

Efeitos da Atorvastatina e do Polimorfismo T-786C do Gene eNOS sobre Parâmetros do Metabolismo Lipídico Plasmático

Effects of Atorvastatin and T-786C Polymorphism of eNOS Gene on Plasma Metabolic Lipid Parameters

Vanessa Helena de Souza Zago¹, José Eduardo Tanus dos Santos², Mirian Regina Gardin Danelon¹, Roger Marcelo Mesquita da Silva¹, Natália Baratella Panzoldo¹, Eliane Soler Parra¹, Fernanda Alexandre¹, Vítor Wilson de Moura Virgínio¹, Eder Carlos Rocha Quintão³, Eliana Cotta de Faria¹

Departamento de Patologia Clínica – Laboratório de Lípidos, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental – Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas¹, Campinas, SP; Departamento de Farmacologia - Faculdade de Ciências Médicas – Universidade de São Paulo², Ribeirão Preto, SP; Laboratório de Lípidos (LIM10) – Faculdade de Ciências Médicas – Universidade de São Paulo¹, São Paulo, SP, Brasil

Resumo

Fundamento: A atividade do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) pode ser modulada pelo colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C), estatinas ou polimorfismos, como o T-786C de eNOS.

Objetivo: Este estudo teve como objetivo avaliar se o polimorfismo T-786C está associado a alterações nos efeitos da atorvastatina no perfil lipídico, nas concentrações de metabólitos de óxido nítrico (NO) e da proteína C reativa de alta sensibilidade (PCR-as).

Métodos: Trinta voluntários do sexo masculino, assintomáticos, com idade entre 18-56 anos foram genotipados e classificados de acordo com a ausência (TT, n = 15) ou presença (CC, n = 15) do polimorfismo. Eles foram selecionados aleatoriamente para a utilização de placebo e atorvastatina (10 mg/dia por 14 dias). Após cada tratamento foram medidos lípidos, lipoproteínas, frações HDL₂ e HDL₃, atividade da proteína de transferência de colesterol éster (CETP), metabólitos de NO e PCR-as.

Resultados: As comparações entre genótipos após a administração de placebo mostraram aumento da atividade da CETP polimorfismo-dependente (TT, 12 ± 7; CC, 22 ± 12, p ≤ 0,05). As análises da interação entre os tratamentos indicaram que a atorvastatina tem efeito sobre colesterol, LDL, nitrito e razões lípidos/proteínas (HDL₂ e HDL₃) (p ≤ 0,001) em ambos os genótipos. É interessante notar as interações genótipo/droga sobre a CETP (p ≤ 0,07) e a lipoproteína (a) [Lp(a)] (p ≤ 0,056), levando a uma diminuição limítrofe da CETP, embora sem afetar a Lp(a). A PCR-as não mostrou alterações.

Conclusão: Os resultados sugerem que o tratamento com estatinas pode ser relevante para a prevenção primária da aterosclerose em pacientes com o polimorfismo T-786C do eNOS, considerando os efeitos no metabolismo lipídico. (Arq Bras Cardiol. 2013;100(1):14-20)

Palavras-chave: Metabolismo dos Lipídeos; Polimorfismo Genético; Reguladores do Metabolismo de Lipídeos; Óxido Nítrico; Proteína C.

Abstract

Background: Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity may be modulated by high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), statins or polymorphisms, such as the T-786C of eNOS.

Objective: This study aimed at evaluating if the T-786C polymorphism is associated with changes of atorvastatin effects on the lipid profile, on the concentrations of metabolites of nitric oxide (NO) and of high sensitivity C-reactive protein (hsCRP).

Methods: Thirty male volunteers, asymptomatic, aged between 18 and 56 years were genotyped and classified according to absence (TT, n = 15) or presence (CC, n = 15) of the polymorphism. They were randomly selected for the use of placebo or atorvastatin (10 mg/day/14 days). After each treatment lipids, lipoproteins, HDL₂ and HDL₃ composition, cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity, metabolites of NO and hsCRP were evaluated.

Results: The comparisons between genotypes after placebo showed an increase in CETP activity in a polymorphism-dependent way (TT, 12±7; CC, 22±12; p ≤ 0.05). The interaction analyses between treatments indicated that atorvastatin has an effect on cholesterol, LDL, nitrite and lipid-protein ratios (HDL₂ and HDL₃) (p ≤ 0.001) in both genotypes. Interestingly, we observed genotype/drug interactions on CETP (p ≤ 0.07) and lipoprotein (a) [Lp(a)] (p ≤ 0.056), leading to a borderline decrease in CETP, but with no effect on Lp(a). HsCRP showed no alteration.

Conclusion: These results suggest that statin treatment may be relevant for primary prevention of atherosclerosis in patients with the T-786C polymorphism of eNOS, considering the effects on lipid metabolism. (Arq Bras Cardiol. 2013;100(1):14-20)

Keywords: Lipid Metabolism; Polymorphism, Genetic; Lipid Regulating Agents; Nitric Oxide; Protein C.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Eliana Cotta de Faria •

Rua Tessália Vieira Camargo, 126 - Cidade Universitária - CEP 13083-887 – Campinas, SP, Brasil
E-mail: cotta@fcm.unicamp.br, cottadefaria@gmail.com

Artigo recebido em 22/05/12; revisado em 17/09/12; aceito em 26/09/12.

Introdução

O endotélio vascular é um sistema complexo, integrado por diversos mediadores químicos. Entre eles, o óxido nítrico se destaca por ser um potente vasodilatador, entre outros efeitos benéficos^{1,2}. Sua síntese depende da atividade do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS)³, que, na membrana plasmática e na cavéola, é modulada principalmente pela tensão de cisalhamento laminar e pela presença de agonistas na superfície da célula⁴.

No entanto, os mecanismos transcricionais e pós-transcricionais também estão envolvidos^{5,6}. Por exemplo, a lipoproteína de alta densidade (HDL) pode mediar a ativação da eNOS através da interação com a apolipoproteína AI e o receptor sequestrante de classe B de tipo I (SR-BI)⁷, caracterizando, em parte, a atividade de vasodilatação dessa lipoproteína⁸.

Além disso, a presença de polimorfismos no gene eNOS pode explicar os diferentes níveis de atividade enzimática, que podem ser associados com o aumento do risco cardiovascular⁹. O promotor do polimorfismo T-786C é o caso mais extensivamente estudado, no qual a presença do alelo C diminui em cerca de 50% a atividade transcricional¹⁰, provavelmente o resultado da ligação da proteína repressora RPA1 à região promotora quando esse alelo está presente¹¹. Ao reduzir a atividade enzimática, o alelo C tem sido associado a diminuição da produção de NO^{9,10}, aumento da disfunção endotelial e doenças cardiovasculares^{12,13}.

As estatinas têm efeitos pleiotrópicos conhecidos, que incluem a regulação da função endotelial reduzindo o estresse oxidativo e a trombogenicidade¹⁴. Além disso, são responsáveis pela inibição da proteína Rho e a expressão aumentada de eNOS, além da ativação pós-transcricional da via PI3K/AKT¹⁵.

Dada a importância tanto da expressão e atividade de eNOS como da presença de partículas de HDL para a função endotelial e a existência de efeitos pleiotrópicos das estatinas sobre essas duas variáveis, este estudo tem por objetivo determinar se a presença do polimorfismo T-786C e o uso de atorvastatina resulta em interações com alterações metabólicas em lipídeos, metabólitos de NO e PCR-as.

Métodos

Este estudo foi desenvolvido em parceria entre o Departamento de Farmacologia (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP) e o Departamento de Patologia Clínica (Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp), e foi aprovado pelo comitê de ética dessas instituições. Todos os voluntários foram informados sobre a pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e informado.

O número de indivíduos incluídos no estudo foi estimado para permitir um poder estatístico de 80% ($\beta < 0,20$; $\alpha < 0,05$) para detectar diferenças de 30% ou mais entre os dois grupos de genótipos (TT e CC). De acordo com a frequência estimada de genótipos TT (49%) e CC (9%)^{10,16-18}, 200 voluntários do sexo masculino foram selecionados na população local (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil), com idades entre 18-56 anos; eles também eram assintomáticos, caucasianos, não fumantes e não usuários de qualquer medicação. Voluntários do sexo feminino e fumantes foram excluídos.

Esses voluntários foram genotipados para a presença do polimorfismo T-786C do gene eNOS e, para o presente estudo, foram selecionados 15 com o genótipo TT e 15 com o genótipo CC, pareados por idade e pelo índice de massa corporal. Eles se submeteram a um exame clínico minucioso e a testes de laboratório, tendo fornecido um histórico completo de saúde.

O desenho do estudo foi monocego e controlado por placebo. Voluntários com genótipo CC ou TT receberam placebo durante 14 dias, seguido de um tratamento posterior de 14 dias com atorvastatina (Lipitor®, Pfizer, Brasil) na dose de 10 mg/dia, via oral. As amostras de sangue foram colhidas após jejum de 12 horas em tubos contendo EDTA após ambos os tratamentos e foram armazenadas a -70°C até a análise.

Genotipagem para o polimorfismo T-786C

O DNA genômico foi extraído a partir de 1 mL de sangue total pelo método *salting-out* e armazenado a -20°C até a análise. As variantes genéticas do polimorfismo T-786C localizado na região 5' do gene eNOS foram determinadas por amplificação através de reação em cadeia da polimerase, tal como descrito anteriormente¹⁶.

Os produtos amplificados foram digeridos com MspI a 37°C durante 4 horas, o que produziu fragmentos de 140 e 40 pb para o alelo selvagem (T) ou 90, 50 e 40 pb no caso do alelo polimórfico (C). Os fragmentos foram separados por eletroforese (gel de poli-acrilamida a 12%) e visualizados por coloração com prata.

Medidas bioquímicas

Colesterol, triglicérides, ácidos graxos livres, fosfolípidos, colesterol livre no plasma e subfrações de HDL foram quantificados através de métodos enzimático-colorimétricos no sistema automático Boehringer Mannheim-Roche Hitachi 917, usando reagentes comerciais da Roche (Mannheim, Alemanha) e Waco (Chemicals Waco, EUA). As proteínas foram determinadas pelo método do ácido bicinonínico.

Os ésteres de colesterol foram calculados pela fórmula (colesterol total – colesterol livre) $\times 1,67$, e o LDL-C pela fórmula de Friedewald (colesterol LDL = CT – (HDL-C) – TG/2,2), enquanto o HDL-C foi calculado por métodos homogêneos diretos¹⁹.

As apolipoproteínas AI e B-100, e a lipoproteína (a), foram determinadas por nefelometria através de reações imunoquímicas em BNII/Marburg, utilizando reagentes de Dade-Behring (Mannheim, Alemanha).

HDL₂ e HDL₃ foram isoladas utilizando o método de microultracentrifugação²⁰.

LDL-C/apoB-100 e triglicérides/HDL-C foram utilizados para determinar o tamanho estimado de LDL²¹, enquanto os índices de Castelli I e II foram usados para estimar o risco cardiovascular²².

Para determinar a porcentagem relativa de cada componente (lipídeos e proteínas) das frações HDL₂ e HDL₃ relacionada com o HDL total, foi usada a fórmula:

$$\text{Componente} * 100 / \text{componente HDL}_2 + \text{HDL}_3.$$

A porcentagem relativa de cada componente, em cada subfração, foi determinada pela fórmula:

$$\text{Componente HDL} / \text{massa total HDL} * 100.$$

A atividade da CETP (%) foi determinada utilizando-se o método radiométrico exógeno²³.

Os metabólitos do NO (nitrito/nitrato) foram detectados por ensaio de *kit* comercial (StressGen, Assay Designs, Inc.) de óxido nítrico (NO²⁻/NO³⁻). A variável NO_x foi calculada como a soma das concentrações (μmole/L) de nitrito e nitrato, e a razão nitrito/nitrato pela relação entre os dois analitos. Os valores de referência para NO_x variam entre 11,5-76,4 μmol/L²⁴.

A proteína C reativa foi determinada por imunoturbidimetria em um método de elevada sensibilidade (PCR-as), usando o PCR Tina-quant (Latex) HS-Roche.

Análises estatísticas

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as variáveis entre os dois grupos de genótipos e o uso de atorvastatina e placebo nos mesmos indivíduos. Análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas foi utilizada, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey, teste de perfil por contrastes ou teste BOX-COX para múltiplas comparações e para detectar interações. O nível de significância para os testes estatísticos foi de 5% ou $p \leq 0,05$, e para os valores limítrofes, 5-9% ($p > 0,05$ e $\leq 0,09$).

Este estudo foi parcialmente financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), São Paulo, Brasil, e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil. Nenhum financiamento externo adicional foi recebido para este estudo.

Resultados

Os dados basais bioquímicos e antropométricos (média ± DP) obtidos durante o período de seleção nos genótipos TT e CC foram, respectivamente: idade (anos) 27,6 ± 1,8/31,1 ± 2,1, pressão arterial sistólica (mmHg) 123 ± 3/130 ± 2,

pressão arterial diastólica (mmHg) 80 ± 3/81 ± 2, índice de massa corporal (kg/m²) 23,9 ± 0,7/25,1 ± 0,7, colesterol total (mg/dL) 161 ± 10/160 ± 10, triglicérides (mg/dL) 103 ± 13/103 ± 2, HDL-C (mg/dL) 36 ± 2/35 ± 2, LDL-C (mg/dL) 104 ± 10/103 ± 9 e VLDL-C (mg/dL) 21 ± 3/21 ± 2.

Os parâmetros bioquímicos foram avaliados nos grupos TT e CC, após a administração de placebo e atorvastatina, e as diferenças são mostradas na Tabela 1.

Os efeitos benéficos da atorvastatina sobre os parâmetros do metabolismo lipídico foram independentes do genótipo; o mesmo padrão foi observado em relação aos metabólitos de NO. Os ácidos graxos livres foram menores no grupo CC após a atorvastatina em comparação com o grupo TT (Tabela 1).

A atividade da CETP foi significativamente maior no grupo CC após o placebo, mas depois da atorvastatina essa atividade teve um aumento limítrofe no grupo TT e uma redução, embora não significante, no grupo CC.

Foram determinadas as composições químicas de HDL₂ após os tratamentos em ambos os genótipos. Não houve diferenças significativas em relação à composição de HDL₂ entre TT e CC. No entanto, foram observadas diferenças significativas após a atorvastatina em ambos os genótipos, como o aumento do teor absoluto e relativo das proteínas, a massa total de lipoproteína, o teor absoluto de TAG e a menor proporção relativa da razão CE e lípides/proteínas (Tabela 2). Os mesmos parâmetros foram avaliados para HDL₃, como mostrado na Tabela 3.

A subfração HDL₃ não apresentou diferenças entre os genótipos TT e CC. Após a atorvastatina, tanto o TT como o CC mostraram aumento significativo na CE relativa, massa de proteínas (absoluta) e lípides, enquanto a razão lípides/proteínas e proteínas (relativa) foram menores.

Tabela 1 – Parâmetros bioquímicos por genótipo e tratamento

Parâmetros	Placebo		Atorvastatina	
	TT (n = 15)	CC (n = 15)	TT (n = 15)	CC (n = 15)
Colesterol (mg/dL)	140 ± 29	140 ± 26	*102 ± 24 [‡]	*100 ± 12 [‡]
LDL-C (mg/dL)	80 ± 35	85 ± 21	*48 ± 24 [‡]	*49 ± 11 [‡]
TAG/HDL-C	2,46 ± 2	2,91 ± 2	*2,00 ± 1 [§]	*2,59 ± 2 [§]
Colesterol/HDL-C	3,92 ± 2	3,94 ± 1	*2,72 ± 1 [§]	*3,04 ± 1 [§]
Apo B-100 (mg/dL)	68 ± 25	69 ± 21	*43 ± 15 [‡]	*41 ± 10 [‡]
Lp(a) (mg/dL)	11 ± 12	10 ± 14	10 ± 9	14 ± 21
AGL (mEq/L)	0,37 ± 0,2	0,45 ± 0,4	0,38 ± 0,1	*0,27 ± 0,1 [§]
CETP (%)	12 ± 7	*22 ± 12 [§]	*16 ± 8	16 ± 9
Nitrito (μmol/L)	62 ± 55	56 ± 55	*24 ± 22 [‡]	*21 ± 21 [‡]
NO _x (μmol/L)	50 ± 19	46 ± 21	*21 ± 4 [‡]	*20 ± 3 [‡]
Nitrito/nitrato	15 ± 11	14 ± 11	*6 ± 4 [‡]	*8 ± 5 [‡]

Os valores são mostrados como média ± dp; p: teste de Mann-Whitney; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; TAG, triglicérides; HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; TAG/HDL-C: estimativa do tamanho da LDL; Apo B-100: apolipoproteína B-100; Lp(a): lipoproteína (a); AGL: ácidos graxos livres; CETP: proteína de transferência de colesterol éster; NO_x: nitrito + nitrato; *diferenças entre grupos (placebo/atorvastatina); †diferenças entre genótipos (TT/CC); ‡ p ≤ 0,001; §p ≤ 0,05; ||p = 0,065.

Tabela 2 – Diferenças significativas dos valores absolutos (mg/dL) e relativos (% HDL total) dos componentes químicos do HDL₂ após placebo e atorvastatina

Parâmetros	Placebo		Atorvastatina	
	TT (n = 15)	CC (n = 15)	TT (n = 15)	CC (n = 15)
CE	4,66 ± 1,51	4,64 ± 1,96	5,69 ± 2,84	5,46 ± 1,22
% CE relativa	(58,31 ± 3,69)	(59,08 ± 5,32)	[†] (55,71 ± 3,00) [‡]	[†] (55,42 ± 1,46) [‡]
TAG	1,16 ± 0,36	1,08 ± 0,96	[‡] 2,25 ± 0,88 [§]	[‡] 1,88 ± 0,98 [§]
% TAG relativos	(35,40 ± 11,73)	(28,20 ± 12,41)	(39,04 ± 17,21)	(33,36 ± 16,33)
Proteína	15,54 ± 9,84	12,96 ± 12,75	[†] 101,58 ± 16,33 [‡]	[†] 132,17 ± 129,06 [‡]
% Proteína relativa	(27,37 ± 16,68)	(21,17 ± 16,69)	[†] (44,49 ± 2,29) [§]	[†] (43,87 ± 5,96) [‡]
Massa total HDL ₂	32,44 ± 9,90	29,26 ± 13,84	[†] 121,09 ± 17,96 [‡]	[†] 150,66 ± 129,17 [§]
Massa lipídica	16,89 ± 2,26	16,30 ± 4,58	[†] 19,51 ± 3,69 [‡]	18,50 ± 3,15
Razão lipídeos/proteína	3,60 ± 5,14	3,71 ± 5,20	[†] 0,19 ± 0,05 [§]	[†] 0,18 ± 0,05 [§]

Os valores são a média ± dp; p: teste de Mann-Whitney; % relativa: componente HDL/massa total HDL*100; CE: colesterol éster; TAG: triglicérides; proteína, proteína total de HDL₂; massa total HDL₂, soma do colesterol, colesterol livre, CE, TAG, fosfolipídios e proteínas; massa de lipídios, soma do colesterol, colesterol livre, CE, TAG e fosfolipídios; [†]diferenças entre grupos (placebo/atorvastatina); [‡]p ≤ 0,001; [§]p ≤ 0,05.

Tabela 3 – Diferenças significativas dos valores absolutos (mg/dL) e relativos (% HDL total) dos componentes químicos de HDL₃ após placebo e atorvastatina

Parâmetros	Placebo		Atorvastatina	
	TT (n = 15)	CC (n = 15)	TT (n = 15)	CC (n = 15)
CE	3,37 ± 1,24	3,30 ± 1,52	4,55 ± 2,32	4,41 ± 1,09
% relativa CE	(41,69 ± 3,69)	(40,92 ± 5,32)	[†] (44,29 ± 3,00) [§]	[†] (44,58 ± 1,46) [§]
Proteína	40,95 ± 19,97	42,34 ± 19,98	[†] 111,98 ± 6,55 [‡]	[†] 120,00 ± 18,10 [‡]
% relativa Proteína	(72,63 ± 16,68)	(78,83 ± 16,69)	[†] (55,51 ± 2,29) [§]	[†] (56,13 ± 5,96) [‡]
Massa total HDL ₃	77,69 ± 24,12	79,18 ± 23,75	97,52 ± 50,41	101,29 ± 62,04
Massa lipídica	36,74 ± 6,20	36,84 ± 9,84	[†] 56,78 ± 15,23 [§]	[†] 54,58 ± 5,11 [‡]
Razão lipídios/proteína	0,76 ± 0,41	0,86 ± 0,50	[†] 0,40 ± 0,21 [‡]	[†] 0,35 ± 0,15 [‡]

Os valores são a média ± dp; p: teste de Mann-Whitney; % relativa: componente HDL/massa total HDL*100; CE: colesterol éster; proteína, proteína total de HDL₃; massa total HDL₃, soma do colesterol, colesterol livre, CE, triglicérides, fosfolipídios e proteínas; massa de lipídios, soma do colesterol, colesterol livre, CE, triglicérides e fosfolipídios; [†]diferenças entre grupos (placebo/atorvastatina); [‡]p ≤ 0,001; [§]p ≤ 0,05.

A fim de medir as alterações induzidas pela atorvastatina em ambos os genótipos e as subfrações HDL₂ e HDL₃, avaliou-se a porcentagem pelo peso de cada componente após a administração de placebo e atorvastatina (Tabela 4).

Em relação à composição de HDL₂, verificou-se que houve uma redução na porcentagem pelo peso de todos os compostos lipídicos dessa subfração e um aumento significativo de proteínas, independentemente do genótipo. A HDL₃ mostrou diminuição dos triglicérides e aumento de proteínas, independentemente do genótipo (Tabela 4).

Os resultados significativos e limítrofes obtidos entre os genótipos TT e CC e entre os tratamentos são apresentados na Tabela 5, que também apresenta a análise da interação entre o polimorfismo e a atorvastatina.

O polimorfismo T-786C não foi responsável por qualquer alteração nos parâmetros estudados (Tabela 5).

Em relação ao uso de placebo e atorvastatina, é mostrado um efeito claro das estatinas na redução de lipídeos, apolipoproteínas e nitrito. Ainda assim, houve modificações na HDL₂ e HDL₃, o que resultou na redução significativa das razões de lipídio/proteína de cada subfração, com diferentes implicações metabólicas. Finalmente, demonstramos as interações limítrofes entre o polimorfismo e a atorvastatina para CETP e Lp(a).

Discussão

O polimorfismo T-786C do gene eNOS é funcionalmente caracterizado por uma redução da atividade promotora do gene, com consequente influência sobre a produção de NO^{11,25}. Estudos recentes demonstraram que os indivíduos homocigóticos para esse polimorfismo têm sensibilidade reduzida à tensão de cisalhamento laminar²⁶, bem como há aumento de marcadores inflamatórios séricos em

Tabela 4 – Composição química expressa como % por peso de HDL₂ e HDL₃ de indivíduos TT e CC após placebo e atorvastatina

Parâmetros	HDL ₂			
	Placebo		Atorvastatina	
	TT (n = 15)	CC (n = 15)	TT (n = 15)	CC (n = 15)
Colesterol	4,28 ± 2,13	5,23 ± 2,60	*1,01 ± 0,73 [‡]	*0,98 ± 0,55 [‡]
CL	4,20 ± 5,11	3,99 ± 1,93	*0,86 ± 0,32 [‡]	*0,82 ± 0,35 [‡]
CE	15,69 ± 7,79	17,93 ± 8,88	*4,62 ± 1,96 [‡]	*4,33 ± 1,21 [‡]
TAG	3,83 ± 1,31	3,61 ± 2,56	*1,94 ± 0,83 [‡]	*1,61 ± 1,06 [§]
FL	32,99 ± 10,38	37,66 ± 15,65	*8,80 ± 1,52 [‡]	*8,28 ± 2,62 [‡]
Proteína	43,29 ± 18,04	36,81 ± 23,86	*83,79 ± 2,55 [‡]	*84,96 ± 4,46 [‡]

Parâmetros	HDL ₃			
	Placebo		Atorvastatina	
	TT (n = 15)	CC (n = 15)	TT (n = 15)	CC (n = 15)
TAG	3,22 ± 1,68	3,23 ± 1,74	*0,72 ± 0,26 [‡]	*0,79 ± 0,26 [‡]
Proteína	50,39 ± 10,21	51,35 ± 14,26	*78,68 ± 2,06 [‡]	*77,08 ± 2,41 [‡]

Os valores são expressos em média ± dp; p: teste de Mann-Whitney; CL: colesterol livre; CE: colesterol éster; TAG, triglicérides; FL: fosfolípidios; *diferenças entre grupos (placebo/atorvastatina); ‡ p ≤ 0,001; § p ≤ 0,05.

Tabela 5 – Comparações entre variáveis e interações entre genótipos e tratamentos

Variáveis	Polimorfismos	Tratamentos	Interações
Colesterol (mg/dL)	-	p ≤ 0,001 [#]	-
LDL-C (mg/dL)	-	p ≤ 0,001 [#]	-
VLDL-C (mg/dL)	-	p ≤ 0,032 ^{''}	-
TAG (mg/dL)	-	p ≤ 0,043 ^{''}	-
Apo B-100 (mg/dL)	-	p ≤ 0,001 [#]	-
Lp(a) (mg/dL)	-	p ≤ 0,067 [#]	p ≤ 0,056
AGL (mEq/L)	-	-	-
CETP (%)	-	-	p ≤ 0,070
Nitrito (µmole/L)	-	p ≤ 0,001 ^{##}	-
HDL ₂ CE (mg/dL)	-	p ≤ 0,033 ^{''}	-
HDL ₃ CE (mg/dL)	-	p ≤ 0,002 ^{''}	-
HDL ₂ TAG (mg/dL)	-	p ≤ 0,001 [#]	-
HDL ₃ TAG (mg/dL)	-	p ≤ 0,048 [#]	-
HDL ₂ PROT (mg/dL)	-	p ≤ 0,001 [#]	-
HDL ₃ PROT (mg/dL)	-	p ≤ 0,001 [#]	-
Massa total HDL ₂ (mg/dL)	-	p ≤ 0,001 [#]	-
Massa lipídica HDL ₂ (mg/dL)	-	p ≤ 0,012 ^{††}	-
Massa lipídica HDL ₃ (mg/dL)	-	p ≤ 0,001 [#]	-
Razão HDL ₂ total para proteínas	-	p ≤ 0,001 [#]	-
Razão HDL ₃ total para proteínas	-	p ≤ 0,001 [#]	-

Variáveis transformadas em ranks devido à ausência de distribuição normal; p, ANOVA para medidas repetidas, seguida do teste post-hoc de Tukey e teste de perfil por contrastes; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; TAG: triglicérides; Apo B-100: apolipoproteína B-100; Lp(a): lipoproteína (a); AGL: ácidos graxos livres; CETP: proteína de transferência de colesterol éster; HDL: lipoproteína de alta densidade; CE: colesterol éster; PROT: proteínas; massa total HDL: soma do colesterol, FC, CE, PL, TAG e proteínas; massa lipídica HDL: soma do colesterol, FC, CE, TAG e PL; †polimorfismos: TT × CC; †tratamentos: placebo × atorvastatina; †interações: polimorfismos × tratamento; #diferenças significativas entre tratamentos: placebo ≠ atorvastatina para ambos os genótipos; †diferenças significativas entre tratamentos: placebo ≠ atorvastatina somente para CC; ††diferenças significativas entre tratamentos: placebo ≠ atorvastatina somente para TT; ††BOX-COX entre tratamentos.

pacientes com DAC²⁷ estabelecida, aumento do risco de mortalidade e o desenvolvimento de disfunção renal quando submetidos a cirurgia cardíaca de emergência²⁸.

Embora o efeito das estatinas sobre o genótipo CC tenha sido previamente avaliado, especialmente o efeito anti-inflamatório da atorvastatina²⁵, ainda existem alguns pontos inexplorados, como o impacto da interação entre o polimorfismo e o medicamento no metabolismo lipídico e subfrações de HDL.

O nosso estudo demonstrou que a atorvastatina teve um efeito principalmente genótipo-independente, dadas as reduções nos lípides, razões lípides/proteína (HDL₂ e HDL₃), índice de Castelli I, ácidos graxos livres e maior tamanho estimado de LDL; esse efeito de redução de lípides está de acordo com estudos anteriores^{29,30}.

Os genótipos TT e CC não foram diferentes em relação à composição química de HDL₂ e HDL₃; todas as alterações na composição foram determinadas pela atorvastatina. Na HDL₂ observamos diminuição em todos os lípides, com aumento significativo nas proteínas. Essa descoberta sugere que a HDL₂ tornou-se mais deslipídada, sem qualquer alteração no número de partículas. Além disso, houve enriquecimento de lipídios e proteínas na HDL₃ – com a consequente diminuição da razão lipídio/proteína, o que aponta para um aumento do número de partículas da HDL₃.

Esse conjunto de alterações sugere um aumento da atividade da lipase hepática, em contraste com estudos que mostram que a atorvastatina seria responsável pela diminuição de sua atividade³¹. Por outro lado, o aumento das partículas de HDL₃ sugere que a atorvastatina promoveu a troca entre os lipídios neutros e as lipoproteínas e tornou as HDL₂ enriquecidas em triglicérides, um substrato ideal para a formação de partículas de HDL₃^{32,33}.

No nosso estudo, não foram observadas interações entre PCR-as e a atorvastatina, apesar da redução de 40% após o tratamento. Gensini e cols.³⁴ demonstraram que o tratamento com atorvastatina, particularmente na dose de 80 mg/dia, reduz eficazmente os níveis plasmáticos de PCR-as, apesar da presença de síndrome metabólica ou diabetes melito.

Observamos que os metabólitos de NO diminuiriam significativamente após o tratamento com atorvastatina; os mesmos resultados foram observados em pacientes com doença arterial periférica³⁵. No entanto, a maioria dos estudos aponta para um aumento ou manutenção dos seus níveis³⁶.

Foram observadas interações limítrofes entre atorvastatina e genótipo CC para CETP e Lp(a). A Lp(a), embora não tenha sido diferente entre os grupos, apresentou a tendência de aumentar no grupo CC após a atorvastatina. Além disso, estudos anteriores mostraram que a presença do polimorfismo T-786C em pacientes diabéticos é um fator de risco independente na redução da vasodilatação endotélio-dependente³⁷.

É interessante notar que os voluntários CC mostravam uma atividade da CETP significativamente maior, que

diminuiu, embora não significativamente, após o uso de estatina. Por outro lado, depois das estatinas, o grupo TT mostrou um aumento limítrofe. O aumento da atividade da CETP reduz a HDL e aumenta seu catabolismo pela lipase hepática³⁸. Assim, o uso de atorvastatina “corrigiu” a condição inicial da CETP no grupo CC, uma vez que a atorvastatina foi capaz de reduzir a sua atividade^{15,31}. Um estudo realizado na população chinesa mostrou que a presença de T-786C e Taq1B (um polimorfismo do gene CETP) é responsável pela maior predisposição à fibrilação atrial não valvular³⁹, contribuindo para a possibilidade de existência de relações mais complexas entre essas duas variáveis, além do aumento da atividade de CETP.

No genótipo CC, foi demonstrada uma redução significativa de ácidos graxos livres após a utilização de atorvastatina, mas não houve nenhuma alteração no genótipo TT. Isso sugere que o polimorfismo pode ter efeito benéfico através de uma mobilização menor de ácidos graxos livres do tecido adiposo para o plasma e o fígado, facilitando o efeito supressor de estatinas nos ácidos graxos livres do plasma. Os mecanismos envolvidos não estão totalmente elucidados⁴⁰.

Gostaríamos de comentar alguns pontos do estudo que poderiam ser considerados para estudos futuros, como o fato de que não foram avaliados os efeitos de outras doses de atorvastatina e/ou outras estatinas. Além disso, o estudo foi realizado somente em homens caucasianos saudáveis e em número relativamente pequeno de indivíduos, fato que pode ter limitado a capacidade para detectar diferenças entre os grupos estudados.

Conclusão

Estes resultados em conjunto indicam que o tratamento com estatinas pode ser relevante para a prevenção primária da aterosclerose em pacientes com o polimorfismo T-786C do gene eNOS, considerando os efeitos sobre o metabolismo lipídico.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer à Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro para este trabalho.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPESP e CNPq.

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Vanessa Helena de Souza Zago pela Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas.

Referências

- Hadi HA, Suwaidi JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag.* 2007;3(6):853-76.
- Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J.* 2009;73(3):411-8.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001;357(Pt 3):593-615.
- Cunningham KS, Gotlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest.* 2005;85(1):9-23.
- Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. *Arch Pharm Res.* 2009;32(8):1103-8.
- Tai SC, Robb GB, Marsden PA. Endothelial nitric oxide synthase: a new paradigm for gene regulation in the injured blood vessel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(3):405-12.
- Andrews KL, Moore XL, Chin-Dusting JP. Anti-atherogenic effects of high-density lipoprotein on nitric oxide synthesis in the endothelium. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010;37(7):736-42.
- Norata GD, Catapano AL. Molecular mechanisms responsible for the antiinflammatory and protective effect of HDL on the endothelium. *Vasc Health Risk Manag.* 2005;1(2):119-29.
- Wang XL, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab.* 2000;70(4):241-51.
- Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, et al. T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation.* 1999;99(22):2864-70.
- Lacchini R, Silva PS, Tanus-Santos JE. A pharmacogenetics-based approach to reduce cardiovascular mortality with the prophylactic use of statins. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010;106(5):357-61.
- Fatini C, Sofi F, Sticchi E, Gensini F, Gori AM, Fedi S, et al. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (C894T, 4a4b, T-786C) and hyperhomocysteinemia on the predisposition to acute coronary syndromes. *Am Heart J.* 2004;147(3):516-21.
- Alvarez R, Gonzalez P, Batalla A, Reguero JR, Iglesias-Cubero G, Hevia S, et al. Association between the NOS3 (-786 T/C) and the ACE (I/D) DNA genotypes and early coronary artery disease. *Nitric Oxide.* 2001;5(4):343-8.
- Igarashi J, Miyoshi M, Hashimoto T, Kubota Y, Kosaka H. Statins induce S1P1 receptors and enhance endothelial nitric oxide production in response to high-density lipoproteins. *Br J Pharmacol.* 2007;150(4):470-9.
- Blum A, Shamburek R. The pleiotropic effects of statins on endothelial function, vascular inflammation, immunomodulation and thrombogenesis. *Atherosclerosis.* 2009;203(2):325-30.
- Tanus-Santos JE, Desai M, Flockhart DA. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics.* 2001;11(8):719-25.
- Tanus-Santos JE, Desai M, Deak LR, Pezzullo JC, Abernethy DR, Flockhart DA, et al. Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol. *Pharmacogenetics.* 2002;12(5):407-13.
- Nasreen S, Nabika T, Shibata H, Moriyama H, Yamashita K, Masuda J, et al. T-786C polymorphism in endothelial NO synthase gene affects cerebral circulation in smokers: possible gene-environmental interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(4):605-10.
- Nauck M, Marz W, Haas B, Wieland H. Homogeneous assay for direct determination of high-density lipoprotein cholesterol evaluated. *Clin Chem.* 1996;42(3):424-9.
- Eyre J, Hammett F, Miller NE. A micro-method for the rapid ultracentrifugal separation of human plasma high density lipoprotein subfractions, HDL2 and HDL3. *Clin Chim Acta.* 1981;114(2-3):225-31.
- Boizel R, Benhamou PY, Lardy B, Laporte F, Foulon T, Halimi S. Ratio of triglycerides to HDL cholesterol is an indicator of LDL particle size in patients with type 2 diabetes and normal HDL cholesterol levels. *Diabetes Care.* 2000;23(11):1679-85.
- Arcanjo CL, Piccirillo LJ, Machado IV, Andrade CR Jr, Clemente EL, Gomes MB. Lipid profile and anthropometrical evaluation in type 1 diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2005;49(6):951-8.
- Lagrost L. Determination of the mass concentration and the activity of the plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Methods Mol Biol.* 1998;110:231-41.
- Ghasemi A, Zahediasl S, Azizi F. Reference values for serum nitric oxide metabolites in an adult population. *Clin Biochem.* 2010;43(1-2):89-94.
- Souza-Costa DC, Sandrim VC, Lopes LF, Gerlach RF, Rego EM, Tanus-Santos JE. Anti-inflammatory effects of atorvastatin: modulation by the T-786C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene. *Atherosclerosis.* 2007;193(2):438-44.
- Asif AR, Oellerich M, Armstrong VW, Hecker M, Cattaruzza M. T-786C polymorphism of the NOS-3 gene and the endothelial cell response to fluid shear stress—a proteome analysis. *J Proteome Res.* 2009;8(6):3161-8.
- Lekakis JP, Ikonomidis I, Tsiabida M, Protogerou A, Papada A, Papanagioutou A, et al. Genetic variations of the endothelial nitric oxide synthase gene are related to increased levels of C-reactive protein and macrophage-colony stimulating-factor in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 2006;96(4):520-8.
- Popov AF, Henker C, Schmitto JD, Wiese CH, Coskun KO, Moerer O, et al. Clinical relevance of eNOS T-786C polymorphism for hospital mortality and morbidity in cardiac surgical patients. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 2010;51(2):265-72.
- Guerin M, Lassel TS, Le Goff W, Farnier M, Chapman MJ. Action of atorvastatin in combined hyperlipidemia: preferential reduction of cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL1 particles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(1):189-97.
- Nicholls SJ. Relationship between LDL, HDL, blood pressure and atheroma progression in the coronaries. *Curr Opin Lipidol.* 2009;20(6):491-6.
- Yamashita S, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, Nakagawa-Toyama Y, Nishida M. Molecular mechanisms of HDL-cholesterol elevation by statins and its effects on HDL functions. *J Atheroscler Thromb.* 2010;17(5):436-51.
- Settasatian N, Duong M, Curtis LK, Ehnholm C, Jauhainen M, Huuskonen J, et al. The mechanism of the remodeling of high density lipoproteins by phospholipid transfer protein. *J Biol Chem.* 2001;276(29):26898-905.
- Daniels TF, Killinger KM, Michal JJ, Wright RW Jr, Jiang Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *Int J Biol Sci.* 2009;5(5):474-88.
- Gensini GF, Gori AM, Dilaghi B, Rostagno C, Gaw A, Blanco-Colio LM, et al. Effect of atorvastatin on circulating hsCRP concentrations: a sub-study of the achieve cholesterol targets fast with atorvastatin stratified titration (ACTFAST) study. *Int J Cardiol.* 2010;142(3):257-64.
- Aguilar EM, Miralles Jde H, Gonzalez AF, Casariego CV, Moreno SB, Garcia FA. In vivo confirmation of the role of statins in reducing nitric oxide and C-reactive protein levels in peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2009;37(4):443-7.
- Metzger IF, Ishizawa MH, Rios-Santos F, Carvalho WA, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes affect nitrite levels in black subjects. *Pharmacogenomics J.* 2011;11(6):393-9.
- Guang-da X, Qiong-shu W, Wen J. A T-786C polymorphism in 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene and endothelium-dependent arterial dilation in Type 2 diabetes. *Diabet Med.* 2005;22(12):1663-9.
- Ranalletta M, Bierilo KK, Chen Y, Milot D, Chen Q, Tung E, et al. Biochemical characterization of cholesteryl ester transfer protein inhibitors. *J Lipid Res.* 2010;51(9):2739-52.
- Xu LX, Yang WY, Zhang HQ, Tao ZH, Duan CC. Study on the correlation between CETP TaqIB, KCNE1 S38G and eNOS T-786C gene polymorphisms for predisposition and non-valvular atrial fibrillation. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2008;29(5):486-92.
- Isley WL, Miles JM, Patterson BW, Harris WS. The effect of high-dose simvastatin on triglyceride-rich lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Lipid Res.* 2006;47(1):193-200.