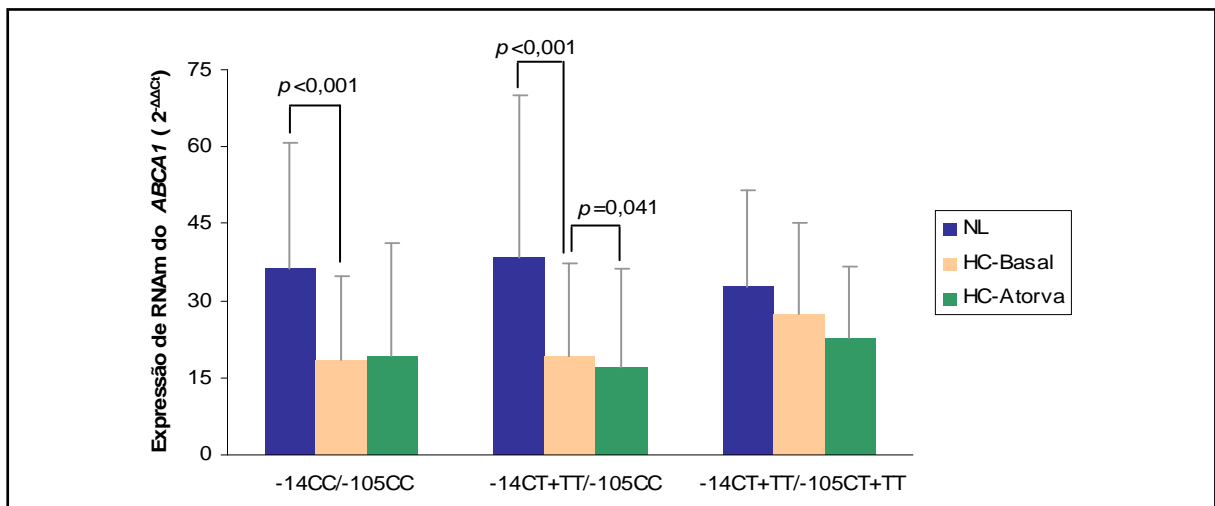


Figura 24. Influência dos haplótipos dos SNP C-14T e C-105T nos valores da expressão relativa de RNAm do *ABCA1* em CMSP de pacientes normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos, antes e após o tratamento com atorvastatina

Nota: CMSP, células mononucleares do sangue periférico; HC-Atorva, hipercolesterolêmicos após tratamento com atorvastatina; HC-Basal, hipercolesterolêmicos, no tempo basal; NL, normolipidêmicos; RNAm, RNA mensageiro.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, a frequência do alelo 70943A, do polimorfismo G70943A (R219K), foi 40,6% no grupo de pacientes normolipidêmicos e 42,0% no grupo de hipercolesterolêmicos. Estas frequências foram estatisticamente similares ($p>0,05$) às observadas em americanos com descendência caucasóide, hispânica ou chinesa (28,0%, 38,0% e 40,0%, respectivamente) (BENTON et al., 2006), em turcos (38,5%) (HODOGLUGIL et al., 2005), em europeus (28,0%) (CENARRO et al., 2003; TREGOUET et al., 2004), em japoneses (54,1%) (YAMAKAWA-KOBAYASHI et al., 2004) e em paquistaneses (37,3%) (SALEHEEN et al., 2007). Porém foram maiores do que as frequências observadas em outros estudos com europeus (25,4% e 26,0%) (CLEE et al., 2001; EVANS; BEIL, 2003) e com americanos brancos (26,2%) (SRINIVASAN et al., 2003) e menores do que as encontradas em negros americanos (59,5% e 64,0%) (BENTON et al., 2006; SRINIVASAN et al., 2003) ($p<0,05$).

Ao analisar a relação dos polimorfismos com o perfil lipídico, no grupo de indivíduos normolipidêmicos, observou-se que o SNP G70943A foi associado com maior concentração sérica de apoA1 ($p=0,035$), principal constituinte da partícula de HDL. Em hipercolesterolêmicos (HC e ATORVA) a presença do alelo 70943A (genótipos 70943GA/AA) foi relacionada com menores concentrações séricas basais de triglicérides e VLDL-c e com menor teor de LDL pequena e densa, dada pela relação TG/HDL-c. Além disso, no grupo ATORVA, o SNP G70943A foi associado com maiores concentrações de HDL-c. Esses resultados são sugestivos de que o SNP R219K (G70943A) está associado com um perfil lipídico sérico menos aterogênico na nossa população.

Alguns estudos também associaram o alelo 70943A com diminuição de triglicerídeos, aumento de HDL-c ou apoAI (BENTON et al., 2006; CLEE et al., 2001; MANTARING et al., 2007; YAMAKAWA-KOBAYASHI et al., 2004), porém outros não verificaram estas alterações (BERTOLINI et al., 2004; CENARRO et al., 2003; SALEHEEN et al., 2007; TREGOUET et al., 2004).

A associação do polimorfismo G70943A com o risco de DAC, estimado através da razão apoB/apoAI (THOMPSON; DANESH, 2006), não foi observada em nossa amostra de indivíduos clinicamente sem doença cardíaca. Em estudos caso/controle, este SNP foi associado com menor risco de DAC e de infarto do miocárdio, sem necessariamente estar relacionado com alterações de lipídeos plasmáticos (BERTOLINI et al., 2004; CENARRO et al., 2003; EVANS; BEIL, 2003; TREGOUET et al., 2004). Benton e colaboradores (2006), estudando americanos de ambos os sexos e sem evidência de doença cardíaca, demonstraram associação entre genótipo 70943AA e menor prevalência de calcificação coronariana, um marcador da aterosclerose subclínica.

Clee e colaboradores (2000) sugeriram que variações no efluxo de colesterol, advindas de variações da função do transportador ABCA1, têm reflexos tanto no HDL-c plasmático quanto na susceptibilidade à DAC. Em virtude deste trabalho, mais tarde, o mesmo grupo de pesquisa sugeriu que a variante 70943A (219K) está associada com o aumento da atividade da proteína ABCA1 e com a aceleração do TRC (CLEE et al., 2001). A substituição de arginina por lisina na posição 219 da proteína, na alça extracelular, pode resultar em mudança conformacional que melhora a interação entre a ABCA1 e a apoAI e/ou aumenta a eficiência de transferência de colesterol e fosfolipídeos dos estoques intracelulares para a membrana plasmática (BENTON et al., 2006). Esta hipótese também é sustentada por estudos que evidenciaram relação entre mutações nas alças

extracelulares da ABCA1 com diminuição do efluxo de colesterol e alterações na interação com a apoA1, em portadores da doença de Tangier e de Hipoalfalipoproteinemia Familiar (SINGARAJA et al., 2003; WANG; TALL, 2003).

Com relação ao polimorfismo C-14T, as freqüências do alelo raro -14T nos grupos HC e NL foram 35,0% e 33,6%, respectivamente. Estas freqüências foram similares às encontradas em americanos dos Estados Unidos (38,0%) (PULLINGER et al., 2000), em turcos (37,7%) (HODOGLUGIL et al., 2005), em homens, saudáveis ou com DAC, Malaios, Indianos e Chineses de Cingapura (31,7% a 44,3%) (Tan et al., 2003) e em duas populações do Reino Unido (33,5 e 34,6%) (TREGOUET et al., 2004) ($p>0,05$), porém foram maiores que as observadas em homens holandeses com DAC (13,8%, $p<0,05$) (ZWARTS et al., 2002).

Neste estudo não foi observada associação entre o perfil lipídico basal e o SNP C-14T em pacientes normolipidêmicos ou hipercolesterolêmicos (HC ou ATORVA). Resultados semelhantes foram observados em homens holandeses com DAC participantes do estudo *Regression Growth Evaluation Statin Study* (REGRESS), que avaliou o efeito da pravastatina na progressão de DAC em homens sintomáticos e com normal ou moderada elevação da concentração de colesterol plasmático (ZWARTS et al., 2002), e na população masculina de malaios e indianos, saudáveis ou portadores de DAC, residentes em Cingapura (TAN et al., 2003). Por outro lado, alguns estudos relacionaram o alelo -14T com o aumento de HDL-c em homens turcos e chineses (HODOGLUGIL et al., 2005; TAN et al., 2003).

O SNP C-14T foi associado com risco de DAC em indianos, em amostras de caso-controle (TAN et al., 2003) e com aumento do número de eventos coronarianos em homens holandeses com DAC (ZWARTS et al., 2002). Nós não encontramos associação significativa entre este polimorfismo e o risco de DAC. Estas diferenças podem ser devido ao fato de que nós somente estimamos do risco de DAC

baseados na razão apoB/apoAI (THOMPSON; DANESH, 2006) em indivíduos sem doenças cardíacas, enquanto os outros autores avaliaram pacientes com DAC comprovada.

Para o novo SNP *ABCA1* C-105T a frequência do alelo -105T no grupo HC (2,0%) foi similar à encontrada no grupo NL (1,4%, $p > 0,05$). Este resultado é sugestivo de que este SNP não está associado com hipercolesterolemia neste estudo. Contudo, a frequência deste polimorfismo é muito baixa neste grupo amostral e mais estudos precisam ser feitos para reavaliar estes resultados, especialmente devido ao fato de que este SNP não apresentou EHW no grupo HC ($\chi^2 = 9,53$; $p < 0,01$). Várias hipóteses têm sido propostas para explicar desvios de EHW, como erros de genotipagem ou seleção da amostra de estudo de maneira não randômica (SOUVEREIN et al., 2005; ZOU; DONNER, 2006). É possível que para a análise do SNP C-105T o desvio do EHW possa ter ocorrido em virtude de dois fatores: o primeiro fator é a seleção não randômica, pois os pacientes foram selecionados em centros específicos e com base no perfil lipídico (normolipidêmico ou portador de hipercolesterolemia primária); e o segundo fator é o tamanho limitado da amostra para análise deste polimorfismo.

O SNP C-105T parece estar relacionado a um perfil lipídico sérico menos aterogênico. Isso porque o alelo -105T foi associado com menores valores basais de triglicérides e VLDL-c, maior concentração de HDL-c e redução do teor de LDL pequena e densa (avaliada pela razão TG/HDL-c) no grupo HC. Além disso, com maiores concentrações de apoAI e menor risco para DAC no grupo ATORVA.

O mecanismo pelo qual este novo polimorfismo exerce estes efeitos precisa ser investigado. É possível que o SNP C-105T modifique o domínio de ligação de fatores de transcrição, alterando a taxa de expressão de RNAm do gene *ABCA1* e, possivelmente, a produção da proteína ou sua atividade. Isso levaria a mudanças no

efluxo celular de fosfolipídeos e colesterol e no metabolismo da HDL, o que, conseqüentemente, levaria a alterações no metabolismo dos triglicerídeos. Já é bem conhecida a relação inversa entre concentração plasmática de HDL-c e de triglicerídeos (DESPRES et al., 2000), mas o mecanismo preciso de como isso ocorre ainda não foi completamente esclarecido. Há sugestões de que o aumento de HDL-c poderia levar ao aumento da troca de ésteres de colesterol por triglicerídeos, realizada pela CETP, entre a HDL e as lipoproteínas ricas em triglicerídeos. O aumento da transferência de triglicerídeos para a HDL poderia então levar ao aumento do catabolismo destes triglicerídeos (CLEE et al., 2001).

Interessantemente, com a casuística reunida até agora verificamos que o polimorfismo C-105T está associado ao C-14T no grupo de pacientes hipercolesterolêmicos ($p=0,006$).

Pela análise de haplótipos, nos grupos HC e ATORVA, verificou-se que os portadores dos alelos raros para os dois polimorfismos simultaneamente (14CT+TT/-105CT+TT), tiveram as menores concentrações séricas basais de triglicerídeos e VLDL-C, maiores concentrações de HDL-c e menor teor de LDL pequena e densa. Apesar da pequena casuística para esta análise, estes dados sugerem que a presença simultânea dos dois alelos raros está associada com perfil lipídico sérico menos aterogênico. Entretanto, esses resultados precisam ser confirmados com amostras populacionais maiores.

Na população turca, a combinação dos genótipos -14TT e 219KK foi associada com maiores valores séricos de HDL-c (HODOGLUGIL et al., 2005) e na população européia o SNP *ABCA1* C-14T está em desequilíbrio de ligação com vários outros polimorfismos (TREGOUET et al., 2004). Por isso, apesar dos nossos achados interessantes, estes dados precisam ser analisados com cuidado, pois

podem estar presentes interações com outros polimorfismos não contemplados neste estudo ou mesmo com fatores ambientais.

Neste estudo, nos hipercolesterolêmicos tratados com atorvastatina, a resposta hipolipemiante foi semelhante à descrita em outros estudos com populações brasileiras (RODRIGUES et al., 2005; SORKIN et al., 2005).

Não foi possível detectar a associação dos SNPs G70943A (R219K), C-14T e C-105T, isoladamente, com a resposta à atorvastatina. Porém, observou-se uma possível associação entre o haplótipo raro -14CT+TT/-105CT+TT e a resposta de apoAI ao tratamento. É importante comentar que esse dado deve ser reavaliado em uma população maior, considerando-se que podem ter resultado de eventos ao acaso, devido ao reduzido grupo amostral.

A relação entre o SNP C-14T e a progressão da aterosclerose em pacientes portadores de DAC tratados com pravastatina foi avaliada por Zwarts e colaboradores (2002). Os autores concluíram que a pravastatina pode reverter o efeito de progressão da aterosclerose associado ao alelo -14T. Lutucuta e colaboradores (2001) verificaram que outro polimorfismo da região promotora do *ABCA1*, C-565T (também denominado C-477T), foi associado com a gravidade da aterosclerose coronariana, determinada por angiografia coronariana quantitativa, e, após o tratamento com fluvastatina, com variação percentual média de apoAI, mas não de outros lipídeos.

Nós também avaliamos a expressão relativa de RNAm do gene *ABCA1* em CMSP de 132 indivíduos normolipidêmicos e 128 pacientes hipercolesterolêmicos do grupo ATORVA, antes (HC-Basal) e após o tratamento com atorvastatina (HC-Atorva). Os valores basais de expressão de RNAm do *ABCA1* de indivíduos hipercolesterolêmicos e normolipidêmicos apresentaram grande dispersão, razão

pela qual os valores foram agrupados em GM1 (expressão basal alta) e GM2 (expressão basal baixa).

As diferenças de expressão de RNAm basal entre os grupos GM1 e GM2 parecem não estar associadas com os polimorfismos do gene ABCA1 estudados, independentemente do fato de os pacientes serem HC ou NL. Portanto outras variantes ou outros fatores podem estar relacionados com essa variabilidade na expressão gênica.

A expressão de RNAm do *ABCA1* foi menor em CMSP de hipercolesterolêmicos (HC-Basal) quando comparados aos normolipidêmicos (NL) ($p < 0,05$), em ambos os grupos GM1 e GM2. Poderia se esperar que os pacientes HC teriam maior expressão que os NL em virtude da maior concentração de colesterol intracelular e conseqüentemente de oxisteróis, o que levaria ao aumento de expressão do *ABCA1*, via ativação do receptor LXR. O aumento da transcrição do gene ABCA1 ocorreria em virtude da ligação do heterodímero LXR/RXR em elementos funcionais na região promotora e no íntron 1 do *ABCA1*, chamados DR4 (DENIS et al., 2003; SCHMITZ; LANGMANN, 2005).

A hipercolesterolemia está associada a muitas e complexas adaptações e modificações do metabolismo normal do colesterol (HACHEM; MOORADIAN, 2006) que podem afetar a expressão do ABCA1. Além disso, altas concentrações de colesterol são freqüentemente associadas com aumentos dos marcadores solúveis de inflamação sistêmica (ASCER et al., 2004; FERRONI et al., 2003; SOLHEIM et al., 2001). Foi observado que a presença de citocinas proinflamatórias inibe a expressão de *ABCA1* em macrófagos J774 e em *foam cells* derivadas de macrófagos peritoneais de murinos (KHOVIDHUNKIT et al., 2003; PANOUSIS; ZUCKERMAN, 2000).

Também é importante comentar que variações na expressão gênica em células mononucleares do sangue periférico podem não refletir as variações de expressão em células de outros tecidos. Albrecht e colaboradores (2004) relataram que a expressão do *ABCA1* em placas ateroscleróticas de carótida foi maior que em artérias sem placa de pacientes controles, mas a expressão em leucócitos totais foi similar entre pacientes com placa e controles.

Outro fator que pode interferir em resultados de expressão de RNAm é a escolha do gene de referência endógena. Kielar e colaboradores (2001) mostraram que a expressão relativa do *ABCA1*, utilizando como referência o gene *PBGD - porphobilinogen deaminase*, não foi comparável à quantificação absoluta quando as análises envolveram expressão gênica entre vários tecidos; no entanto, as comparações foram satisfatórias quando envolveram análises de expressão de um mesmo tipo celular.

Neste estudo, os portadores do alelo -14C (genótipo CC) tiveram menor expressão basal nos pacientes HC em relação aos NL, o que não foi observado para os portadores do alelo -14T. Recentemente, foi observado que o alelo -14T resultou em maior atividade transcricional do *ABCA1* em células HepG2, COS-7 e CHO (HODOGLUGIL et al., 2005). Esses resultados são sugestivos de que o SNP C-14T tem um papel importante na regulação da taxa de transcrição do *ABCA1*.

Como comentado anteriormente, o SNP C-105T está em desequilíbrio de ligação com o C-14T, portanto era de se esperar que os portadores do alelo -105C (genótipo CC) tivessem valores de expressão basal mais baixos, como de fato foi observado nos pacientes HC quando comparados ao NL. Entretanto, se esse SNP tem um efeito direto sobre a expressão gênica precisa ainda ser confirmado em outros estudos.

O SNP ABCA1 G70943A (R219K) também foi associado com menor expressão gênica em pacientes HC em comparação com os indivíduos NL. Essa relação pode resultar de ligação entre esse SNP e o C-14T, considerando-se o seu papel de modulador da expressão gênica. Entretanto, neste estudo, não foi observado desequilíbrio de ligação entre essas duas variantes; portanto, é possível que outras variantes do *ABCA1* sejam responsáveis pelos efeitos observados nos pacientes HC portadores do alelo 70943A.

Um aspecto que deve ser considerado é a presença de uma variante que afete a estabilidade do RNAm e conseqüentemente modifique a expressão gênica. Entretanto, a comprovação desta hipótese requer experimentos adicionais que não puderam ser realizados durante este trabalho.

Os resultados obtidos permitem sugerir que a atorvastatina pode diminuir a expressão do *ABCA1* de forma dependente do polimorfismo *ABCA1* C-14T. O efeito inibitório da atorvastatina sobre a expressão do *ABCA1* foi associada com o alelo -14T (genótipos -14CT + TT). Então, parece que a atorvastatina é capaz de reverter o efeito modulador associado a este alelo.

Estudos com macrófagos humanos e murinos demonstraram que vastatinas regulam negativamente a taxa de transcrição do *ABCA1*, em decorrência da redução do colesterol intracelular e, conseqüentemente, da geração de oxisteróis, que são ligantes de LXR (ANDO et al., 2004; SONE et al., 2004; WONG; QUINN; BROWN, 2004). Interessantemente, Sone e colaboradores (2004) verificaram que, em macrófagos RAW264.7, a redução da atividade da luciferase, induzida pelas vastatinas, não foi suficientemente grande para explicar a diminuição de RNAm do *ABCA1* verificada em ensaios de *Northern blot*. Por isso, os autores sugeriram que possam existir outros mecanismos envolvidos nesta regulação, como por exemplo, mudanças na estabilidade de RNAm do gene.

Análises do SNP C-105T demonstraram que portadores do genótipo -105CC reduziram significativamente a expressão de RNAm do *ABCA1* após a terapia com a atorvastatina. No entanto, devemos considerar que as médias dos valores de expressão gênica são muito próximas e também que há um desvio padrão muito grande nestas amostras. Além do mais, este dado está em discordância com as análises de haplótipos que revelaram redução dos valores de expressão nos portadores dos haplótipos -14CT+TT/-105CC mas não nos portadores -14CC/-105CC.

Na realidade, o fato de não termos dividido as amostras em grupos GM1 e GM2, para as análises do SNP C-105T e dos haplótipos dos polimorfismos C-14T/C-105T, pode ter interferido nos resultados devido às altas dispersões dos valores de expressão gênica.

Este estudo mostrou que os polimorfismos do *ABCA1* podem modificar a expressão gênica em indivíduos hipercolesterolêmicos e em resposta ao tratamento com atorvastatina. Além disso, podem estar associados com alterações no metabolismo da HDL, que estão por sua vez relacionadas com risco de DAC. Visto que há considerável interesse no desenvolvimento de terapias ateroprotetoras, ensaios complementares serão necessários para a melhor compreensão destas relações.

6 CONCLUSÕES

Um novo polimorfismo do gene *ABCA1*, C-105T, foi descrito na nossa população e o alelo -105T está presente em uma frequência muito baixa, 1,4% em normolipidêmicos e 2,0% em hipercolesterolêmicos. O alelo raro deste polimorfismo parece estar associado a um perfil lipídico sérico menos aterogênico.

O SNP C-14T não foi associado com alterações nas concentrações de lipídeos plasmáticos, mas este polimorfismo está em desequilíbrio de ligação com o SNP C-105T e a presença simultânea dos dois alelos raros parece estar relacionada com perfil lipídico protetor para DAC.

O alelo *ABCA1* 70943A também mostrou associação com perfil lipídico sérico menos aterogênico.

Nenhum polimorfismo analisado neste estudo influenciou na resposta hipolipemiante de pacientes tratados com atorvastatina (10mg/dia/4 semanas).

A expressão do RNAm do *ABCA1* em células mononucleares é menor em indivíduos hipercolesterolêmicos que em normolipidêmicos e esta diferença parece estar associada aos SNPs C-14T e G70943A.

O tratamento com atorvastatina reduz a expressão de RNAm do *ABCA1* em células mononucleares de forma dependente do polimorfismo C-14T.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

AIELLO, R.J.; BREES, D.; FRANCONI, O.L. ABCA1-deficient mice: insights into the role of monocyte lipid efflux in HDL formation and inflammation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.23, n.6, p.972-980, 2003.

ALBRECHT, C.; SOUMIAN, S.; AMEY, J.S.; SARDINI, A.; HIGGINS, C.F.; DAVIES, A.H.; GIBBS, R.G. ABCA1 expression in carotid atherosclerotic plaques. **Stroke**, v.35, n.12, p.2801-2806, 2004.

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

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

ARTERIAL HYPERTENSION WORK GROUPS. IV Brazilian guidelines in arterial hypertension. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.82, suppl. 4, p.7-22, 2004.

ASCER, E.; BERTOLAMI, M.C.; VENTURINELLI, M.L.; BUCCHERI, V.; SOUZA, J.; NICOLAU, J.C.; RAMIRES, J.A.; SERRANO JUNIOR, C.V. Atorvastatin reduces proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients. **Atherosclerosis**, v.177, n.1, p.161-166, 2004.

ASHEN, M.D.; BLUMENTHAL, R.S. Clinical practice: low HDL cholesterol levels. **N. Engl. J. Med.**, v.353, n.12, p.1252-1260, 2005.

ASSMANN, G.; SCHULTE, H.; VON ECKARDSTEIN, A.; HUANG, Y. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk: the PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. **Atherosclerosis**, v.124, suppl.1, p.11-20, 1996.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

¹ As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

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

ATTIE, A.D. ABCA1: at the nexus of cholesterol, HDL and atherosclerosis. **Trends Biochem. Sci.**, v. 32, n.4, p.172-179, 2007.

BELLOSTA, S.; PAOLETTI, R.; CORSINI, A. Safety of statins: focus on clinical pharmacokinetics and drug interactions. **Circulation**, v.109, n.23, suppl.1, p.III50-III57, 2004.

BENTON, J.L.; DING, J.; TSAI, M.Y.; SHEA, S.; ROTTER, J.I.; BURKE, G.L.; POST, W. Associations between two common polymorphisms in the ABCA1 gene and subclinical atherosclerosis: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). **Atherosclerosis**, 2006. No prelo.

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

BERTOLINI, S.; PISCIOTTA, L.; DI SCALA, L.; LANGHEIM, S.; BELLOCCHIO, A.; MASTURZO, P.; CANTAFORA, A.; MARTINI, S.; AVERNA, M.; PES, G.; STEFANUTTI, C.; CALANDRA, S. Genetic polymorphisms affecting the phenotypic expression of familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, v.174, n.1, p.57-65, 2004.

BJORKHEM, I. Do oxysterols control cholesterol homeostasis? **J. Clin. Invest.**, v.110, n.6, p.725-730, 2002.

BODZIOCH, M.; ORSO, E.; KLUCKEN, J.; LANGMANN, T.; BOTTCHER, A.; DIEDERICH, W.; DROBNIK, W.; BARLAGE, S.; BUCHLER, C.; PORSCH-OZCURUMEZ, M.; KAMINSKI, W.E.; HAHMANN, H.W.; OETTE, K.; ROTHE, G.; ASLANIDIS, C.; LACKNER, K.J.; SCHMITZ, G. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. **Nat. Genet.**, v.22, n.4, p.347-351, 1999.

BOGMAN, K.; PEYER, A.K.; TOROK, M.; KUSTERS, E.; DREWE, J. HMG-CoA reductase inhibitors and P-glycoprotein modulation. **Br. J. Pharmacol.**, v.132, n.6, p.1183-1192, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. IDB-2005. Indicadores de dados básicos do Brasil, 2005. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em: 10 set. 2006.

BROOKS-WILSON, A.; MARCIL, M.; CLEE, S.M.; ZHANG, L.H.; ROOMP, K.; VAN DAM, M.; YU, L.; BREWER, C.; COLLINS, J.A.; MOLHUIZEN, H.O.; LOUBSER, O.; OUELETTE, B.F.; FICHTER, K.; ASHBOURNE-EXCOFFON, K.J.; SENSEN, C.W.; SCHERER, S.; MOTT, S.; DENIS, M.; MARTINDALE, D.; FROHLICH, J.; MORGAN, K.; KOOP, B.; PIMSTONE, S.; KASTELEIN, J.J.; GENEST JUNIOR, J.; HAYDEN, M.R. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. **Nat. Genet.**, v.22, n.4, p.336–345, 1999.

BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Lowering plasma cholesterol by raising LDL receptors: 1981. **Atheroscler. Suppl.**, v.5, n.3, p.57-59, 2004.

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

BUNGERT, S.; MOLDAY, L.L.; MOLDAY, R.S. Membrane topology of the ATP binding cassette transporter ABCR and its relationship to ABC1 and related ABCA transporters: identification of N-linked glycosylation sites. **J. Biol. Chem.**, v.276, n.26, p.23539–23546, 2001.

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

CENARRO, A.; ARTIEDA, M.; CASTILLO, S.; MOZAS, P.; REYES, G.; TEJEDOR, D.; ALONSO, R.; MATA, P.; POCOVI, M.; CIVEIRA, F.; SPANISH FH GROUP. A common variant in the ABCA1 gene is associated with a lower risk for premature coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. **J. Med. Genet.**, v.40, n.3, p.163-168, 2003.

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

CHEN, C.; MIRELES, R.J.; CAMPBELL, S.D.; LIN, J.; MILLS, J.B.; XU, J.J.; SMOLAREK, T.A. Differential interaction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors with ABCB1, ABCC2, and OATP1B1. **Drug Metab. Dispos.**, v.33, n.4, p.537-546, 2005.

CLEE, S.M.; KASTELEIN, J.J.; VAN DAM, M.; MARCIL, M.; ROOMP, K.; ZWARTS, K.Y.; COLLINS, J.A.; ROELANTS, R.; TAMASAWA, N.; STULC, T.; SUDA, T.; CESKA, R.; BOUCHER, B.; RONDEAU, C.; DESOUCHE, C.; BROOKS-WILSON, A.; MOLHUIZEN, H.O.; FROHLICH, J.; GENEST JUNIOR, J.; HAYDEN, M.R. Age and residual cholesterol efflux affect HDL cholesterol levels and coronary artery disease in ABCA1 heterozygotes. **J. Clin. Invest.**, v.106, n.10, p.1263-1270, 2000.

CLEE, S.M.; ZWINDERMAN, A.H.; ENGERT, J.C.; ZWARTS, K.Y.; MOLHUIZEN, H.O.; ROOMP, K.; JUKEMA, J.W.; VAN WIJLAND, M.; VAN DAM, M.; HUDSON, T.J.; BROOKS-WILSON, A.; GENEST JUNIOR, J.; KASTELEIN, J.J.; HAYDEN, M.R. Common genetic variation in ABCA1 is associated with altered lipoprotein levels and a modified risk for coronary artery disease. **Circulation**, v.103, n.9, p.1198-1205, 2001.

DEAN, M.; HAMON, Y.; CHIMINI, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **J. Lipid Res.**, v.42, n.7, p.1007-1017, 2001.

DENIS, M.; BISSONNETTE, R.; HAIDAR, B.; KRIMBOU, L.; BOUVIER, M.; GENEST, J. Expression, regulation, and activity of ABCA1 in human cell lines. **Mol. Genet. Metab.**, v.78, n.4, p.265-274, 2003.

DESPRES, J.P.; LEMIEUX, I.; DAGENAIS, G.R.; CANTIN, B.; LAMARCHE, B. HDL-cholesterol as a marker of coronary heart disease risk: the Quebec cardiovascular study. **Atherosclerosis**, v.153, n.2, p.263-272, 2000.

EDWARDS, P.A.; KENNEDY, M.A.; MAK, P.A. LXRs: oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. **Vascul. Pharmacol.**, v.38, n.4, p.249-256, 2002.

EVANS, D.; BEIL, F.U. The association of the R219K polymorphism in the ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) gene with coronary heart disease and hyperlipidaemia. **J. Mol. Med.**, v.81, n.4, p.264-270, 2003.

FABINY, D.L.; ERTINGSHAUSEN, G. Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the CentrifChem. **Clin. Chem.**, v.17, n.8, p.696-700, 1971.

FERRONI, P.; MARTINI, F.; CARDARELLO, C.M.; GAZZANIGA, P.P.; DAVI, G.; BASILI, S. Enhanced interleukin-1beta in hypercholesterolemia: effects of simvastatin and low-dose aspirin. **Circulation**, v.108, n.14, p.1673-1675, 2003.

FORCHERON, F.; LEGEDZ, L.; CHINETTI, G.; FEUGIER, P.; LETEXIER, D.; BRICCA, G.; BEYLOT, M. Genes of cholesterol metabolism in human atheroma: overexpression of perilipin and genes promoting cholesterol storage and repression of ABCA1 expression. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.25, n.8, p.1711-1717, 2005.

FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clin. Chem.**, v.28, n.10, p.2077-2080, 1982.

FRANCONE, O.L.; SUBBAIAH, P.V.; VAN TOL, A.; ROYER, L.; HAGHPASSAND, M. Abnormal phospholipid composition impairs HDL biogenesis and maturation in mice lacking Abca1. **Biochemistry**, v.42, n.28, p.8569-8578, 2003.

FRICK, M.H.; MANNINEN, V.; HUTTUNEN, J.K.; HEINONEN, O.P.; TENKANEN, L.; MANTTARI, M. HDL-cholesterol as a risk factor in coronary heart disease: an update of the Helsinki Heart Study. **Drugs**, v.40, suppl.1, p.7-12, 1990.

FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, v.18, n.6, p.499-502, 1972.

FU, X.; MENKE, J.G.; CHEN, Y.; ZHOU, G.; MACNAUL, K.L.; WRIGHT, S.D.; SPARROW, C.P.; LUND, E.G. 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. **J. Biol. Chem.**, v.276, n.42, p.38378-38387, 2001.

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

GRUNDY, S.M. United States Cholesterol Guidelines 2001: expanded scope of intensive low-density lipoprotein-lowering therapy. **Am. J. Cardiol.**, v.88, n.7, suppl.2, p.23-27, 2001.

HACHEM, S.B.; MOORADIAN, A.D. Familial dyslipidaemias: an overview of genetics, pathophysiology and management. **Drugs**, v.66, n.15, p.1949-1969, 2006.

HALL, T. Bioedit Sequence Alignment Editor. Versão 7.0.5. Disponível em:<<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>>. Acesso em: 31 maio 2005.

HAMON, Y.; CHAMBENOIT, O.; CHIMINI, G. ABCA1 and the engulfment of apoptotic cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1585, n.2-3, p.64–71, 2002.

HAY, I.D.; BAYER, M.F.; KAPLAN, M.M.; KLEE, G.G.; LARSEN, P.R.; SPENCER, C.A. American Thyroid Association assessment of current free thyroid hormone and thyrotropin measurements and guidelines for future clinical assays: The Committee on Nomenclature of the American Thyroid Association. **Clin. Chem.**, v.37, n.11, p.2002-2008, 1991.

HAYDEN, M.R.; TYAGI, S.C. Isolated low high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C): implications of global risk reduction : case report and systematic scientific review. **Cardiovasc. Diabetol.**, v.4, n.1, p.1, 2005.

HERSBERGER, M.; VON ECKARDSTEIN, A. Low high-density lipoprotein cholesterol:physiological background, clinical importance and drug treatment. **Drugs**, v.63, n.18 , p.1907–1945, 2003.

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

HORDER, M.; ELSE, R.C.; GERHARDT, W.; MATHIEU, M.; SAMPSON, E.J. International Federation of Clinical Chemistry, Scientific Division Committee on Enzymes: approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes: Part 7: IFCC method for creatine kinase (ATP: creatine N-phosphotransferase, EC 2.7.3.2). **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, v.29, n.7, p.435-456, 1991.

IIDA, A.; SAITO, S.; SEKINE, A.; KITAMURA, Y.; KONDO, K.; MISHIMA, C.; OSAWA, S.; HARIGAE, S.; NAKAMURA, Y. High-density single-nucleotide polymorphism (SNP) map of the 150-kb region corresponding to the human ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) gene. **J. Hum. Genet.**, v.46, n.9, p.522-528, 2001.

JACOBSEN, W.; KUHN, B.; SOLDNER, A.; KIRCHNER, G.; SEWING, K.F.; KOLLMAN, P.A.; BENET, L.Z.; CHRISTIANS, U. Lactonization is the critical first step in the disposition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor atorvastatin. **Drug Metab. Dispos.**, v.28, n.11, p.1369-1378, 2000.

KHOVIDHUNKIT, W.; MOSER, A.H.; SHIGENAGA, J.K.; GRUNFELD, C.; FEINGOLD, K.R. Endotoxin down-regulates ABCG5 and ABCG8 in mouse liver and

ABCA1 and ABCG1 in J774 murine macrophages: differential role of LXR. **J. Lipid Res.**, v.44, n.9, p.1728-1736, 2003.

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

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

KWITEROVICH JUNIOR, P.O. The metabolic pathways of high density lipoprotein, low density lipoprotein, and triglycerides: a current review. **Am. J. Cardiol.**, v.86, n.12, suppl.1, p.5-10, 2000.

KYRIAKOU, T.; HODGKINSON, C.; PONTEFRACCT, D.E.; IYENGAR, S.; HOWELL, W.M.; WONG, Y.K.; ERIKSSON, P.; YE, S. Genotypic effect of the -565C>T polymorphism in the ABCA1 gene promoter on ABCA1 expression and severity of atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.25, n.2, p.418-423, 2005.

LANGMANN, T.; KLUCKEN, J.; REIL, M.; LIEBISCH, G.; LUCIANI, M.F.; CHIMINI, G.; KAMINSKI, W.E.; SCHMITZ, G. Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.257, n.1, p.29-33, 1999.

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

LENNERNAS, H. Clinical pharmacokinetics of atorvastatin. **Clin. Pharmacokinet.**, v.42, n.13, p.1141-1160, 2003.

LEWIS, G.F.; RADER, D.J. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. **Circ. Res.**, v.96, n.12, p.1221-1232, 2005.

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

LINSEL-NITSCHKE, P.; TALL, A.R. HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.4, n.3, p.193-205, 2005.

LINTON, M.F.; FAZIO, S. A practical approach to risk assessment to prevent coronary artery disease and its complications. **Am. J. Cardiol.**, v.92, n.1, suppl.1, p.19-26, 2003.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v.25, n.4, p.402-408, 2001.

LUCIANI, M.F.; DENIZOT, F.; SAVARY, S.; MATTEI, M.G.; CHIMINI, G. Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9. **Genomics**, v.21, n.1, p.50-159, 1994.

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

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

MANTARING, M.; RHYNE, J.; HO HONG, S.; MILLER, M. Genotypic variation in ATP-binding cassette transporter-1 (ABCA1) as contributors to the high and low high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) phenotype. **Transl. Res.**, v.149, n.4, p.205-210, 2007.

MARUYAMA, C.; IMAMURA, K.; TERAMOTO, T. Assessment of LDL particle size by triglyceride/HDL-cholesterol ratio in non-diabetic, healthy subjects without prominent hyperlipidemia. **J. Atheroscler. Thromb.**, v.10, n.3, p.186-191, 2003.

MASSIRER, K.B.; HIRATA, M.H.; SILVA, A.E.; FERRAZ, M.L.; NGUYEN, N.Y.; HIRATA, R.D. Interferon-alpha receptor 1 mRNA 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.**, v.37, n.5, p.643-647, 2004.

MCNEISH, J.; AIELLO, R.J.; GUYOT, D.; TURI, T.; GABEL, C.; ALDINGER, C.; HOPPE, K.L.; ROACH, M.L.; ROYER, L.J.; DE WET, J.; BROCCARDO, C.; CHIMINI, G.; FRANCONI, O.L. High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.97, n.8, p.4245-4250, 2000.

NAUCK, M.; MARZ, W.; WIELAND, H. New immunoseparation-based homogeneous assay for HDL-cholesterol compared with three homogeneous and two heterogeneous methods for HDL-cholesterol. **Clin. Chem.**, v.44, n.7, p.1443-1451, 1998.

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

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

ORAM, J.F. Molecular basis of cholesterol homeostasis: lessons from Tangier disease and ABCA1. **Trends Mol. Med.**, v.8, n.4, p.168-173, 2002.

_____. Tangier disease and ABCA1. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1529, n.1-3, p.321-330, 2000.

ORAM, J.F.; HEINECKE, J.W. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. **Physiol. Rev.**, v.85, n.4, p.1343-1372, 2005.

PAJUKANTA, P. Do DNA sequence variants in ABCA1 contribute to HDL cholesterol levels in the general population? **J. Clin. Invest.**, v.114, n.9, p.1244-1247, 2004.

PANOUSIS, C.G.; ZUCKERMAN, S.H. Interferon-gamma induces downregulation of Tangier disease gene (ATP-binding-cassette transporter 1) in macrophage-derived foam cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.20, n.6, p.1565-1571, 2000.

PARRA, F.C.; AMADO, R.C.; LAMBERTUCCI, J.R.; ROCHA, J.; ANTUNES, C.M.; PENA, S.D. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.100, n.1, p.177-182, 2003.

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

PRUEKSARITANONT, T.; SUBRAMANIAN, R.; FANG, X.; MA, B.; QIU, Y.; LIN, J.H.; PEARSON, P.G.; BAILLIE, T.A. Glucuronidation of statins in animals and humans: a novel mechanism of statin lactonization. **Drug Metab. Dispos.**, v.30, n.5, p.505-512, 2002.

PULLINGER, C.R.; HAKAMATA, H.; DUCHATEAU, P.N.; ENG, C.; AOUIZERAT, B.E.; CHO, M.H.; FIELDING, C.J.; KANE, J.P. Analysis of hABC1 gene 5' end: additional peptide sequence, promoter region, and four polymorphisms. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.271, n.2, p.451-455, 2000.

RADER, D.J. Mechanisms of disease: HDL metabolism as a target for novel therapies. **Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.**, v.4, n.2, p.102-109, 2007.

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

REMALEY, A.T.; RUST, S.; ROSIER, M.; KNAPPER, C.; NAUDIN, L.; BROCCARDO, C.; PETERSON, K.M.; KOCH, C.; ARNOULD, I.; PRADES, C.; DUVERGER, N.; FUNKE, H.; ASSMAN, G.; DINGER, M.; DEAN, M.; CHIMINI, G.; SANTAMARINA-FOJO, S.; FREDRICKSON, D.S.; DENEFFLE, P.; BREWER JUNIOR, H.B. Human ATP-binding Cassete transporter 1 (ABC1): genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.96, n.22, p.12685-12690, 1999.

RIFAI, N.; KING, M.E. Immunoturbidimetric assays of apolipoproteins A, AI, AII and B in serum. **Clin. Chem.**, v.32, n.6, p.957-961, 1986.

RODRIGUES, A.C.; REBECCHI, I.M.; BERTOLAMI, M.C.; FALUDI, A.A.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D. 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.**, v.38, n.9, p.1389-1397, 2005.

RUSSELL, D.W. Oxysterol biosynthetic enzymes. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1529, n.1-3, p.126-135, 2000.

RUST, S.; ROSIER, M.; FUNKE, H.; REAL, J.; AMOURA, Z.; PIETTE, J.C.; DELEUZE, J.F.; BREWER, H.B.; DUVERGER, N.; DENEFFLE, P.; ASSMANN, G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. **Nat. Genet.**, v.22, n.4, p.352-355, 1999.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, S.A.; MACHADO, M.O.; HIRATA, R.D. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted

human blood useful in clinical molecular testing. **Clin. Chem.**, v.44, n.8, p.1748-1750, 1998.

SALEHEEN, D.; KHANUM, S.; HAIDER, S.R.; NAZIR, A.; AHMAD, U.; KHALID, H.; HUSSAIN, I.; SHUJA, F.; SHAHID, K.; HABIB, A.; FROSSARD, P.M. A novel haplotype in ABCA1 gene effects plasma HDL-C concentration. **Int. J. Cardiol.**, v.115, n.1, p.7-13, 2007.

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

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

SANTOS, R.D.; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. III Brazilian guidelines on dyslipidemias and guideline of atherosclerosis prevention from Atherosclerosis Department of Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.77, suppl.3, p.1-48, 2001.

SCHMITZ, G.; LANGMANN, T. Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1735, n.1, p.1-19, 2005.

SIEDEL, J.; HAGELE, E.O.; ZIEGENHORN, J.; WAHLEFELD, A.W. Reagent for the enzymatic determination of serum total cholesterol with improved lipolytic efficiency. **Clin. Chem.**, v.29, n.6, p.1075-1080, 1983.

SINGARAJA, R.R.; BOCHER, V.; JAMES, E.R.; CLEE, S.M.; ZHANG, L.H.; LEAVITT, B.R.; TAN, B.; BROOKS-WILSON, A.; KWOK, A.; BISSADA, N.; YANG, Y.Z.; LIU, G.; TAFURI, S.R.; FIEVET, C.; WELLINGTON, C.L.; STAELS, B.; HAYDEN, M.R. Human ABCA1 BAC transgenic mice show increased high density lipoprotein cholesterol and ApoA1-dependent efflux stimulated by an internal promoter containing liver X receptor response elements in intron 1. **J. Biol. Chem.**, v.276, n.36, p.33969-33979, 2001.

SINGARAJA, R.R.; BRUNHAM, L.R.; VISSCHER, H.; KASTELEIN, J.J.; HAYDEN, M.R. Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.23, n.8, p.1322-1332, 2003.

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

SOLHEIM, S.; SELJEFLOT, I.; ARNESEN, H.; ERITSLAND, J.; EIKVAR, L. Reduced levels of TNF alpha in hypercholesterolemic individuals after treatment with pravastatin for 8 weeks. **Atherosclerosis**, v.157, n.2, p.411-415, 2001.

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

SORKIN, S.C.; FORESTIERO, F.J.; HIRATA, M.H.; GUZMAN, E.C.; CAVALLI, S.A.; BERTOLAMI, M.C.; SALAZAR, L.A.; HIRATA, R.D. APOA1 polymorphisms are associated with variations in serum triglyceride concentrations in hypercholesterolemic individuals. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v.43, n.12, p.1339-1345, 2005.

SOUVEREIN, O.W.; JUKEMA, J.W.; BOEKHOLDT, S.M.; ZWINDERMAN, A.H.; TANCK, M.W. Polymorphisms in APOA1 and LPL genes are statistically independently associated with fasting TG in men with CAD. **Eur. J. Hum. Genet.**, v.13, n.4, p.445-451, 2005.

SRINIVASAN, S.R.; LI, S.; CHEN, W.; BOERWINKLE, E.; BERENSON, G.S. R219K polymorphism of the ABCA1 gene and its modulation of the variations in serum high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides related to age and adiposity in white versus black young adults: the Bogalusa heart study. **Metabolism.**, v.52, n.7, p.930-934, 2003.

TALKE, H.; SCHUBERT, G.E. Enzymatic urea determination in the blood and serum in the warburg optical test. **Klin. Wochenschr.**, v.43; p.174-175, 1965.

TALL, A.R.; COSTET, P.; WANG, N. Regulation and mechanisms of macrophage cholesterol efflux. **J. Clin. Invest.**, v.110, n.7, p.899-904, 2002.

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

THOMPSON, A.; DANESH, J. Associations between apolipoprotein B, apolipoprotein AI, the apolipoprotein B/AI ratio and coronary heart disease: a literature-based meta-analysis of prospective studies. **J. Intern. Med.**, v.259, n.5, p.481-492, 2006.

TOKUNAGA, K.; NAKAMURA, Y.; SAKATA, K.; FUJIMORI, K.; OHKUBO, M.; SAWADA, K.; SAKIYAMA, S. Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancers. **Cancer Res.**, v.47, n.21, p.5616-5619, 1987.

TOTH, P.P. High-density lipoprotein: epidemiology, metabolism, and antiatherogenic effects. **Dis. Mon.**, v.47, n.8, p.369-416, 2001.

TREGOUET, D.A.; RICARD, S.; NICAUD, V.; ARNOULD, I.; SOUBIGOU, S.; ROSIER, M.; DUVERGER, N.; POIRIER, O.; MACE, S.; KEE, F.; MORRISON, C.; DENEFLÉ, P.; TIRET, L.; EVANS, A.; DELEUZE, J.F.; CAMBIEN, F. In-depth haplotype analysis of ABCA1 gene polymorphisms in relation to plasma ApoA1 levels and myocardial infarction. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.24, n.4, p.775-781, 2004.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Ann. Clin. Biochem.**, v.6, p.24-28, 1969.

USA. National Institutes of Health. National Library of Medicine. NCBI. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 26 março 2007.

USA. Rockefeller University. Estimating Haplotype Program. Versão 1.20. Disponível em: <<http://linkage.rockefeller.edu>>. Acesso em: 01 jul. 2006.

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

WALLDIUS, G.; JUNGNER, I.; AASTVEIT, A.H.; HOLME, I.; FURBERG, C.D.; SNIDERMAN, A.D. The apoB/apoA-I ratio is better than the cholesterol ratios to estimate the balance between plasma proatherogenic and antiatherogenic lipoproteins and to predict coronary risk. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v.42, n.12, p.1355-1363, 2004.

WANG, N.; TALL, A.R. Regulation and mechanisms of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular cholesterol efflux. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.23, n.7, p.1178-1184, 2003.

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

WITHERSPOON, L.R.; el SHAMI, A.S.; SHULER, S.E.; NEELY, H.; SONNEMAKER, R.; GILBERT, S.S.; ALYEA, K. Chemically blocked analog assays for free thyronines: I: The effect of chemical blockers on T4 analog and T4 binding by albumin and by thyroxin-binding globulin. **Clin. Chem.**, v.34, n.1, p.9-16, 1988a.

_____. 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.**, v.34, n.1, p.17-23, 1988b.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation. **World Health Organ. Tech. Rep. Ser.**, v.894, p.1-253, 2000.

WORLD HEART FEDERATION. Disponível em: <<http://www.worldheart.org>>. Acesso em: 10 set. 2006.

YAMAKAWA-KOBAYASHI, K.; YANAGI, H.; YU, Y.; ENDO, K.; ARINAMI, T.; HAMAGUCHI, H. Associations between serum high-density lipoprotein cholesterol or apolipoprotein AI levels and common genetic variants of the ABCA1 gene in Japanese school-aged children. **Metabolism.**, v.53, n.2, p.182-186, 2004.

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

ZEMBRZUSKI, V.M.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; HUTZ, M.H. Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population. **Ann. Hum. Genet.**, v.70, n.6, p.822-828, 2006.

ZOU, G.Y.; DONNER, A. The merits of testing Hardy-Weinberg equilibrium in the analysis of unmatched case-control data: a cautionary note. **Ann. Hum. Genet.**, v.70, n.6, p.923-933, 2006.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A – 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 infarto? Sim Não Há quanto tempo? _____
É hipertenso? Sim Não
 Medida de Pressão arterial: _____ (mmHg)
É obeso? Sim Não
 Peso (Kg) _____ Altura (cm) _____ IMC: _____
Toma medicamentos? Sim Não
Qual(is)? Em que dosagem? _____
Profissão: _____ Há exigência de esforço físico? Sim Não
Pratica exercício físico? Sim Não

HISTÓRICO FAMILIAR

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

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

ANEXOS

**ANEXO A – Cópia do aval da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
(CONEP)**



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

PARECER Nº 1360/2004

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

Registro CEP: 358/03

Processo nº 25000.041535/2004-01

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

Pesquisador Responsável: Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata

Instituição: HU - USP

Área Temática Especial: Genética Humana

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


a- Foram atendidas as solicitações do referido parecer. O projeto preenche os requisitos fundamentais da Resolução CNS 196/96 sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

b- O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada.

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

Situação: Projeto aprovado

Brasília, 15 de julho de 2004.


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS