

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DE POLIPEPTÍDEOS  
TRANSPORTADORES DE ÂNIONS ORGÂNICOS (OATP) E A RESPOSTA AO  
TRATAMENTO COM SINVASTATINA**

**VINICIUS DE ALBUQUERQUE SORTICA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mara Helena Hutz**

Porto Alegre, janeiro de 2009.

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

---

As pesquisas, realizadas no Laboratório de DNA do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, foram subvencionadas pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Institutos do Milênio.

O aluno recebeu bolsa de estudos concedida pelo CNPq.

## **AGRADECIMENTOS**

---

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mara H. Hutz por ter aceitado ser minha orientadora e por toda a confiança e incentivo recebidos.

À Marilu Fiegenbaum por todos os ensinamentos sobre fármacos e farmacogenética, e pela amizade.

À Silvana, Luciana e Estela pela troca de conhecimentos, colaboração no trabalho e pela amizade.

Às meninas do laboratório, Júlia, Fabiana, Ana Paula, Janaína, Angélica e Verônicas por terem me recebido muito bem no meu novo local de trabalho, por toda ajuda que me deram e por todas as risadas compartilhadas.

Ao Prof<sup>o</sup> Israel Roisenberg pelo convívio e a experiência compartilhada quando trabalhamos juntos.

Ao pessoal do laboratório de hemostasia, Eliane, Ana Maria, Mariana pelo apoio e amizade.

Aos orientadores Paulo, Marita, Sandra, Israel, Aoi, Ita e colegas Paulo Roberto, Tatiana, Emerson, Paulinho, Alessandra, Ana Cláudia, que ajudaram na minha formação e permitiram que eu chegasse a esse mestrado.

Ao CNPq pelas concessões das bolsas que acompanharam meus estudos.

Aos Professores do Departamento de genética da UFRGS pelos ensinamentos e debates científicos.

Ao Elmo e a Ellen por todo apoio e por estarem sempre prontos para auxiliar os alunos da Pós-Graduação.

Aos meus pais pelo amor, pela educação que eu e meus irmãos tivemos e por nunca medirem esforços para que nós pudéssemos buscar nossos objetivos.

Aos meus irmãos pelo convívio e por toda ajuda e apoio que me deram nesses anos.

Aos meus colegas de faculdade, pelo apoio e diversão.

Aos meus amigos Leonardo, Andrei, Daniele, Lima, Inês, Denis, Juliana que me acompanham e ajudam a fazer a vida mais engraçada e sem sentido.

À minha namorada Virgínia Germani por toda ajuda e compreensão nesses anos de namoro, e por me agüentar por tanto tempo.

À família Germani, por todo apoio e incentivo nesses anos de convívio.

Aos bons vinhos pela inspiração.

Ao Pearl Jam, Dave Matthews Band e outras bandas pela inspiração nos momentos de dificuldade e por me acompanharem nos trabalhos do laboratório.

## SUMÁRIO

---

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades.....	07
Lista de figuras e tabelas.....	09
Resumo.....	10
Abstract.....	12
<b>1 Introdução.....</b>	<b>14</b>
1.1 Doenças cardiovasculares.....	15
1.1.1 Aspectos gerais.....	15
1.1.2 Tratamento.....	15
1.2 Inibidores da HMG CoA redutase.....	16
1.2.1 Mecanismos de ação.....	16
1.2.2 Efeitos adversos.....	18
1.2.3 Sinvastatina.....	19
1.3 Aspectos farmacogenéticos.....	20
1.4 Polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATP).....	23
1.4.1 Polipeptídeo transportador de ânion orgânico 1B1 (OATP1B1).....	25
1.4.2 Polipeptídeo transportador de ânion orgânico 1B3 (OATP1B3).....	32
<b>2 Justificativa e objetivos.....</b>	<b>35</b>
<b>3 SLCO1B1 and SLCO1B3 gene polymorphisms and lipid-lowering response to sinvastatin treatment.....</b>	<b>38</b>
<b>4 Discussão.....</b>	<b>65</b>
<b>5 Referências bibliográficas.....</b>	<b>71</b>
Anexos.....	90

Anexo 1..... 91

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

---

4S: Scandinavian Simvastatin Survival Study

aa: aminoácido

ABC: “adenosine triphosphate binding cassette”

ALT: aspartato aminotransferase

APOE: apolipoproteína E

AST: alanina aminotransferase

BCRP: proteína de resistência ao câncer de mama

BSEP: bomba de efluxo de sais biliares

CETP: proteína transferidora de ésteres de colesterol

CK, CPK: creatina fosfoquinase

dL: decilitro

FR: fatores de risco

GWA: “genomewide association”

HDL, HDL-c: lipoproteína de alta densidade

HMG CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A

HMGCR: 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A redutase

HPS: Heart Protection Study

INTDIS: International Drug Information System

LDL, LDL-c: lipoproteína de baixa densidade

MEV: mudança de estilo de vida

MDR1: “multidrug resistance”

mg: miligrama

MRP: proteína relacionada ao MDR

nt: nucleotídeo

OAT: transportadores de ânion orgânicos

OATP, OATP1B1, OATP1B3: polipeptídeo transportador de ânion orgânico

OCT: transportadores de cátions orgânicos

OCTN: transportadores de cátions/carnitina orgânicos

PEPT: transportadores peptídicos

SLCO: família de transportadores de soluto

SCAP: “SREBF cleavage-activating protein”

SEARCH: Study of the Effectiveness of Additional Reductions in Cholesterol and

Homocysteine

SNPs: polimorfismos de base única

SREBFs: “sterol regulatory element-binding factors”

VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

---

### Figuras

Figura 1. Modelo topológico predito para o OATP1B1 em humanos com 12 domínios transmembrana.....	24
Figura 2. Representação esquemática da estrutura secundária do OATP1B1 em humanos, apresentando as posições das trocas de aminoácidos conhecidas.....	27
Figura 3. Representação esquemática da estrutura secundária predita do OATP1B3 em humanos, apresentando as posições das trocas de aminoácidos conhecidas.....	33

### Tabelas

Tabela 1. Diretrizes atualizadas do “National Cholesterol Education Program ATP III”.....	17
Tabela 2. OATPs humanos, distribuição e fármacos substratos.....	26
Tabela 3. Frequência das mudanças de aminoácidos conhecidas dos OATP1B1 e OATP1B3.....	29

## RESUMO

---

A prevenção das doenças cardiovasculares é, atualmente, uma das principais metas para o cuidado com a saúde nos países ocidentais. Os inibidores da HMG CoA redutase (estatinas) são os fármacos mais utilizados para a prevenção das doenças cardiovasculares devido a sua eficácia em reduzir os níveis de colesterol e por serem bem tolerados durante o tratamento. Apesar de serem eficazes, existe uma grande variabilidade interindividual à resposta ao tratamento com estatinas. Parte dessa variação pode ser explicada por fatores genéticos, que podem afetar tanto a farmacocinética quanto a farmacodinâmica desses fármacos.

Na presente dissertação foram avaliados polimorfismos funcionais nos genes *SLCO1B1* e *SLCO1B3*, que codificam os polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATPs) 1B1 e 1B3 respectivamente, e sua possível influência sobre a eficácia e segurança do tratamento com 20 mg diárias de sinvastatina em uma amostra de 161 indivíduos de ancestralidade europeia da região metropolitana de Porto Alegre.

Os genótipos dos polimorfismos 388A>G, 521T>C e 463C>A do gene *SLCO1B1* e 334T>G e 699G>A do gene *SLCO1B3* foram determinados por discriminação alélica com ensaios Taqman 5'-nuclease em PCR em tempo real.

Polimorfismos do gene *SLCO1B1* foram associados significativamente com a resposta ao tratamento com sinvastatina. A variante 388A>G foi significativamente associada com uma maior redução nos níveis de colesterol total e LDL colesterol nos pacientes tratados com sinvastatina ( $P = 0,011$  e  $P = 0,013$  respectivamente). Os haplótipos *SLCO1B1*\*1b e *SLCO1B1*\*14 foram associados significativamente com a redução dos níveis de LDL colesterol após 6 meses de tratamento ( $P = 0,016$  e  $P = 0,019$

respectivamente). As variantes do gene SLCO1B3 estudadas não parecem influenciar a resposta ao tratamento com sinvastatina. Os polimorfismos dos genes SLCO1B1 e SLCO1B3 não estão relacionados com o aparecimento de efeitos adversos devido ao uso de sinvastatina na amostra estudada.

Os resultados relatados na presente dissertação demonstram a importância das variantes dos genes que codificam os OATPs para a farmacogenética dos inibidores de HMG CoA redutase. Entretanto, estudos em diferentes populações com as diferentes estatinas devem ser realizados futuramente para avaliar a influência dos polimorfismos dos OATPs na resposta às diferentes estatinas.

## ABSTRACT

---

At present, cardiovascular disease prevention is the major goal of health care in western countries. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) were the most utilized drugs in cardiovascular disease prevention due the high lipid-lowering efficacy and tolerance of treatment. Although a large interindividual variation in statin treatment response is frequently observed. Part of this variability could be explained by genetic factors that affect drug pharmacokinetics and pharmacodynamics.

In the present study, we evaluated the influence of functional polymorphisms in *SLCO1B1* and *SLCO1B3* genes, those codifying organic anions transporters polypeptides (OATPs) 1B1 and 1B3 respectively, on simvastatin 20 mg per day treatment efficacy and tolerance in 161 subjects of European ancestry from Porto Alegre metropolitan region.

The 388A>G, 521T>C and 463C>A *SLCO1B1* gene polymorphisms and 334T>G and 699G>A *SLCO1B3* gene polymorphisms were determined by allele discrimination with Taqman 5'-nuclease assays in real time PCR.

*SLCO1B1* gene polymorphisms were significantly associated with simvastatin treatment response. The 388A>G SNP was significantly associated with total cholesterol and LDL cholesterol reduction in patients treated with simvastatin ( $P = 0.011$  e  $P = 0.013$  respectively). *SLCO1B1*\*1b and *SLCO1B1*\*14 haplotypes were significantly associated with LDL cholesterol reduction 6 month treatment ( $P = 0.016$  e  $P = 0.019$  respectively). *SLCO1B3* gene variants did not seem to influence the simvastatin treatment response. *SLCO1B1* and *SLCO1B3* gene polymorphisms were not related to the occurrence of adverse effects due to the use of simvastatin in the sample studied.

The reported results in the present study demonstrated the OATPs variants are important to the HMG-CoA reductase inhibitor pharmacogenetics. However, future studies in populations and with different statins should be made to assess the OATP polymorphisms influence in response to statins.

**CAPÍTULO 1**  
**INTRODUÇÃO**

---

## **1.1 Doenças cardiovasculares**

### **1.1.1 Aspectos Gerais**

As doenças cardiovasculares, atualmente, constituem a primeira causa de morte no mundo ocidental. Dados recentes demonstram que as doenças cardiovasculares afetam mais de um terço da população dos Estados Unidos e a mortalidade em decorrência dessas doenças chega a 30%, das quais 56% são devidas a doenças coronarianas (Rosamond *et al.*, 2007). No Brasil, dados do Ministério da Saúde relativos ao ano de 2005 indicam que a mortalidade por doenças cardiovasculares foi de 28,2%, e dessas, 30% foram por doenças coronarianas (Ministério da Saúde/DATASUS, 2005). No ano de 2004, aproximadamente 5% da população brasileira acima dos 35 anos apresentou casos graves de doenças cardiovasculares, e os custos diretos em saúde com esses pacientes corresponderam a 8% do gasto total do país com saúde (Azambuja *et al.*, 2008). Diversas pesquisas na área da saúde realizadas nas últimas décadas foram responsáveis pela identificação de fatores de risco potencialmente modificáveis para doença cardiovascular (como o tabagismo, a hipertensão, as dislipidemias e o diabetes mellitus). A melhoria das condições de vida da população dos Estados Unidos e da Europa, a partir da década de 1960, e da população no Brasil, a partir da década de 1980, em conjunto com a identificação de fatores de risco importantes e seus tratamentos, contribuiu de forma considerável para a redução da mortalidade por doenças cardiovasculares nos últimos anos (Tunsall-Pedoe *et al.*, 2000; Mansur *et al.*, 2001; de Souza *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2006; Kostis, 2007).

### **1.1.2 Tratamento**

Atualmente, os principais alvos de tratamento para o controle de doenças do coração são a redução dos níveis elevados de colesterol, especialmente de lipoproteínas de

baixa densidade (LDL), dos triglicerídeos e a elevação dos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL). As recomendações das diretrizes brasileiras (Sposito *et al.*, 2007) e americanas (Grundy *et al.*, 2004) para controle das doenças coronarianas priorizam a utilização de fármacos hipolipemiantes de acordo com o risco individual de cada paciente desenvolver problemas cardiovasculares (Tabela 1).

Para o tratamento dos quadros de dislipidemias são utilizadas diversas classes de fármacos, como resinas seqüestrantes de ácidos biliares, fibratos, ácido nicotínico, inibidores seletivos da absorção de colesterol e inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG CoA redutase), também conhecidos como estatinas ou vastatinas. Diversos estudos descrevem as estatinas como os fármacos mais eficientes em baixar os níveis de colesterol total (18 a 25%) e LDL-colesterol (LDL-C) (25 a 55%), além de reduzirem moderadamente os níveis de triglicerídeos (10 a 15%) e aumentarem levemente os níveis de HDL-colesterol (HDL-C) (5 a 10%). A utilização das estatinas diminui o risco de eventos cardíacos fatais e não fatais independentemente de outros fatores como idade, sexo, tabagismo, diabetes ou hipertensão (revisões em Bhatnagar, 1998; Gotto, 2001; Waters, 2001; Kreisberg e Oberman, 2002; Jacobson, 2006; Kostis, 2007).

## **1.2 Inibidores da HMG CoA redutase**

### **1.2.1 Mecanismos de ação**

As estatinas são fármacos que causam a inibição parcial e reversível da enzima HMG CoA redutase, a principal proteína na rota da síntese do colesterol endógeno. Os inibidores da HMG CoA redutase possuem uma porção similar ao ácido mevalônico,



**Tabela 1** – Diretrizes atualizadas do “National Cholesterol Education Program ATP III”

(Grundy *et al.*, 2004).

<b>Categoria de risco</b>	<b>LDL (mg/dL)</b>	<b>Orientação</b>	<b>Verificação</b>	<b>Meta LDL (mg/dL)</b>
Prevenção primária de baixo risco (LDL > 160mg/dL + 1 FR <sup>1/</sup> )	160 – 189 ≥ 190	MEV <sup>2/</sup> Tratamento medicamentoso imediato	3 meses <sup>3/</sup>	< 160
Prevenção primária de médio risco (LDL > 130 mg/dL + 2 FR <sup>1/</sup> )	≤160 > 160	MEV <sup>2/</sup> Tratamento medicamentoso imediato	3 meses	< 130
Prevenção primária de risco moderadamente alto (LDL > 100 mg/dL + 2 FR <sup>1/</sup> )	100 – 129 ≥ 130	MEV <sup>2/</sup> Tratamento medicamentoso imediato	3 meses	< 100
Prevenção de alto risco ou prevenção secundária (≥ 100mg/dL)	70 – 99 ≥ 100	MEV <sup>2/</sup> Tratamento medicamentoso imediato	3 meses	< 100 ou < 70

<sup>1/</sup>FR – Fator de risco; <sup>2/</sup>MEV – mudança do estilo de vida; <sup>3/</sup>Tratamento medicamentoso opcional indicado dependendo dos fatores de risco.

inibindo de forma reversível a conversão de HMG CoA em mevalonato (Goldstein e Brown, 1990).

A redução de colesterol intracelular promove um aumento da expressão dos receptores de LDL na superfície dos hepatócitos e resulta no aumento da recaptação de LDL circulante. Os inibidores de HMG CoA redutase também reduzem os níveis de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) por inibição da sua síntese e promoção de seu catabolismo. As VLDLs são precursores de LDLs e a inibição de sua produção resulta em uma redução adicional de LDL. A inibição da formação de VLDLs é secundária à inibição da síntese de colesterol, necessário para a formação da lipoproteína, e à redução dos níveis de apolipoproteína B, a principal apolipoproteína presente em LDLs (Christians *et al.*, 1998; Charlton-Menys e Durrington, 2007).

### **1.2.2 Efeitos adversos**

As estatinas são bem toleradas e raramente são observados efeitos adversos graves. Os efeitos adversos comuns a esses medicamentos incluem distúrbios gastrintestinais, dispepsia, dores de cabeça, mialgia, distúrbios no sistema nervoso central e desordens do sono. A hepatotoxicidade e as anormalidades musculares são os efeitos adversos clinicamente mais importantes. O aumento das concentrações de aminotransferases hepáticas: aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT); e da creatina fosfoquinase (CK ou CPK) a mais de três vezes o limite superior do normal foi descrito em 3 a 5 % dos pacientes. Entretanto, a elevação dessas enzimas, geralmente, é temporária e os pacientes permanecem assintomáticos. Anormalidades musculares podem começar como uma mialgia e evoluir até a miopatia (elevação de CK acima de dez vezes o valor normal), ou rhabdomiólise, onde além do aumento de CK, ocorre mioglobulinemia,

mioglobulinúria e necrose muscular extensiva (Revisões em Bottorf, 2006; Guyton, 2006; Jacobson, 2006; Law e Rudnicka, 2006; MacKenney *et al.*, 2006). Quando as estatinas são prescritas como monoterapia, a incidência de miopatia situa-se entre 0,1 e 0,5% dos casos e é dose-relacionada (Omar *et al.*, 2001; Tomlison *et al.*, 2001; Ballantyne *et al.*, 2003).

O mecanismo preciso pelo qual as estatinas induzem desordens musculares ainda não está estabelecido, mas os fatores de risco incluem: altas doses de estatinas; baixos níveis intestinais e hepáticos das enzimas envolvidas na metabolização do fármaco, o que eleva os seus níveis circulantes; co-administração de inibidores das enzimas de metabolização, o que também aumenta os níveis de estatina circulantes (Tomlison *et al.*, 2001; Christopher-Stine, 2006; Baer e Wortmann, 2007).

### **1.2.3 Sinvastatina**

A sinvastatina é um pró-fármaco administrado na forma de lactona que é ativado por hidrólise em seu correspondente ativo (forma ácida) por uma carboxi-esterase não específica no intestino, fígado e plasma (Mauro, 1993; Igel *et al.*, 2001). Aproximadamente 60% da sinvastatina que é absorvida passa por metabolização e sua biodisponibilidade pode passar de 5% para cerca de 70% se as proteínas envolvidas nestes processos forem totalmente inibidas. A concentração da sinvastatina e do seu metabólito ativo ocorre no fígado, que é o principal alvo dos inibidores de HMG CoA redutase, tendo pouca distribuição sistêmica em tecidos não alvo (Plosker e McTavish, 1995).

A sinvastatina é metabolizada pelas isoenzimas CYP3A4, CYP2C9 e CYP2D6 do citocromo P450 no intestino e no fígado (Mauro, 1993; Transon *et al.*, 1996), sendo a isoforma CYP3A4 a principal envolvida em sua metabolização (Beaird, 2000; Böger, 2001). Outros fármacos também metabolizados pela CYP3A4 afetam a metabolização da

sinvastatina, podendo aumentar sua concentração plasmática e aumentar o risco de efeitos adversos (Mata *et al.*, 2003; Jacobson, 2006).

O efeito hipolipemiante observado com a utilização da sinvastatina é uma redução do colesterol total de 33 a 40% e de LDL-C de 41 a 50%, um aumento de HDL-C de 11 a 25%, e uma redução de triglicerídeos de 18-31% (Mata *et al.*, 2003).

Dois grandes estudos, “Scandinavian Simvastatin Survival Study” (4S) e o “Heart Protection Study” (HPS), avaliaram o efeito desse medicamento na redução da mortalidade e morbidade por doenças cardiovasculares em diferentes populações. No estudo 4S, a sinvastatina reduziu de forma significativa o risco de mortalidade total em 30% dos participantes. A mortalidade dos pacientes com doenças cardiovasculares foi reduzida em 42%, e os eventos agudos foram reduzidos em 34% dos casos (4S, 1994). No estudo HPS, com 20.536 adultos (40 a 80 anos) com alto risco de desenvolver doenças cardiovasculares, uma redução de 24% na incidência desses eventos foi observada (Heart Protective Study Collaborative Group, 2002). Os efeitos adversos observados foram raros e não ultrapassaram 0,1% para miotoxicidade e 0,8% no aumento das enzimas hepáticas nesse estudo. Contudo, dados anteriores da International Drug Information System (INTDIS) relatam uma frequência de 8,4% para mialgia, 0,9% para miopatia e 0,4% para rabdomiólise em 15.149 pacientes que utilizaram sinvastatina (Hamilton-Craig, 2001).

### **1.3 Aspectos farmacogenéticos**

A genética é um dos muitos fatores que podem afetar a resposta a medicamentos e sua contribuição pode variar de 20 a 95%, conforme o fármaco e o tipo de resposta avaliado. Os genes alvo para os estudos farmacogenéticos são os genes que codificam proteínas envolvidas na metabolização e/ou transporte dos fármacos, influenciando a

farmacocinética dos compostos; os genes que codificam proteínas envolvidas no mecanismo de ação e/ou nas rotas metabólicas em que o fármaco age (farmacodinâmica); e os genes que codificam proteínas envolvidas no desenvolvimento direto da doença ou fenótipos intermediários (Hutz e Fiegenbaum, 2008).

A variabilidade interindividual na resposta ao tratamento com inibidores de HMG CoA redutase foi observada em acompanhamentos clínicos (Pazzucconi *et al.*, 1995). A farmacogenética dos inibidores de HMG CoA redutase, assim como de outros medicamentos hipolipemiantes, está focada em duas áreas principais: eficácia (redução dos níveis lipídicos e/ou prevenção de eventos cardíacos) e predição de efeitos adversos (Hutz e Fiegenbaum, 2008).

Diversos genes foram estudados na farmacogenética dos inibidores de HMG CoA redutase, tais como o gene que codifica a apolipoproteína E (APOE) (Ballantine *et al.*, 2000; Pedro-Botet *et al.*, 2001; Pena *et al.*, 2002; Fiegenbaum *et al.*, 2005a); o gene da proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) (Kuivenhoven *et al.*, 1997; Carlquist *et al.*, 2003; Freeman *et al.*, 2003; van Verrooij *et al.*, 2003; Winkelmann *et al.*, 2003; Fiegenbaum *et al.*, 2005a); o gene que codifica a 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A redutase (HMGCR) (Chasman *et al.*, 2004); genes de fatores de transcrição denominados “sterol regulatory element-binding factors” (SREBFs) e o gene da proteína SCAP (cleavage-activating protein), responsável pela ativação dos SREBFs, que estão envolvidos na síntese e recaptção de colesterol, triglicérides e ácidos graxos (Salek *et al.*, 2002; Fiegenbaum *et al.*, 2005b); e genes das isoenzimas do citocromo P450, CYP3A4, CYP3A5 e CYP2D6 (Kajinami *et al.*, 2004a, 2004b; Fiegenbaum *et al.*, 2005c). Algumas variantes nesses genes demonstram pequenos efeitos farmacogenéticos sobre as estatinas e, atualmente, possuem pouca aplicabilidade na prática clínica.

Recentemente, estudos *in vitro* de Ho e Kim (2005) demonstraram que as estatinas são substratos dos transportadores de membrana, e que tais transportadores podem influenciar a biodisponibilidade desses fármacos. Os transportadores de membrana podem ter interações de inibição ou redução na captação de fármacos refletindo na eficácia desses. Essas interações podem ser significantes se a eliminação ou distribuição do fármaco nos tecidos alvo é mediada principalmente pelo transportador ou se as interações resultam em uma concentração do medicamento no sítio de ação ou em uma toxicidade fora da janela terapêutica. Todavia, as interações com os transportadores podem resultar em mudanças do substrato em um tecido em particular sem afetar a concentração no sangue ou no plasma (Endres *et al.*, 2006).

As proteínas transportadoras de fármacos podem ser separadas em duas grandes classes: transportadores de efluxo e transportadores de captação. Os transportadores de efluxo agem exportando fármacos e substâncias do interior das células para o meio extracelular. A maioria dos transportadores de efluxo é membro da superfamília da “adenosine triphosphate binding cassette” (ABC). Fazem parte dessa classe de transportadores, a glicoproteína-P (também conhecida como MDR1), a bomba de efluxo de sais biliares (BSEP), a proteína relacionada ao MDR (MRP) e a proteína de resistência do câncer de mama (BCRP). Diferentemente dos transportadores de efluxo, os transportadores de captação facilitam o transporte de fármacos para o interior das células. Nessa classe, estão inclusas as famílias dos polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATP), dos transportadores de ânion orgânicos (OAT), dos transportadores de cátions orgânicos (OCT), dos transportadores de cátions/carnitina orgânicos (OCTN) e dos transportadores peptídicos (PEPT) (Ho e Kim, 2005).

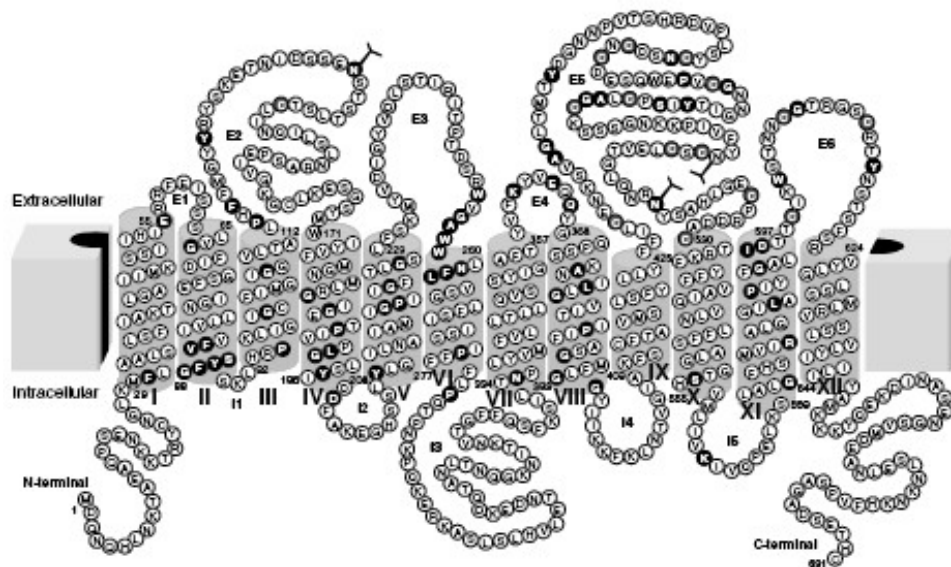
#### 1.4 Polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATPs)

Os OATPs são transportadores de captação codificados pelos genes da família de transportadores de soluto SLCO (anteriormente denominada SLC21) (Hagenbuch e Meier, 2004). Atualmente, a família OATP em humanos consiste em 11 membros (Hagenbuch e Meier, 2003; Mikkaichi *et al.*, 2004) incluindo 10 OATPs (OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3, OATP1C1, OATP2B1, OATP3A1, OATP4A1, OATP4C1, OATP5A1, OATP6A1) e o transportador da prostaglandina OATP2A1 (formalmente denominado PGT).

Segundo Hagenbuch e Meier (2003), a análise computacional de hidropatia mostra que os OATPs possuem uma organização extremamente semelhante, com 12 domínios transmembrana preditos e uma grande alça extracelular entre o 9º e o 10º domínios transmembrana (5ª alça) (Figura 1). Outras características, como os sítios de N-glicosilação nas 2ª e 5ª alças extracelulares e a “assinatura da superfamília” OATP na extremidade entre a 3ª alça extracelular e o 6º domínio transmembrana, também são conservadas.

Os OATPs são transportadores de captação sódio independentes capazes de transportar uma grande gama de ânions orgânicos anfipáticos, como sais biliares (Kullak-Ublick *et al.*, 1995; Meier *et al.*, 1997), hormônios da tireóide (Friesema *et al.*, 1999), hormônios esteróides e seus conjugados (Bossuyt *et al.*, 1996), cátions orgânicos, como a N-metilquinidina (van Montfoort *et al.*, 1999), entre outros. Além de compostos endógenos, OATPs são capazes de transportar vários xenobióticos, exercendo um papel importante na absorção, disposição e excreção de fármacos (König *et al.*, 2006).

Os OATPs são expressos em diversos tecidos (Tabela 2), e se encontram presentes em órgãos importantes como fígado, rins, intestino, cérebro e placenta (Tamai *et al.*, 2000). Entretanto, os OATP1B1 e OATP1B3 são predominantemente, se não exclusivamente



**Figura 1** – Modelo topológico predito para o OATP1B1 em humanos com 12 domínios transmembrana. Aminoácidos conservados em 77 de 97 OATPs/Oatps de mamíferos estão indicados em preto. Resíduos de cisteína conservados estão em cinza. Os 3 sítios de N-glicosilação estão indicados por “Y” na 2ª e 5ª alças extracelulares (Hagenbuch e Gui, 2008).



expressos no fígado (Hsiang *et al.*, 1999; König *et al.*, 2000). Os OATP1B1 e OATP1B3 estão envolvidos na captação de substâncias endógenas e xenobióticos pelos hepatócitos, sendo capazes de transportar diversos fármacos (Tabela 2), incluindo inibidores de HMG CoA redutase (Hsiang *et al.*, 1999; Nakai *et al.*, 2001; Hirano *et al.*, 2004), o antagonista do receptor da endotelina BQ123 (Kullak-Ublick *et al.*, 2001), e o antibiótico rifampicina (Vavricka *et al.*, 2002; Tirona *et al.*, 2003).

#### **1.4.1 Polipeptídeo transportador de ânion orgânico 1B1 (OATP1B1)**

O OATP1B1, anteriormente denominado como LST-1, OATP-C e OATP2, é codificado pelo gene *SLCO1B1*, que está localizado no braço curto do cromossomo 12 (12p12). Esse transportador é altamente expresso na membrana basolateral dos hepatócitos (Abe *et al.*, 1999; Hsiang *et al.*, 1999; Tamai *et al.*, 2000). O OATP1B1 está envolvido na captação de diferentes estatinas como: pravastatina (Hsiang *et al.*, 1999), cerivastatina (Shitara *et al.*, 2003), pitavastatina (Hirano *et al.*, 2004), rosuvastatina (Schneck *et al.*, 2004; Ho *et al.*, 2006), atorvastatina (Kameyama *et al.*, 2005), fluvastatina (Kopplow *et al.*, 2005) e sinvastatina ácida (Pasanen *et al.*, 2006a).

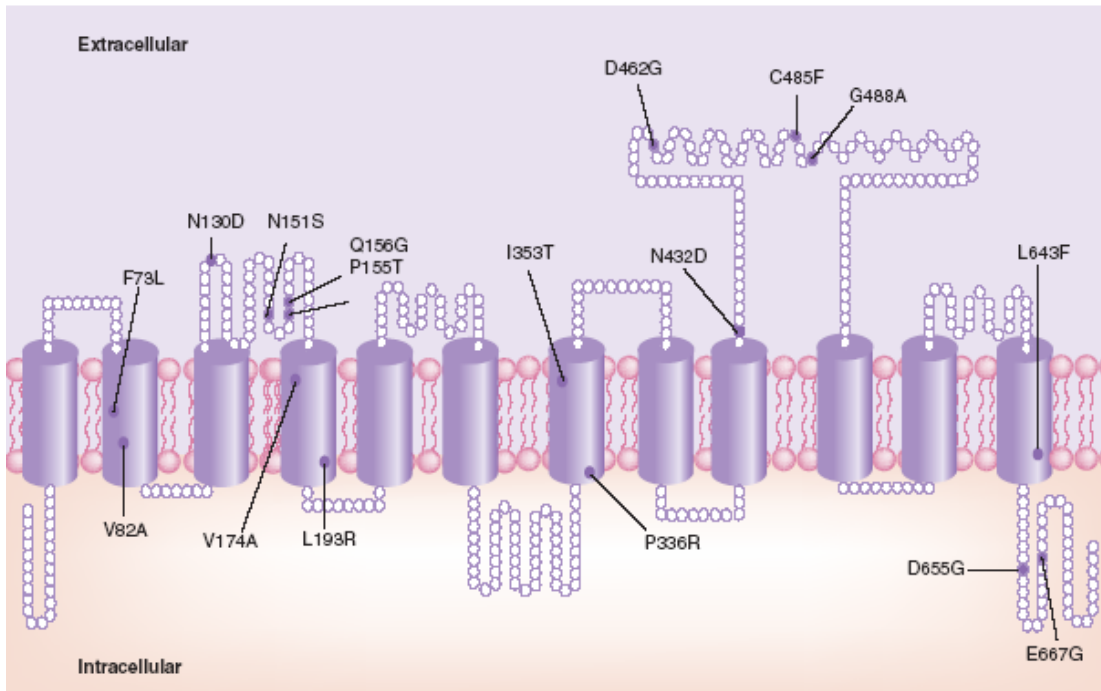
Diversos polimorfismos de base única (SNP) não sinônimos foram descritos para o gene *SLCO1B1* (Figura 2) (revisões em König *et al.*, 2006; Niemi, 2007; Seithel *et al.*, 2008; Zaïr *et al.*, 2008).

Tirona *et al.* (2001) demonstraram *in vitro* que polimorfismos no gene *SLCO1B1*, encontrados em uma população de norte-americanos de ancestralidades européia e africana, modificaram o transporte dos substratos [<sup>3</sup>H] estrona-3-sulfato e “estradiol 17β-D-glucuronide” pelo OATP1B1. Trabalhos posteriores investigaram a importância dos polimorfismos no gene *SLCO1B1* no transporte de substratos diversos em diferentes

**Tabela 2** – OATPs humanos, distribuição e fármacos substratos (modificado de Niemi, 2007).

<b>Transportador</b>	<b>Gene</b>	<b>Distribuição</b>	<b>Fármacos substratos</b>
OATP1A2	SLCO1A2	Cérebro <sup>1/</sup> , rim, fígado, intestino	Fexofenadine, levofloxacina, pitavastatina, rocurônio, rosuvastatina, saquinavir, tiroxina
OATP1B1	SLCO1B1	Fígado	Atorvastatina, atrasentan, benzilpenicilina, bosentan, caspofungina, cerivastatina, enalapril, fluvastatina, irinotecan (metabólito SN-38), metotrexato, olmesartan, pitavastatina, pravastatina, repaglinide, rifampicina, rosuvastatina, sinvastatina ácida, temocapril, troglitazona, valsartan
OATP1B3	SLCO1B3	Fígado	Bosentan, digoxina, docetaxel, enalapril, fexofenadina, fluvastatina, metotrexato, olmesartan, paclitaxel, pitavastatina, rifampicina, rosuvastatina, telmisartan, tiroxina, valsartan
OATP1C1	SLCO1C1	Cérebro, testículo	Tiroxina
OATP2A1	SLCO2A1	ubíquo	Desconhecido
OATP2B1	SLCO2B1	Fígado <sup>1/</sup> , placenta, intestino <sup>1/</sup> , coração, pele	Atorvastatina, benzilpanicilina, fexofanadine, fluvastatina, glibenciamida, pravastatina, rosuvastatina
OATP3A1	SLCO3A1	ubíquo	Benzilpenicilina, tiroxina, vasopressina
OATP4A1	SLCO4A1	ubíquo	Benzilpenicilina, tiroxina
OATP4C1	SLCO4C1	Rim	Digoxina, tiroxina, metotrexato, sitagliptina
OATP5A1	SLCO5A1	Desconhecido	Desconhecido
OATP6A1	SLCO6A1	Testículo	Desconhecido

<sup>1/</sup> Tecidos com maior expressão dos transportadores



**Figura 2** – Representação esquemática da estrutura secundária do OATP1B1 em humanos, apresentando as posições das trocas de aminoácidos conhecidas (Niemi, 2007).

populações (Michalski *et al.*, 2002; Nozawa *et al.*, 2002; Iwai *et al.*, 2004). Nozawa *et al.* (2005) descreveram *in vitro* a influência do haplótipo 388G + 521C (denominado SLCO1B1\*15 dos SNPs 388A>G e 521T>C) no transporte do inibidor de topoisomerase 1 Irinotecan, de seu metabólito ativo, e também do inibidor de HMG CoA redutase pravastatina, demonstrando que esses polimorfismos podem influenciar a variabilidade interindividual desses medicamentos.

Os alelos variantes dos SNPs funcionais 388A>G (Asn130Asp), 463C>A (Pro155Thr) e 521T>C (Val174Ala) do gene SLCO1B1 possuem uma frequência alta em europeus (Tabela 3), sendo também encontrados em outras populações (Revisão em König *et al.*, 2006; Niemi, 2007). Baseados nos resultados dos estudos *in vitro*, diversos trabalhos foram realizados para determinar os possíveis efeitos dos polimorfismos do gene SLCO1B1 na farmacocinética das estatinas em humanos. O efeito de polimorfismos desse gene na farmacocinética da pravastatina, pitavastatina, rosuvastatina, atorvastatina e da sinvastatina foi demonstrado em diferentes populações (Nishizato *et al.*, 2003; Mwinyi *et al.*, 2004; Niemi *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Pasanen *et al.*, 2006a; Pasanen *et al.*, 2007). Mwinyi *et al.* (2004) demonstraram em um grupo de voluntários da Alemanha, que os portadores do alelo 388G (denominado SLCO1B1\*1b), após ingerirem uma dose única de pravastatina, apresentam uma menor concentração plasmática desse fármaco em comparação com os portadores do alelo selvagem 388A. Nesse trabalho, os pesquisadores ainda demonstraram que os portadores do alelo 521C (denominado SLCO1B1\*5) apresentam uma concentração plasmática aumentada em relação ao alelo selvagem 521T, sugerindo um efeito inverso desses polimorfismos na farmacocinética da pravastatina. Em outro trabalho, Chung *et al.* (2005) demonstraram em um grupo de

**Tabela 3** – Frequência das mudanças de aminoácidos conhecidas dos OATP1B1 e OATP1B3 (modificado de Niemi, 2007).

Gene	Mudança de nt.	Mudança de aa.	Frequência alélica <sup>1/</sup> (%)			
			Europeus <sup>2/</sup>	Africanos <sup>3/</sup>	Chineses	Japoneses
SLCO1B1	217T>C	Phe73Leu	0 – 2	0	NC <sup>4/</sup>	NC <sup>4/</sup>
	245T>C	Val82Ala	0 – 2	0	NC <sup>4/</sup>	NC <sup>4/</sup>
	388A>G	Asn130Asp	30 – 46	72 – 81	62 – 84	63 – 87
	452A>G	Asn151Ser	0	0	0 – 4	1
	463C>A	Pro155Thr	13 – 23	2 – 6	0 – 1	0
	467A>G	Glu156Gly	0 – 2	0	NC <sup>4/</sup>	NC <sup>4/</sup>
	521T>C	Val174Ala	8 – 20	1 – 2	9 – 16	10 – 16
	578T>G	Leu193Arg	<0,3	NC <sup>4/</sup>	NC <sup>4/</sup>	NC <sup>4/</sup>
	1007C>G	Pro336Arg	NC <sup>4/</sup>	NC <sup>4/</sup>	1	NC <sup>4/</sup>
	1058T>C	Ile353Thr	0 – 2	0	NC <sup>4/</sup>	NC <sup>4/</sup>
	1294A>G	Asn432Asp	0 – 1	0	NC <sup>4/</sup>	NC <sup>4/</sup>
	1385A>G	Asp462Gly	0 – 1	0	NC <sup>4/</sup>	NC <sup>4/</sup>
	1454G>T	Cys485Phe	NC <sup>4/</sup>	NC <sup>4/</sup>	1	NC <sup>4/</sup>
	1463G>C	Gly488Ala	0	9	NC <sup>4/</sup>	NC <sup>4/</sup>
	1929A>C	Leu643Phe	4	13	NC <sup>4/</sup>	NC <sup>4/</sup>
	1964A>G	Asp655Gly	0 – 2	0	NC <sup>4/</sup>	NC <sup>4/</sup>
2000A>G	Glu667Gly	0 – 2	34	NC <sup>4/</sup>	NC <sup>4/</sup>	
SLCO1B3	334T>G	Ser112Ala	78 – 89	35 – 41	68 – 83	64 – 68
	699G>A	Met233Ile	71 – 90	34 – 42	68 – 84	70 – 71
	1564G>T	Gly522Cys	0 – 2	0	0	NC <sup>4/</sup>
	1679T>C	Val560Ala	0	2 – 4	0	0

<sup>1/</sup>Frequência do alelo variante apresentada como intervalo das frequências encontradas na literatura; <sup>2/</sup>Europeus e norte americanos de ancestralidade européia; <sup>3/</sup>Africanos subsaharianos e norte americanos de ancestralidade africana; <sup>4/</sup>Frequência não conhecida; nt., nucleotídeo e aa., aminoácido.

voluntários sul-coreanos que ingeriram diferentes doses de pitavastatina, que os portadores do haplótipo 388G + 521C (denominado SLCO1B1\*15) apresentam uma maior concentração plasmática do medicamento em comparação com os indivíduos com o haplótipo selvagem (SLCO1B1\*1A), indicando uma menor captação do fármaco nesses indivíduos. Pasanen *et al.* (2006b) caracterizaram a frequência dos SNPs do gene SLCO1B1 na população da Finlândia e, num estudo posterior, em um grupo de 32 voluntários que ingeriram uma dose única de 40mg de sinvastatina, demonstraram que o polimorfismo 521T>C afeta a farmacocinética da forma ativa desse medicamento (Pasanen *et al.*, 2006a). Os participantes homozigotos para o genótipo 521C (denominado SLCO1B1\*5) obtiveram um aumento plasmático significativo da forma ativa da sinvastatina (forma ácida) em comparação com os outros genótipos indicando uma diminuição na captação desse fármaco.

Até o momento, poucos estudos investigaram a influência dos polimorfismos do gene SLCO1B1 na resposta ao tratamento com os inibidores da HMG CoA redutase e na ocorrência de efeitos adversos desses fármacos. Tachibana-Iimori *et al.* (2004), em um estudo retrospectivo no sul do Japão, estudaram a influência do SNP 521T>C na eficácia de estatinas em um grupo de 66 pacientes que utilizaram pravastatina, atorvastatina ou sinvastatina. Nesse estudo, os heterozigotos 521TC apresentaram uma redução média percentual menor nos níveis de colesterol total do que os homozigotos para o genótipo 521T. Em outro estudo, Hedman *et al.* (2006) constataram que um grupo de crianças heterozigotas para o SNP 521T>C que realizaram transplantes de coração e foram tratadas com pravastatina apresentaram um menor redução média percentual nos níveis de colesterol total e LDL-C, e um menor aumento nos níveis de HDL-C que os homozigotos para o genótipo 521T. Em um trabalho recente, Zhang *et al.* (2007) demonstraram uma

diferença na redução do colesterol total de pacientes chineses que utilizaram pravastatina. Os pacientes heterozigotos 521TC obtiveram uma redução menor nos níveis de colesterol total em comparação com os homozigotos 521TT. Apesar de não encontrarem homozigotos 521CC, os autores sugerem uma redução na eficiência do fármaco nos indivíduos que possuem o alelo C em relação aos homozigotos 521TT nessa população. Niemi *et al.* (2005), através de marcadores plasmáticos da síntese de colesterol, demonstraram uma pequena diminuição na biosíntese de colesterol em heterozigotos que possuem o haplótipo -11187G + 388A + 521C (denominado SLCO1B1\*17) que foram tratados com pravastatina. Esse estudo sugere que os portadores do haplótipo SLCO1B1\*17 possuem uma menor captação da pravastatina interferindo na diminuição da síntese endógena de colesterol, que é o principal efeito desse fármaco. Contrastando com os trabalhos descritos, Igel *et al.* (2006) não encontraram influência de variantes do gene SLCO1B1 na eficácia do tratamento de três semanas com pravastatina em um grupo de 16 voluntários saudáveis.

Um trabalho recente com 724 idosos hipercolesterolêmicos tratados com 80mg/dia de fluvastatina demonstrou a influência do SNP 463C>A na eficácia desse fármaco. Portadores do alelo 463A e do haplótipo 388G + 463A (denominado SLCO1B1\*14) apresentam uma maior redução nos níveis médios do LDL-C (Couvert *et al.*, 2008). Em outro trabalho recente, foi realizado um estudo de associação genômica total (GWA) analisando aproximadamente 300.000 polimorfismos em 85 pacientes que utilizaram 80mg de sinvastatina diariamente e desenvolveram miopatia. Esse estudo encontrou uma forte associação dos pacientes portadores do alelo 521C com a ocorrência da miopatia, correlacionando esse alelo, que é associado com a maior concentração plasmática de

estatinas, com a ocorrência de efeitos adversos em pacientes utilizando altas doses de sinvastatina (SEARCH Collaborative Group, 2008).

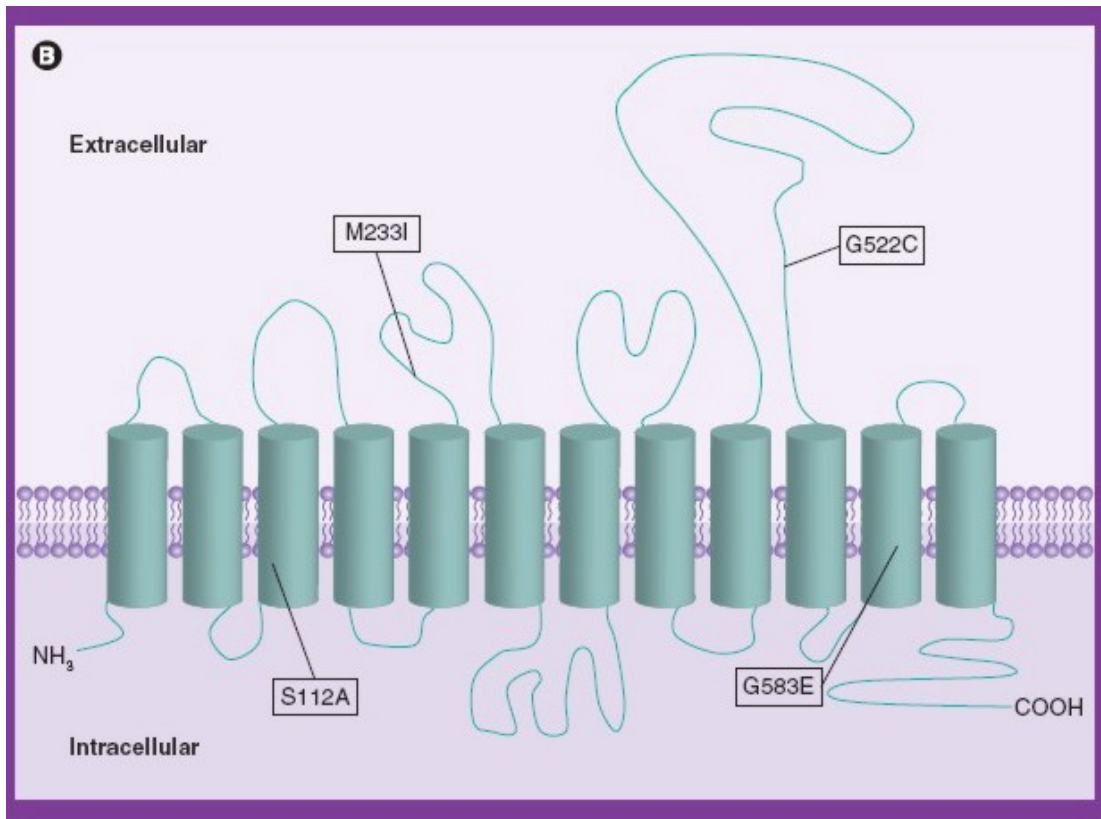
#### **1.4.2 Polipeptídeo transportador de ânion orgânico 1B3 (OATP1B3)**

O OATP1B3, inicialmente denominado como OATP-8, é codificado pelo gene SLCO1B3 que está localizado no braço curto do cromossomo 12 (12p12). Igualmente ao OATP1B1, o OATP1B3 é expresso nos hepatócitos (König *et al.*, 2000), entretanto esse transportador possui sua expressão concentrada na região perivenosa do fígado (Ho *et al.*, 2006). O OATP1B3, em sua seqüência de aminoácidos, possui 80% de identidade com OATP1B1 e possui grande sobreposição com os substratos desse transportador (Tabela 2) (König *et al.*, 2006), entretanto é o único OATP existente no fígado capaz de transportar os fármacos digoxina, docetaxel e paclitaxel (Kullak-ublick *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2005). As estatinas pitavastatina (Hirano *et al.*, 2004), fluvastatina (Kopplow *et al.*, 2005) e rosuvastatina (Kitamura *et al.*, 2008) já foram descritas como substrato do OATP1B3.

Diferentemente do OATP1B1, o OATP1B3 foi objeto de poucos estudos na área da farmacogenética. Os primeiros SNPs do gene SLCO1B3 foram descritos por Iida *et al.* (2001) na população japonesa. Letshert *et al.* (2004) demonstraram em um estudo *in vitro* que os polimorfismos não sinônimos 334T>G (Ser112Ala), 699G>A (Met233Ile) não alteram o transporte de diferentes substratos do OATP1B3, e o polimorfismo 1564G>T (Gly522Cys) (Figura 3) pode influenciar o transporte desse OATP. Os alelos variantes dos polimorfismos 334T>G (Ser112Ala), 699G>A (Met233Ile) possuem uma freqüência alta em europeus, e 1564G>T é raro nessa população (Tabela 3).

Em um trabalho na população japonesa, Tsujimoto *et al.* (2006) descreveram a freqüência dos SNPs 334T>G, 699G>A e constataram um desequilíbrio de ligação entre





**Figura 3** – Representação esquemática da estrutura secundária predita do OATP1B3 em humanos, apresentando as posições das trocas de aminoácidos conhecidas (Zair et al., 2008).

esses polimorfismos. Recentemente, dois trabalhos demonstraram a influência da interação entre fármacos afetando o transporte das estatinas pravastatina e pitavastatina pelo OATP1B3 (Hirano *et al.*, 2006; Seithel *et al.*, 2007). Smith *et al.* (2007), estudaram a interação dos três SNPs não sinônimos em 90 pacientes europeus com câncer, tratados com o fármaco paclitaxel. Esse estudo não demonstrou a influência desses polimorfismos na farmacocinética desse fármaco. Em um trabalho recente, Miura *et al.* (2008) demonstraram que pacientes transplantados homocigotos para o haplótipo 334G + 699A possuem uma excreção maior para a bile da forma ativa do imunossupressor micofenolato de mofetila, influenciando a biodisponibilidade desse fármaco.

Até o momento, não existem trabalhos avaliando a influencia dos SNPs funcionais do gene SLCO1B3 na farmacocinética em pacientes em tratamento com inibidores de HMG CoA redutase.

## **CAPÍTULO 2**

### **JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

---

A variação interindividual na resposta ao tratamento com inibidores de HMG CoA redutase possui grande importância para o tratamento das dislipidemias e a prevenção das doenças cardiovasculares na população mundial. Estudos em diversos genes que podem influenciar a farmacocinética e a farmacodinâmica dessa classe de medicamentos realizados até o momento apresentam diferenças em seus resultados dependendo do tipo de estatina utilizada e da população estudada. Muitas vezes, variantes de genes que influenciam a farmacocinética de uma estatina não parecem influenciar a resposta ao tratamento ou o aparecimento de efeitos adversos desse medicamento. Por esses motivos os estudos sobre a variação genética no uso dessa classe de fármacos ainda não apresentam resultados conclusivos, dificultando os avanços para a prescrição e uso desses medicamentos baseados na farmacogenética.

Polimorfismos funcionais nos genes SLCO1B1 e SLCO1B3 que codificam os OATPs 1B1 e 1B3 respectivamente, parecem estar envolvidos tanto na resposta quanto no aparecimento de efeitos adversos de fármacos. Variantes no gene SLCO1B1 estão relacionadas na farmacocinética de diferentes estatinas, mas o papel dessas variantes na resposta a esses fármacos ainda não está elucidado. Os polimorfismos funcionais do gene SLCO1B3 que, atualmente, são investigados principalmente na influência à resposta de quimioterápicos, ainda não foram estudados no tratamento com fármacos hipolipemiantes.

Pelos motivos descritos, o presente trabalho tem por objetivos:

- 1 - Determinar se os SNPs 388A>G, 463C>A e 521T>C do gene SLCO1B1, os SNPs 334T>G e 699G>A do gene SLCO1B3 e os haplótipos derivados dos mesmos estão envolvidos na eficácia do tratamento com o medicamento hipolipemiante sinvastatina em uma amostra de indivíduos de ancestralidade europeia da região metropolitana de Porto Alegre.

2 - Verificar se essas variantes nos genes SLCO1B1 e SLCO1B3 estão associadas com a ocorrência de efeitos adversos da sinvastina.

### **CAPÍTULO 3**

#### **SLCO1B1 AND SLCO1B3 GENE POLYMORPHISMS AND LIPID-LOWERING RESPONSE TO SINVASTATIN TREATMENT**

---

Manuscrito em preparação para ser submetido à revista Clinical Pharmacology & Therapeutics

# **SLCO1B1 AND SLCO1B3 GENE POLYMORPHISMS AND LIPID-LOWERING RESPONSE TO SINVASTATIN TREATMENT**

VA Sortica<sup>1</sup>, M Fiegenbaum<sup>2</sup>, CR Van der Sand<sup>3</sup>, LC Van der Sand<sup>3</sup>, MEW Ferreira<sup>3</sup>, RC Pires<sup>3</sup>, MH Hutz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, <sup>2</sup>Centro Universitário Metodista IPA, Porto Alegre, Brazil, <sup>3</sup>Centro de Diagnóstico Cardiológico, Porto Alegre, Brazil.

Address to which correspondence should be sent

Prof. Mara H. Hutz  
Departamento de Genética  
Instituto de Biociências, UFRGS  
Caixa Postal 15053  
91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil  
Tel 55 51 3316-6720  
Fax. 55 51 3316-7311  
E-mail: mara.hutz@ufrgs.br

Abstract words: 144

Introduction words: 555

Manuscript words: 2.494

References: 37

Figures: 0

Key words: OATP, SLCO1B1, SLCO1B3, simvastatin, polymorphism

## **Abstract**

Functional SNPs of SLCO1B1 (388A>G, 463C>A and 521T>C) and SLCO1B3 (334T>G and 699G>A) genes were evaluated in simvastatin treatment efficacy and safety. A total of 137 hypercholesterolemic patients who completed a 6 month 20 mg/day simvastatin treatment were assessed for treatment response and 24 patients who presented adverse drug reactions were evaluated for safety. Carriers of the 388G allele showed 5.9% and 8.5% higher decrease in total cholesterol and LDL cholesterol respectively when compared with homozygous 388A allele subjects ( $P = 0.011$  and  $P = 0.013$ , respectively). At the haplotype level, SLCO1B1\*1b and SLCO1B1\*14 showed a 12% and 11.8% higher reduction in LDL cholesterol ( $P = 0.016$  and  $0.019$ , respectively). The other SLCO1B1 and SLCO1B3 genes SNPs evaluated did not show association with simvastatin response. No associations with adverse reactions were observed. These findings demonstrated the importance of 388A>G variant in simvastatin treatment response.



## **Introduction**

Cardiovascular disease is the most common cause of death in the world, with evidence of high low-density lipoprotein (LDL-C) and low high-density lipoprotein (HDL-C) levels as important independent risk factors (1). Cholesterol-lowering therapy is the central approach in the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. The HMG-CoA reductase inhibitors (statins) are the most prescribed drugs for the treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease. Statins decrease cholesterol synthesis by competitively inhibiting HMG-CoA reductase, the enzyme responsible for catalyzing the conversion of HMG-CoA to mevalonate, a precursor of cholesterol (2). Inhibition of the HMG-CoA reductase in the liver increases the expression of low-density lipoprotein (LDL) receptors in the hepatocyte plasma membrane, enhancing the removal of LDL particles from blood and reducing plasma total and LDL cholesterol concentrations (3). In addition to its role as the target organ, the liver plays an essential role in drug clearance from the circulation and elimination through metabolic processes catalyzed by several cytochrome P450 isozymes (4). There is considerable variation in interindividual response to statin therapy, but the origins of this variation are still poorly understood.

Hepatic uptake of statins has been demonstrated to be mediated in an active energy-dependent manner by organic anion-transporting polypeptides (OATPs) (5-11). The OATPs are sodium independent transporters encoded by genes of the solute carriers family SLCO. These transporters are present in the basolateral membrane of hepatocytes and are the major determinants of the uptake of several statins from portal circulation into hepatocytes (12). OATP1B1 and OATP1B3 are encoded by SLCO1B1 and SLCO1B3 genes respectively. These genes are highly expressed in the liver and may be considered

potential determinants of the interindividual variability in statin response because they play an important role in pharmacokinetics of statins (13).

Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) and other sequence variations have been described in SLCO1B1 (14, 15), some of them associated with altered transport *in vivo* and *in vitro*. Among the SNPs identified the 388A>G (Asn130Asp), 463C>A (Pro155Thr) and 521T>C (Val174Ala) and their derived haplotypes were the focus of several investigations of statin transport, efficacy and tolerance.

*In vitro* studies did not show differences in statins transport activity between the 388G variant and the wild-type transporter, however two pharmacokinetics studies suggested that this variant is associated with an increased activity of OATP1B1 *in vivo* (16, 17). The 521T>C SNP was associated with markedly reduced statin transport *in vitro* (5, 10, 14, 18, 19), while *in vivo* studies showed an increased statin plasma concentration (11, 15, 20-24). The heterozygous genotype (521TC) was associated with reduced cholesterol-lowering efficacy in patients using several different statins (25, 26) in some but not all studies (27). In a recent genomewide association study, the 521C variant was associated with an increased risk of statin-induced myopathy (28). Recently, a higher reduction in LDL-C levels was found in 463A homozygous individuals as compared with other genotypes at the 463C>A site (29).

At the SLCO1B3 locus the 699G>A (Met233Ile) and 334T>G (Ser112Ala) variants were not associated with altered transport activity *in vitro* for different substrates (30). But, the association of these common variants with statin response has not been evaluated so far.

Based on these evidences the present study aimed to evaluate the effect of these functional SNPs in simvastatin treatment efficacy and safety in a Brazilian population of European ancestry.

## **Results**

### **Characteristics of the studied population**

Demographic and key clinical characteristics of the patients included in the study are shown in Table 1. The subjects were aged between 25 and 87 years ( $60.9 \pm 11.7$  years), and 30% were males. Patients were maintained on other medications throughout the study with no change, including calcium channel blockers (15%), beta-blockers (34%), diuretics (28%), and other antihypertensive therapy (27%). Treatment with 20 mg per day of simvastatin significantly reduced the plasma levels of total cholesterol (-28.6%,  $P < 0.001$ ) and LDL-C (-38.7%,  $P < 0.001$ ). Triglyceride levels were modestly reduced (-15.5%,  $P < 0.001$ ), whereas the increase in HDL cholesterol did not reach statistical significance (-0.7%,  $P = 0.95$ ).

Adverse drug reactions (ADRs) were observed in 24 out of 161 subjects (15%) after 2 months of treatment. The following ADRs were observed: myalgia ( $n = 8$ ), myalgia plus abdominal pain ( $n = 1$ ), myalgia with increased creatine phosphokinase (CPK) levels higher than the upper limit of the normal range ( $n = 5$ ), CPK levels higher than the upper limit of the normal range ( $n = 5$ ), abdominal pain ( $n = 1$ ), and allergic reaction ( $n = 4$ ). No significant myopathy or rhabdomyolysis was observed in this small, short-term study. There were no significant differences in lipid and lipoprotein baseline levels between the ADR group and non-ADR group (Table 2).

### **Association between SLCO1B1 gene polymorphisms and Simvastatin therapy**

The genotype distributions for each polymorphism did not show statistically significant differences compared with those expected for Hardy-Weinberg equilibrium. No associations with baseline mean plasma lipid parameters were observed. The mean percent

reductions in lipid and lipoprotein levels after simvastatin treatment, according to SLCO1B1 genotypes are shown in Table 3. After adjustment for covariates, carriers of the SLCO1B1 388G allele had a greater reduction of total cholesterol with simvastatin treatment, when compared with 388A homozygotes (-28.7% versus -22.8%;  $P = 0.013$ ), similar results were observed for LDL cholesterol, 388G carriers had a greater reduction when compared with 388A homozygous subjects (-38.2% versus -29.7%;  $P = 0.011$ ). No significant differences were observed for 463C>A and 521T>C SNPs on lipid and lipoproteins levels. No significant associations were observed between SLCO1B3 allele variants and the efficacy of simvastatin (data not shown).

Haplotypes derived from the SNPs investigated at the SLCO1B1 and SLCO1B3 genes are shown in Table 4. Five different SLCO1B1 haplotypes were observed: \*1a, \*1b, \*5, \*14 and \*15. The 463A allele showed complete linkage disequilibrium with 388G and 521T ( $D' = 1.000$  and  $P < 0.001$ ). The 388G allele was in linkage disequilibrium with the 521T allele ( $D' = 0.706$   $P < 0.001$ ). The polymorphisms at the SLCO1B3 gene were in complete linkage disequilibrium forming 334T/699G and 334G/699A haplotypes.

As at the single locus level, differences in lipid and lipoprotein levels were also observed between SLCO1B1 haplotypes \*1a (wild type), \*1b, \*14 and \*15. This comparison showed significant differences in lipid-lowering efficacy for LDL cholesterol (Table 5). Carriers of haplotypes \*1b and \*14 showed a greater reduction in LDL cholesterol levels when compared with carriers of the \*1a haplotype (-40.8% versus -28.8%;  $P = 0.016$  and -40.6% versus -28.8%;  $P = 0.019$ , respectively). Haplotype \*5 was not included in analysis because of its low frequency in the studied sample (5 patients). Lipid and lipoprotein levels did not differ between SLCO1B3 334T/699G and 334G/699A haplotypes (Table 6).

No significant differences were observed for SLCO1B1 and SLCO1B3 polymorphisms between subjects presenting ADRs and without ADRs (Table 7).

## **DISCUSSION**

In this prospective study, we examined the possible influence of common polymorphisms in SLCO1B1 and SLCO1B3 genes and the efficacy and safety of simvastatin 20 mg/day treatment. Our major findings were the association of 388A>G at SLCO1B1 gene variant and haplotypes with simvastatin treatment efficacy. The observed allele and haplotype frequencies of the polymorphisms tested were in the same range as those reported in other populations from the same ethnic group (13, 31).

In this study we have observed that the 388G allele is significantly and independently associated with superior response to statin therapy in Brazilian hypercholesterolemic subjects. In this population, 388G carriers showed about 6% and 8.5% greater reduction in total cholesterol and LDL cholesterol respectively when compared with the homozygous 388A patients. These findings are in accordance with investigations that showed an association of this polymorphism with an enhanced hepatocellular uptake of statins by the liver (16, 17).

Several studies reported that the 521T>C polymorphism affects the uptake of statins (15, 20, 21, 23). In one such work it has been shown that the carriers of the 521C allele have a reduction in simvastatin acid form uptake (11). Japanese patients carriers of this allele have a reduced efficacy to treatment with statins, including simvastatin (25). Despite such evidences, in our study, carriers of the 521C allele did not have an influence on response to treatment with simvastatin. The 463C>A SNP, which recently was associated with

response to fluvastatin treatment in elderly hypercholesterolemic (29), did not show differences between genotypes of patients treated with simvastatin in the present study.

The SLCO1B1\*1b and SLCO1B\*14 haplotypes showed an enhanced response to simvastatin treatment and the SLCO1B1\*15 haplotype failed to reach threshold of significance (Table 5). Carriers of SLCO1B1\*1b haplotype presented a 12% higher reduction in LDL cholesterol when compared with the wild haplotype SLCO1B1\*1a carriers (-40.8% versus -28.8%) and the SLCO1B1\*14 carriers demonstrated an 11.8% higher reduction in LDL when compared to the wild haplotype carriers (40.6% versus -28.8%). The only difference between SLCO1B1\*1b (388G-463C-521T) and SLCO1B\*14 (388G-463A-521T) haplotypes is in the 463C>A SNP. Such evidence supports the importance of 388G variant effect in lipid-lowering response of simvastatin.

SLCO1B1\*15 (388G-463C-521C) was associated with a reduction in rosuvastatin and pravastatin uptake (10, 20), however in our study this haplotype did not show a significant difference in lipid and lipoprotein level reduction when compared with other haplotypes found in our population. This haplotype has a 521C allele, which is described in pharmacokinetics studies as having an inverse effect in relation to 388G allele in statin uptake (16, 17) and perhaps might interfere with the 388G improvement in simvastatin response.

So far, the polymorphisms of OATP1B1 appear to influence statin response in different ways. The 463C>A SNP and SLCO1B1\*14 haplotype are associated with enhanced efficacy to fluvastatin treatment (29), 521T>C is associated with an attenuated lipid-lowering efficacy of pravastatin (25, 26), and this study suggests a higher influence of 388G allele, SLCO1B1\*1b and SLCO1B1\*14 in improved simvastatin treatment response. These results taken together suggest that OATP1B1 polymorphisms investigations

developed with a specific statin may not be extrapolated to all kinds of statins. Only further studies of OATP1B1 variants with each statin may help elucidate the role of these uptake carriers in HMG-CoA reductase inhibitors efficacy.

SLCO1B3 334T>G and 699G>A SNPs were in complete linkage disequilibrium and their haplotypes showed no lipids and lipoproteins levels differences in patients treated with simvastatin. These polymorphisms were not associated with response to simvastatin. OATP1B3 is expressed more perivenously compared with OATP1B1, which is expressed diffusely in the liver lobulus (10), and although there is an overlapping of substrate specificity with OATP1B1, variants of OATP1B3 may have a minor role in the uptake of statins.

No differences in allele and genotype frequencies of SLCO1B1 and SLCO1B3 gene polymorphisms were observed between patients that showed ADRs and the group that did not show ADRs. The polymorphisms studied were not associated with simvastatin treatment safety in the studied sample. ADRs of statins are dose related (32) and although the 521C allele was recently associated with myopathy in subjects taking high doses of simvastatin (40 and 80 mg/d) (28), the incidence of myopathy is about 1 per 10.000 among patients taking 20 to 40 mg of simvastatin daily (33). No patients with myopathy were observed herein. The 521C allele was not associated with the ADRs observed in this study. To our knowledge this is the first report that described the association between SNP 388A>G and statin treatment response. This data will help in understanding of OATPs variants influence of statins treatment.

## **METHODS**

### **Study population**

One hundred sixty one hypercholesterolemic patients of European descent were prospectively investigated. All patients were screened by physical examination, medical history, and clinical laboratory evaluation and were invited to participate in this study. The sample and the study design were described previously (34). Briefly, subjects were treated with 20 mg/d simvastatin (Zocor; Merck Sharp & Dohme, São Paulo, Brazil) for 6 months and continued taking other medications throughout the study with no change. Plasma lipid and lipoprotein levels were measured at baseline and after two and six months of treatment. The Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul approved the study protocol. All participants of the study gave written informed consent. One hundred and thirty-seven patients completed the 6-month follow-up and were used for association analysis with efficacy of treatment. Twenty-four subjects presented adverse drug reactions (ADR group) and left the study throughout the follow-up.

The adverse effects were assessed during clinical follow-up. Decisions on inclusion and exclusion were made without awareness of the genotypes. The adverse effects and the criteria used to assess them were fully described by Fiegenbaum *et al.* (34)

### **Biochemical analysis**

Blood samples were collected from subjects after 12 hours fasting. Total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides and glucose levels were determined by conventional enzymatic methods. LDL cholesterol was calculated according to Friedewald *et al.* (35) Other biochemical parameters, such as liver function test and creatine phosphokinase (CPK) test results were obtained before and throughout the treatment.

### **Genotype analysis**



Genomic DNA was isolated from peripheral blood by standard procedures (36). SNPs 388A>G (rs2306283), 463C>A (rs11045819) and 521T>C (rs4149056) of SLCO1B1 gene and 334T>G (rs4149117) and 699G>A (rs7311358) of SLCO1B3 gene were determined by allelic discrimination with Taqman 5'-nuclease assays. Genotyping for SLCO1B1 388A>G (assay ID: C\_\_1901697\_20), 521T>C (assay ID: C\_\_30633906\_10), and SLCO1B3 334T>G (assay ID: C\_\_25639181\_40) and 699G>A (assay ID: C\_\_25765587\_40) SNPs were performed with validated TaqMan genotyping assays (Real Time PCR, Applied Biosystems, California, USA). The 463C>A polymorphism was genotyped with a custom genotyping assay by design (Applied Biosystems, California, USA) according to the manufacturer's recommended protocol.

### **Statistical analysis**

Allele frequencies were estimated by gene counting. Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and allelic distributions between groups were assessed by chi-square tests or, when appropriate, by Fisher exact test. Haplotype frequencies and linkage disequilibrium were estimated with the Multiple Locus Haplotype Analysis program (version 3.0). (37) Continuous variables were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Triglyceride levels were log-transformed before analysis because of its skewed distribution, but non-transformed values are presented in results. To determine the association of the genotypes with response to simvastatin treatment, mean changes in plasma lipid levels among genotypes were compared by a General Linear Model using the type III sums of squares. This sum of squares applies to unbalanced study designs and quantifies the effect of an independent variable after adjustment for all other variables included in the model. Age, gender, smoking status, hypertension, prior cardiovascular disease, diabetes and baseline

lipid levels were included in each model as covariates. Pairwise comparisons among haplotypes were performed by least significant difference with no adjustments. Statistical analysis was performed using the SPSS15.0 statistical package for Windows®.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank the staff of Centro de Diagnóstico Cardiológico for their assistance and Dr Silvana de Almeida, Luciana Otero Lima and Estela Maria Bruxel for help in sample collection. The authors also thank financial support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Institutos do Milênio (CNPq), PRONEX, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.

#### **CONFLICT OF INTEREST/DISCLOSURE**

None Declared

## REFERENCES

1. Kostis, J.B. The importance of managing hypertension and dyslipidemia to decrease cardiovascular disease. *Cardiovasc. Drugs. Ther.* 21, 297-309 (2007).
2. Goldstein, J.L. & Brown, M.S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* 343, 425-430 (1990).
3. Christians, U., Jacobsen, W. & Floren, L.C. Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in transplant patients: are the statins mechanistically similar? *Pharmacol. Ther.* 80, 1-34 (1998).
4. Schmitz, G. & Langmann, T. Pharmacogenomics of cholesterol-lowering therapy. *Vascul. Pharmacol.* 44, 75-89 (2006).
5. Kameyama, Y., Yamashita, K., Kobayashi, K., Hosokawa, M. & Chiba, K. Functional characterization of SLCO1B1 (OATP-C) variants, SLCO1B1\*5, SLCO1B1\*15 and SLCO1B1\*15+C1007G, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells. *Pharmacogenet. Genomics.* 15, 513-522 (2005).
6. Shitara, Y., Itoh, T., Sato, H., Li, A.P. & Sugiyama, Y. Inhibition of transporter-mediated hepatic uptake as a mechanism for drug-drug interaction between cerivastatin and cyclosporin A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304, 610-616 (2003).

7. Kopplow, K., Letschert, K., König, J., Walter, B. & Keppler, D. Human hepatobiliary transport of organic anions analyzed by quadruple-transfected cells. *Mol. Pharmacol.* 68, 1031-1038 (2005).
8. Hirano, M., Maeda, K., Shitara, Y. & Sugiyama, Y. Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the hepatic uptake of pitavastatin in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311, 139-146 (2004).
9. Hsiang, B. *et al.* A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. *J. Biol. Chem.* 274, 37161-37168 (1999).
10. Ho, R.H. *et al.* Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression, and pharmacogenetics. *Gastroenterology.* 130, 1793-1806 (2006).
11. Pasanen, M.K., Neuvonen, M., Neuvonen, P.J. & Niemi, M. SLCO1B1 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of simvastatin acid. *Pharmacogenet. Genomics.* 16, 873-979 (2006).
12. Hagenbuch, B. & Meier, P.J. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers. Arch.* 447, 653-665 (2004).

13. Niemi, M. Role of OATP transporters in the disposition of drugs. *Pharmacogenomics*. 8, 787-802 (2007).
14. Tirona, R.G., Leake, B.F., Merino, G. & Kim, R.B. Polymorphisms in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European- and African-Americans. *J. Biol. Chem.* 276, 35669-35675 (2001).
15. Niemi, M. *et al.* High plasma pravastatin concentrations are associated with single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide-C (OATP-C, SLCO1B1). *Pharmacogenetics*. 14, 429-440 (2004).
16. Maeda, K, *et al.* Effects of organic anion transporting polypeptide 1B1 haplotype on pharmacokinetics of pravastatin, valsartan, and temocapril. *Clin. Pharmacol. Ther.* 79, 427-439 (2006).
17. Mwinyi, J., Johne, A., Bauer, S., Roots, I. & Gerloff, T. Evidence for inverse effects of OATP-C (SLC21A6) 5 and 1b haplotypes on pravastatin kinetics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 75, 415-421 (2004).
18. Nozawa, T., Minami, H., Sugiura, S., Tsuji, A. & Tamai, I. Role of organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: in vitro evidence and effect of single nucleotide polymorphisms. *Drug. Metab. Dispos.* 33, 434-439 (2005).

19. Iwai, M., Suzuki, H., Ieiri, I., Otsubo, K. & Sugiyama, Y. Functional analysis of single nucleotide polymorphisms of hepatic organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C). *Pharmacogenetics*. 14, 749-757 (2004).
20. Nishizato, Y. *et al.* Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 73, 554-565 (2003).
21. Chung, J.Y. *et al.* Effect of OATP1B1 (SLCO1B1) variant alleles on the pharmacokinetics of pitavastatin in healthy volunteers. *Clin. Pharmacol. Ther.* 78, 342-350 (2005).
22. Lee, E. *et al.* Rosuvastatin pharmacokinetics and pharmacogenetics in white and Asian subjects residing in the same environment. *Clin. Pharmacol. Ther.* 78, 330-341 (2005).
23. Pasanen, M.K., Fredrikson, H., Neuvonen, P.J. & Niemi, M. Different effects of SLCO1B1 polymorphism on the pharmacokinetics of atorvastatin and rosuvastatin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 82, 726-33 (2007).
24. Niemi, M., Pasanen, MK. & Neuvonen, P.J. SLCO1B1 polymorphism and sex affect the pharmacokinetics of pravastatin but not fluvastatin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 80, 356-366 (2006).

25. Tachibana-Iimori, R. *et al.* Effect of genetic polymorphism of OATP-C (SLCO1B1) on lipid-lowering response to HMG-CoA reductase inhibitors. *Drug. Metab. Pharmacokinet.* 19, 375-380 (2004).
26. Zhang, W. *et al.* SLCO1B1 521T-->C functional genetic polymorphism and lipid-lowering efficacy of multiple-dose pravastatin in Chinese coronary heart disease patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 64, 346-352 (2007).
27. Igel, M. *et al.* Impact of the SLCO1B1 polymorphism on the pharmacokinetics and lipid-lowering efficacy of multiple-dose pravastatin. *Clin. Pharmacol. Ther.* 79, 419-426 (2006).
28. SEARCH Collaborative Group, Link, E. *et al.* SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy--a genomewide study. *N. Engl. J. Med.* 359, 789-799 (2008).
29. Couvert, P. *et al.* Association between a frequent allele of the gene encoding OATP1B1 and enhanced LDL-lowering response to fluvastatin therapy. *Pharmacogenomics.* 9, 1217-1227 (2008).
30. Letschert, K., Keppler, D. & König, J. Mutations in the SLCO1B3 gene affecting the substrate specificity of the hepatocellular uptake transporter OATP1B3 (OATP8). *Pharmacogenetics.* 14, 441-452 (2004).

31. Pasanen, M.K., Neuvonen, P.J. & Niemi, M. Global analysis of genetic variation in SLCO1B1. *Pharmacogenomics*. 9, 19-33 (2008).
  
32. Tomlinson, B., Chan, P. & Lan, W. How well tolerated are lipid-lowering drugs? *Drugs. Aging*. 18, 665-683 (2001).
  
33. Armitage, J. The safety of statins in clinical practice. *Lancet*. 370, 1781-1790 (2007).
  
34. Fiegenbaum, M. *et al.* The role of common variants of ABCB1, CYP3A4, and CYP3A5 genes in lipid-lowering efficacy and safety of simvastatin treatment. *Clin. Pharmacol. Ther.* 78, 551-558 (2005).
  
35. Friedewald, W.T., Levy, R.I. & Fredrickson, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18, 499-502 (1972).
  
36. Lahiri, D.K. & Nurnberger, J.I.Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic. Acids. Res.* 19, 5444 (1991).
  
37. Long, J.C., Williams, R.C. & Urbanek, M. An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 799-810 (1995).



Table 1 Main characteristics of patients

Characteristics	Non-ADR group	ADR group
N°	137	24
Age (y)	60.9 ± 11.72	61.8 ± 9.13
Sex (% male)	30.2	16.7
Smoking		
Never (%)	79.1	79.2
Past (%)	7.9	0
Current (%)	12.2	20.8
Family history of CHD (%)	18.0	37.5
Hypertension (%)	61.2	79.2
Diabetes (%)	17.3	12.5
Postmenopausal (%)	83.4	95.0
Hormone therapy use (%)	16.3	25.0
Glucose (mmol/L)	5.33 ± 0.89	5.34 ± 0.70
Concomitant therapies		
ACE inhibitor (%)	27.3	39.2
β-Blocker (%)	34.5	33.3
Calcium channel blocker (%)	15.1	16.7
Diuretics (%)	28.8	41.7

Values for age and glucose levels are expressed as mean ± SD.

ADR, adverse drug reaction; CHD, coronary heart disease; ACE, angiotensin-converting enzyme.

Table 2 Baseline and lipid and lipoprotein levels for patients after 6-month posttreatment and baseline and lipid levels for patients with development of ADRs

	Non-ADR group (n = 137)		ADR group (n = 24)
	Baseline	Treatment	
Total cholesterol (mmol/L)	6.76 ± 1.08	4.83 ± 0.91	6.62 ± 1.22
HDL cholesterol (mmol/L)	1.29 ± 0.32	1.28 ± 0.29	1.36 ± 0.26
LDL cholesterol (mmol/L)	4.65 ± 0.95	2.85 ± 0.75	4.35 ± 1.06
Triglycerides (mmol/L)	1.80 ± 1.01	1.52 ± 0.72	1.99 ± 0.66

Values are expressed as mean ± SD.

HDL, high-density lipoprotein; LDL, Low-density lipoprotein

Table 3 Mean change (percent) in lipid and lipoprotein levels after simvastatin treatment according to SLCO1B1 polymorphisms

	Genotypes			<i>P</i> value
	11	12	22	
				11 x (12 + 22)*
388A>G	AA (n = 38)	AG (n = 67)	GG (n = 32)	
Total cholesterol	-22.8 ± 17.8	-29.2 ± 10.7	-27.1 ± 13.9	0.013
LDL cholesterol	-29.7 ± 23.5	-39.0 ± 14.5	-36.0 ± 21.0	0.011
HDL cholesterol	3.2 ± 23.7	3.5 ± 27.1	3.0 ± 26.8	0.879
Triglycerides	-4.9 ± 5.8	-5.8 ± 4.1	-8.3 ± 6.1	0.664
463C>A	CC (n = 101)	CA (n = 34)	AA (n = 2)	
Total cholesterol	-26.2 ± 1.2	-28.6 ± 2.2	-35.5 ± 9.1	0.272
LDL cholesterol	-34.5 ± 1.7	-38.8 ± 3.0	-47.7 ± 12.3	0.153
HDL cholesterol	2.7 ± 2.1	5.1 ± 3.6	2.9 ± 15.2	0.580
Triglycerides	-7.8 ± 3.3	-2.3 ± 5.7	-8.6 ± 23.8	0.694
521T>C	TT (n = 90)	TC (n = 41)	CC (n = 6)	
Total cholesterol	-26.5 ± 1.3	-28.0 ± 2.0	-26.1 ± 5.4	0.619
LDL cholesterol	-35.8 ± 1.8	-36.4 ± 2.7	-31.7 ± 7.3	0.987
HDL cholesterol	5.2 ± 2.2	0.1 ± 3.3	-1.9 ± 8.9	0.177
Triglycerides	-3.2 ± 3.5	-11.2 ± 5.2	-14.8 ± 13.9	0.217

Values are expressed as mean ± SD.

\*G carriers versus AA for 388A>G SNP, A carriers versus CC for 463C>A SNP, and

C carriers versus TT for 521T>C SNP

Table 4 Frequency of SNP haplotypes from SLCO1B1 and SLCO1B3 genes found in the study population

Gene	SNP			Haplotype	Frequency
SLCO1B1	388A>G	463C>A	521T>C		
	A	C	T	SLCO1B1*1a	0.5072
	G	C	T	SLCO1B1*1b	0.1737
	A	C	C	SLCO1B1*5	0.0295
	G	A	T	SLCO1B1*14	0.1318
	G	C	C	SLCO1B1*15	0.1575
SLCO1B3	334T>G	699G>A			
	T	G			0.1625
	G	A			0.8374

Table 5 Mean change (percent) in lipid and lipoprotein levels after simvastatin treatment according to SLCO1B1 haplotypes

	Haplotypes				ANOVA	P value					
	1	2	3	4		1 x 2	1 x 3	1 x 4	2 x 3	2x 4	3 x 4
	*1a (n = 34) <sup>a</sup>	*1b (n = 27) <sup>a</sup>	*14 (n = 23) <sup>a</sup>	*15 (n = 28) <sup>a</sup>							
Total cholesterol	-22.1 ± 1.3	-29.6 ± 2.5	-29.3 ± 2.7	-29.9 ± 2.4	0.073						
LDL cholesterol	-28.8 ± 8.4	-40.8 ± 3.4	-40.6 ± 3.7	-37.4 ± 3.3	0.049	0.016	0.019	0.065	0.966	0.496	0.535
HDL cholesterol	3.1 ± 3.8	5.0 ± 4.3	7.8 ± 4.4	-0.3 ± 4.0	0.577						
Triglycerides	-4.2 ± 6.4	-4.5 ± 7.1	2.7 ± 7.3	-15.3 ± 6.6	0.516						

Values are expressed as mean ± SD.

<sup>a</sup> haplotype \*1a = \*1a/\*1a carriers; haplotype \*1b = \*1a/\*1b and \*1b/\*1b carriers; haplotype \*14 = \*1a/\*14 and \*14/\*14 carriers; and haplotype \*15 = \*1a/\*15 and 15\*/\*15 carriers.

Table 6 Mean change (percent) in lipid and lipoprotein levels before and after simvastatin treatment according to SLCO1B3 haplotypes

	Haplotypes			<i>P</i> value
	334T>G + 699G>A T+G/ T+G (n = 5)	T+G/G+A (n = 30)	G+A/G+A (n = 102)	
Total cholesterol	-27.2 ± 5.8	-26.1 ± 2.3	-27.2 ± 1.2	0.932
LDL cholesterol	-44.3 ± 7.9	-34.1 ± 3.2	-35.8 ± 1.7	0.487
HDL cholesterol	-7.8 ± 10.7	4.8 ± 3.9	3.3 ± 2.1	0.544
Triglycerides	14.5 ± 16.6	-15.3 ± 6.1	-4.3 ± 3.2	0.101

Values are expressed as mean ± SD.

Table 7 Genotype and allele frequencies of SNPs in non-ADR group an ADR-group

SNP	Genotypes			Alleles	
	AA	AG	GG	A	G
SLCO1B1 388A>G					
Non-ADR group	10 (26.3%)	22 (57.9%)	6 (15.8%)	55.3%	44.7%
ADR-group	9 (37.5%)	10 (41.7%)	5 (20.8%)	58.4%	41.6%
<i>P</i> value		0.458			0.814
SLCO1B1 463C>A					
Non-ADR group	26 (68.4%)	12 (31.6%)	0 (0%)	84.2%	15.8%
ADR-group	19 (79.2%)	5 (20.8%)	0 (0%)	89.6%	10.4%
<i>P</i> value		0.266			0.722
SLCO1B1 521T>C					
Non-ADR group	28 (73.7%)	9 (23.7%)	1 (2.6%)	85.5%	14.5%
ADR-group	16 (66.7%)	8 (33.3%)	0 (0%)	83.4%	16.6%
<i>P</i> value		0.540			0.928

SLCO1B3 334T>G/699G>A	T+G/T+G	T+G/G+A	G+A/G+A	T+G	G+A
Non-ADR group	2 (5.3%)	10 (26.3%)	26 (68.4%)	18.4%	81.6%
ADR-group	3 (12.5%)	5 (20.8%)	16 (66.7%)	22.9%	77.1%
<i>P</i> value		0.564		0.539	



**CAPÍTULO 4**  
**DISCUSSÃO**

---

A discussão específica dos resultados encontrados no presente trabalho encontra-se no artigo apresentado no capítulo 3 dessa dissertação. No presente capítulo, serão discutidos de modo mais geral as peculiaridades dos estudos farmacogenéticos dos OATPs, visando uma melhor compreensão do papel desses transportadores nos estudos farmacogenéticos dos inibidores da HMG CoA redutase.

O nosso trabalho demonstrou que variantes do gene *SLCO1B1* podem influenciar na eficácia ao tratamento com o inibidor do HMG CoA redutase sinvastatina. Atualmente, encontramos na literatura diversos trabalhos com resultados conflitantes em relação as variantes funcionais do *OATP1B1*. Muitas vezes, variantes desse transportador apresentam um efeito acentuado em estudos farmacocinéticos, mas os mesmos resultados não são replicados em estudos que avaliam a resposta ao fármaco.

Em nosso trabalho encontramos uma forte associação entre o polimorfismo funcional 388A>G do gene *SLCO1B1* e a eficácia da sinvastatina. Os portadores do alelo 388G apresentam redução maior nos níveis de colesterol total e LDL colesterol comparados aos portadores do alelo selvagem após o tratamento. Trabalhos de farmacocinética demonstraram que o alelo 388G propicia uma captação mais efetiva da pravastina pelo *OATP1B1* (Mwinyi *et al.*, 2004, Maeda *et al.*, 2006); entretanto, esse efeito ainda não tinha sido observado na resposta ao tratamento com sinvastatina.

Diferentes trabalhos demonstraram que o polimorfismo funcional 521T>C do gene *SLCO1B1* altera a farmacocinética da pravastatina (Nishizato *et al.*, 2003; Mwinyi *et al.*, 2004; Niemi *et al.*, 2004). Segundo esses trabalhos, os portadores do alelo 521C apresentam uma concentração plasmática aumentada do fármaco, indicando uma menor captação desse pelo *OATP1B1*, aumentando a biodisponibilidade do fármaco e possibilitando o aparecimento de efeitos adversos. Entretanto, a investigação desse

polimorfismo na resposta ao tratamento com pravastatina apresenta resultados conflitantes sobre a redução na eficácia desse fármaco (Niemi *et al.*, 2005; Igel *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007). Na mesma direção que os estudos farmacocinéticos realizados com a pravastatina, a influência do SNP 521T>C na farmacocinética da sinvastatina foi demonstrada por Pasanen *et al.* (2006a); entretanto em nosso trabalho não foi encontrada uma associação entre esse polimorfismo e a eficácia da sinvastatina.

Os polimorfismos 388A>G e 521T>C estão em desequilíbrio de ligação, e os trabalhos relatados na literatura apontam que os alelos 388G e 521C possuem efeitos inversos na captação das estatinas. Em nosso trabalho, constatamos um efeito principalmente do alelo 388G nos haplótipos SLCO1B1\*1b e SLCO1B1\*14, levando a uma resposta mais acentuada ao tratamento com sinvastatina.

A resposta à utilização de um fármaco é multifatorial e depende da interação de diversos genes que atuam na absorção, metabolização e excreção desse fármaco, dificultando a interpretação da ação das variantes de um gene nos estudos farmacogenéticos. Fatores importantes, como a população estudada, o substrato e a sua dose utilizada, também podem representar diferenças nos resultados dos estudos farmacogenéticos dos OATPs. A distribuição alélica das variantes genéticas dos OATPs diferem entre as populações de ancestralidades européia, africana e asiática, moldando a formação haplotípica desses polimorfismos nessas populações (Pasanen *et al.*, 2008). Divergências entre os resultados nos estudos da eficácia de estatinas podem refletir as diferenças haplotípicas entre as populações dos diferentes genes envolvidos na farmacocinética e farmacodinâmica desses medicamentos. Os estudos do conjunto de genes de interesse farmacogenômico em diferentes populações contribuem para o aumento

de dados relevantes para entendimento da importância dos haplótipos de genes como o *SLCO1B1* para a eficácia e segurança das estatinas.

As estatinas possuem características distintas em relação a sua forma de administração, absorção, hidrofobicidade, biodisponibilidade, metabolização e excreção, o que pode afetar a sua afinidade com os transportadores celulares como os OATPs. Essas diferenças podem ser refletidas nos resultados conflitantes encontrados nos estudos que avaliam a influência das variantes dos OATPs na farmacocinética e na resposta a esses medicamentos (Niemi, 2007). A eficácia da pravastatina parece estar associada com o SNP 521T>C (Niemi *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007), a eficácia da fluvastatina foi recentemente associada ao SNP 463C>A (Couvert *et al.*, 2008), e a eficácia da sinvastatina está associada com o SNP 388A>G, de acordo com o presente trabalho. O quanto essas diferenças nas respostas aos tratamentos desses fármacos são devidas as suas propriedades físico-químicas ainda precisa ser determinado.

Como uma classe de medicamentos, as estatinas são bem aceitas e efeitos adversos são raramente observados. Embora a farmacogenética dos efeitos adversos relacionados com as estatinas seja de grande interesse, estudos de associação entre os polimorfismos em genes de metabolização e transportadores somente agora estão sendo realizados. Entre os fatores de risco para os efeitos adversos, incluem-se as doses de estatina, no entanto, os trabalhos publicados utilizam diferentes dosagens, diferentes estatinas, bem como incluem pacientes que utilizam outras medicações que podem inibir as enzimas de metabolização, o que também aumenta os níveis de estatina circulante. Todos esses fatores, tomados em conjunto, podem explicar os resultados conflitantes entre diferentes publicações. Atualmente, diversos estudos estão avaliando a eficácia e a segurança da utilização de doses altas de estatinas para a obtenção de uma resposta mais eficaz na redução nos níveis

de colesterol (Armitage, 2007), sendo importante o estudo de variantes genéticas na incidência de efeitos adversos. Recentemente, uma investigação realizada pelo “Study of the Effectiveness of Additional Reductions in Cholesterol and Homocysteine” (SEARCH) collaborative group (2008) demonstrou a associação do polimorfismo 521T>C no gene SLCO1B1, com a incidência de miopatia. Esse estudo demonstrou uma forte associação do alelo 521C com a incidência de miopatia em pacientes que utilizaram diariamente 80 mg de sinvastatina. A incidência de miopatia entre pacientes que utilizam uma dose diária padrão de sinvastatina (20 e 40 mg) é aproximadamente 1 para cada 10.000 pacientes em tratamento (Armitage, 2007). Em nosso estudo, nenhum paciente apresentou miopatia, os pacientes apresentaram como efeito adverso principalmente a mialgia. O polimorfismo 521T>C não demonstrou estar associado com os efeitos adversos apresentados pelos pacientes no presente trabalho.

Os polimorfismos 334T>G and 699G>A do gene SLCO1B3 não apresentaram influência na eficácia e segurança do tratamento com sinvastatina. Apesar desses polimorfismos estarem relacionados com a biodisponibilidade do imunossupressor micofenolato de mofetila (Miura *et al.* 2008), eles não possuem um papel importante na captação da sinvastatina. O OATP1B3 possui grande sobreposição de substratos com o OATP1B1 e talvez não seja o transportador preferencial das estatinas, e, por isso, os polimorfismos desse transportador não possuam relevância para a captação das estatinas. Entretanto, somente mais estudos de variantes do gene SLCO1B3 poderão esclarecer sua importância para a farmacogenética dos inibidores de HMG CoA redutase.

As pesquisas realizadas até o presente momento indicam que os polimorfismos no gene SLCO1B1 influenciam tanto a eficácia quanto a segurança das estatinas. Porém, diferentes polimorfismos parecem ter relevâncias distintas em relação à resposta ao

tratamento das diversas estatinas. Futuramente, os trabalhos em farmacogenética dos inibidores de HMG CoA redutase deverão concentrar os esforços na análise conjunta dos genes relacionados com a metabolização e transporte de cada um desses fármacos em diferentes populações. Somente através desses estudos poderemos elucidar a real importância desses genes na eficácia e segurança de cada estatina, possibilitando, talvez, um importante avanço para o tratamento e prevenção das doenças cardiovasculares.

.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

4S (1994) Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) *Lancet* 344:1383-1389.

Abe T, Kalyo M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Nakai D, Nomura H, Unno M, Suzuki, M, Naitoh T *et al.* (1999) Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J Biol Chem* 274:17159-17163.

Armitage J (2007) The safety of statins in clinical practice. *Lancet* 370:1781-1790.

Azambuja MI, Foppa M, Maranhão MF and Achutti AC (2008) Economic burden of severe cardiovascular diseases in Brazil: an estimate based on secondary data. *Arq Bras Cardiol* 91:163-71.

Baer AN and Wortmann RL (2007) Myotoxicity associated with lipid-lowering drugs. *Curr Opin Rheumatol* 19:67-73.

Ballantyne CM, Herd JA, Stein EA, Ferlic LL, Dunn JK, Gotto AM Jr and Marian AJ (2000) Apolipoprotein E genotypes and response of plasma lipids progression-regression of coronary atherosclerosis to lipid-lowering drug therapy. *J Am Coll Crdiol* 36:1572-1578.

Ballantyne CM, Corsini A, Davidson MH, Holdaas H, Jacobson TA, Leitersdorf E, Marz W, Reckless JP and Stein EA (2003) Risk for myopathy with statin therapy in high-risk patients. *Arch Intern Med* 163:553-564.

Beaird SL (2000) HMG-CoA reductase inhibitors: assessing differences in drug interactions and safety profiles. *J Am Pharm Assoc* 40:637-644.

Bhatnagar D (1998) Lipid-lowering drugs in the management of hyperlipidaemia. *Pharmacol Ther* 79: 205-230.

Böger RH (2001) Drug interactions of the statins and consequences for drug selection. *Int J Clin Pharmacol Ther* 39:369-382.

Bossuyt X, Müller M, Hagenbuch B and Meier PJ (1996) Polyspecific drug and steroid clearance by an organic anion transporter of mammalian liver. *J Pharmacol Exp Ther* 276:891-896.

Bottorff MB (2006) Statin Safety and Drug Interactions: Clinical Implications. *Am J Cardiol* 97:27C-31C.

Carlquist JF, Muhlestein JB, Horne BD, Hart NI, Bair TL, Molhuizen HO and Anderson JL (2003) The cholesteryl ester transfer protein Taq1B gene polymorphism predicts clinical benefit of statin therapy in patients with significant coronary artery disease. *Am Heart J* 146:1007-1014.



Charlton-Menys V and Durrington PN. (2007) Squalene synthase inhibitors: clinical pharmacology and cholesterol-lowering potential. *Drugs* 67:11-16.

Chasman DI, Posada D, Subrahmanyam L, Cook NR, Stanton VP and Ridker PM (2004) Pharmacogenetic study of statin therapy and cholesterol reduction. *JAMA* 291:2821-2827.

Christians U, Jacobsen W and Floren LC (1998) Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in transplant patients: are the statins mechanistically similar? *Pharmacol Ther* 80:1-34.

Christopher-Stine L (2006) Statin myopathy: an update. *Curr Opin Rheumatol* 18:647-653.

Chung JY, Cho JY, Yu KS, Kim JR, Oh DS, Jung HR, Lim KS, Moon KH, Shin SG and Jang IJ (2005) Effect of OATP1B1 (SLCO1B1) variant alleles on the pharmacokinetics of pitavastatin in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 78:342-350.

Couvert P, Giral P, Dejager S, Gu J, Huby T, Chapman MJ, Bruckert E and Carrié A (2008) Association between a frequent allele of the gene encoding OATP1B1 and enhanced LDL-lowering response to fluvastatin therapy. *Pharmacogenomics* 9:1217-1227.

de Souza MF, Alencar AP, Malta DC, Moura L and Mansur AP (2006) Serial temporal analysis of ischemic heart disease and stroke death risk in five regions of Brazil from 1981 to 2001. *Arq Bras Cardiol* 87:735-740.

Endres CJ, Hsiao P, Chung FS and Unadkat JD (2006) The role of transporters in drug interactions. *Eur J Pharm Sci* 27:501-517.

Fiegenbaum M, Silveira FR, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira MEW, Pires RC and Hutz MH (2005a) Pharmacogenetic study of apolipoprotein E, cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase genes and simvastatin therapy in Brazilian subjects. *Clin Chim Acta* 362:182-188.

Fiegenbaum M, Silveira FR, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira MEW, Pires RC and Hutz MH (2005b) Determinants of variable response to simvastatin treatment: the role of common variants of SCAP, SREBF-1a and SREBF-2 genes. *Pharmacogenomics J* 5:359-364.

Fiegenbaum M, da Silveira FR, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira ME, Pires RC and Hutz MH (2005c) The role of common variants of ABCB1, CYP3A4, and CYP3A5 genes in lipid-lowering efficacy and safety of simvastatin treatment. *Clin Pharmacol Ther* 78:551-558.

Freeman DJ, Samani NJ, Wilson V, McMahon AD, Braund PS, Cheng S, Caslake MJ, Packard CJ and Gaffney D (2003) A polymorphism of the cholesteryl ester transfer protein gene predicts cardiovascular events in non-smokers in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Eur Heart J* 24:1833-1842.

Friesema EC, Docter R, Moerings EP, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ, Krenning EP, Hennemann G and Visser TJ (1999) Identification of thyroid hormone transporters. *Biochem Biophys Res Commun* 254:497-501.

Goldstein JL and Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343:425-430.

Gotto AM (2001) Statin therapy: where are we? Where do we go next? *Am J Cardiol* 87:13B-18B.

Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB Jr, Clark LT, Hunninghake DB, Pasternak RC, Smith SC Jr and Stone NJ; Coordinating Committee of the National Cholesterol Education Program (2004) Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 44:720-732.

Guyton JR (2006) Benefit versus Risk in Statin Treatment. *Am J Cardiol* 97:95C-97C.

Hagenbuch B and Gui C (2008) Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica* 38:778-801.

Hagenbuch B and Meier PJ (2003) The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochem Biophys Acta* 1609:1-18.

Hagenbuch B and Meier PJ (2004) Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 447: 465-468.

Hamilton-Craig I (2001) Statin-associated myopathy. *Med J Aust* 175:486-489.

Heart Protective Study Collaborative Group (2002) MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 360:7-22.

Hedman M, Antikainen M, Holmberg C, Neuvonen M, Eichelbaum M, Kivistö KT, Neuvonen PJ and Niemi M (2006) Pharmacokinetics and response to pravastatin in paediatric patients with familial hypercholesterolaemia and in paediatric cardiac transplant recipients in relation to polymorphisms of the SLCO1B1 and ABCB1 genes. *Br J Clin Pharmacol* 61:706-715.

Hirano M, Maeda K, Shitara Y and Sugiyama Y (2004) Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the hepatic uptake of pitavastatin in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 311:139-146.

Hirano M, Maeda K, Shitara Y and Sugiyama Y (2006) Drug-drug interaction between pitavastatin and various drugs via OATP1B1. *Drug Metab Dispos* 34:1229-1236.

Ho RH, Tirona RG, Leake BF, Glaeser H, Lee W, Lemke CJ, Wang Y and Kim RB (2006) Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression, and pharmacogenetics. *Gastroenterology* 130:1793-1806.

Ho RH and Kim RB (2005) Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and diseases. *Clin Pharmacol Ther* 78:551-558.

Hsing B, Zhu Y, Wang Z, Wu Y, Sasseville V, Yang WP and Kirchgessner TG (1999) A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. *J Biol Chem* 274:37161-37168.

Hutz MH and Fiegenbaum M (2008) Impact of genetic polymorphisms on the efficacy of HMG-CoA reductase inhibitors. *Am J Cardiovasc Drugs* 8:161-170.

Igel M, Sudhop T and von Bergmann K (2001) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109:1125-1131.

Igel M, Arnold KA, Niemi M, Hofmann U, Schwab M, Lütjohann D, von Bergmann K, Eichelbaum M and Kivistö KT (2006) Impact of the SLCO1B1 polymorphism on the pharmacokinetics and lipid-lowering efficacy of multiple-dose pravastatin. *Clin Pharmacol Ther* 79:419-426.

Iida A, Saito S, Sekine A, Mishima C, Kondo K, Kitamura Y, Harigae S, Osawa S and Nakamura Y (2001) Catalog of 258 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes encoding three organic anion transporters, three organic anion-transporting polypeptides, and three NADH:ubiquinone oxidoreductase flavoproteins. *J Hum Genet* 46:668-683.

Iwai M, Suzuki H, Ieiri I, Otsubo K and Sugiyama Y (2004) Functional analysis of single nucleotide polymorphisms of hepatic organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C). *Pharmacogenetics* 14:749-757.

Jacobson TA (2006) The Safety of Aggressive Statin Therapy: How Much Can Low-Density Lipoprotein Cholesterol Be Lowered? *Mayo Clin Proc* 81:1225-1231.

Kajinami K, Brousseau ME, Ordovas JM and Schaefer EJ (2004a) Interactions between common genetic polymorphisms in ABCG5/8 and CYP7A1 on LDL cholesterol-lowering response to atorvastatin. *Atherosclerosis* 175:287-293.

Kajinami K, Brousseau ME, Ordovas JM and Schaefer EJ (2004b) CYP3A4 genotypes and plasma lipoprotein levels before and after treatment with atorvastatin in primary hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 93:104-107.

Kameyama Y, Yamashita K, Kobayashi K, Hosokawa M and Chiba K (2005) Functional characterization of SLCO1B1 (OATP-C) variants, SLCO1B1\*5, SLCO1B1\*15 and SLCO1B1\*15+C1007G, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells. *Pharmacogenet Genomics* 15:513-522.

Kitamura S, Maeda K, Wang Y and Sugiyama Y (2008) Involvement of multiple transporters in the hepatobiliary transport of rosuvastatin. *Drug Metab Dispos* 36:2014-2023.

König J, Cui Y, Nies AT and Keppler D (2000) A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278:G156-164.

König J, Seithel A, Gradhand U and Fromm MF (2006) Pharmacogenomics of human OATP transporters. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 372: 432-443.

Kopplow K, Letschert K, König J, Walter B and Keppler D (2005) Human hepatobiliary transport of organic anions analyzed by quadruple-transfected cells. *Mol Pharmacol* 68:1031–1038.

Kostis JB (2007) The Importance of Managing Hypertension and Dyslipidemia to Decrease Cardiovascular Disease. *Cardiovasc Drugs Ther* 21:297-309.

Kreisberg RA and Oberman A (2002) Lipids and atherosclerosis: lessons learned from randomized controlled trials on lipid lowering and other relevant studies. *J Clin Endocrinol Metab* 87:423-437.

Kuivenhoven JA, de Kiff P, Boer JM, Smalheer HA, Botma GJ, Seidell JC, Kastelein JJ and Pritchard PH (1997) Heterogeneity at the CETP genes locus: influence on plasma

CETP concentrations and HDL cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:560-568.

Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Stieger B, Schteingart CD, Hofmann AF, Wolkoff AW and Meier PJ (1995) Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. *Gastroenterology* 109:1274-1282.

Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ and Hagenbuch B (2001) Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 120:525-533.

Law M and Rudnicka AR (2006) Statin Safety: A Systematic Review. *Am J Cardiol* 97:52C-60C.

Lee E, Ryan S, Birmingham B, Zalikowski J, March R, Ambrose H, Moore R, Lee C, Chen Y and Schneck D (2005) Rosuvastatin pharmacokinetics and pharmacogenetics in white and Asian subjects residing in the same environment. *Clin Pharmacol Ther* 78:330-341

Letschert K, Keppler D and König J (2004) Mutations in the SLCO1B3 gene affecting the substrate specificity of the hepatocellular uptake transporter OATP1B3 (OATP8). *Pharmacogenetics* 14:441-452.



Mansur AP, Favarato D, Souza MFM, Avakian SD, Aldrighi JM, César LAM and Ramires JAF (2001) Trends in death from circulatory diseases in Brazil between 1979 and 1996. *Arq Bras Cardiol* 76:504-510.

Mata P, Alonso R and Badimón JJ (2003) Benefits and Risks of Simvastatin in Patients with Familial Hypercholesterolaemia. *Drug Saf* 26:769-786.

Mauro VF (1993) Clinical Pharmacokinetics and practical applications of simvastatin. *Clin Pharmacokinet* 24:195-202.

McKenney JM, Davidson MH, Jacobson TA and Guyton JR (2006) Final Conclusions and Recommendations of the National Lipid Association Statin Safety Assessment Task Force. *Am J Cardiol* 97:89C-94C.

Meier PJ, Eckhardt U, Schroeder A, Hagenbuch B and Stieger B (1997) Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology* 26:1667-1677.

Michalski C, Cui Y, Nies AT, Nussler AK, Neuhaus P, Zanger UM, Klein K, Eichelbaum M, Keppler D and König J (2002) A naturally occurring mutation in SLC21A6 gene causing impaired membrane localisation of the hepatocyte uptake transporter. *J Biol Chem* 277:43058-43063.

Mikkaichi T, Suzuki T, Tanemoto M, Ito S and Abe T (2004) The organic anion transporter (OATP) family. *Drug Metab Pharmacokinet* 19:171-179.

Ministério da Saúde, Departamento de Informática do SUS (DATASUS), <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obtuf.def> (15 de julho, 2007).

Miura M, Satoh S, Inoue K, Saito M, Habuchi T and Suzuki T (2008) Telmisartan pharmacokinetics in Japanese renal transplant recipients. *Clin Chim Acta* DOI:10.1016/j.cca.2008.09.020

Mwinyi J, Johne A, Bauher S, Roots I and Gerloff T (2004) Evidence for inverse effects of OATP-C (SLC1A6) 5 and 1b haplotypes on pravastatin kinetics. *Clin Pharmacol Ther* 75:415-421.

Nakai D, Nakagomi R, Furuta Y, Tokui T, Abe T, Ikeda T and Nishimura K (2001) Human liver-specific organic anion transporter, LST-1, mediates uptake of pravastatin by human hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 297:861-867.

Niemi M (2007) Role of OATP transporters in the disposition of drugs. *Pharmacogenomics* 8:787-802.

Niemi M, Schaeffeler E, Lang T, Fromm MF, Neuvonen M, Kyrklund C, Backman JT, Kerb R, Schwab M, Neuvonen PJ *et al.* (2004) High plasma pravastatin concentrations are

associated with single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide-C (OATP-C, SLCO1B1). *Pharmacogenetics* 14:429-440.

Niemi M, Neuvonen PJ, Hofmann U, Backman JT, Schwab M, Lütjohann D, von Bergmann K, Eichelbaum M and Kivistö KT (2005) Acute effects of pravastatin on cholesterol synthesis are associated with SLCO1B1 (encoding OATP1B1) haplotype \*17. *Pharmacogenet Genomics* 15:303-309.

Nishizato Y, Leiri I, Suzuki H, Kimura M, Kawabata K, Hirota T, Takane H, Irie S, Kusuhara H, Urasaki Y *et al.* (2003) Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 73:554-565.

Nozawa T, Nakajima M, Tamai I, Noda K, Nezu J, Sai I, Tsuji A and Yohoi T (2002) Genetic polymorphisms of human organic anion transporters OATP-C (SLC21A6) and OATP-B (SLC1A9): allele frequencies in the Japanese population and functional analysis. *J Pharmacol Exp Ther* 302:804-813.

Nozawa T, Minami H, Sugiura S, Tsuji A and Tamai I (2005) Role of organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: in vitro evidence and effect of single nucleotide polymorphisms. *Drug Metab Dispos* 33:434-439.

Oliveira GM, Klein CH and Souza e Silva NA (2006) Mortalidade por doenças cardiovasculares em três estados do Brasil de 1980 a 2002. *Pan Am J Public Health* 19:85-93.

Omar JM, Wilson JP and Cox TS (2001) Rhabdomyolysis and HMG-Coa reductase inhibitors. *Ann Pharmacother* 35:1096-1107.

Pasanen MK, Neuvonen M, Neuvonen PJ and Niemi M (2006a) SLCO1B1 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of simvastatin acid. *Pharmacogenet Genomics* 16:873-879.

Pasanen MK, Backman JT, Neuvonen PJ and Niemi M (2006b) Frequencies of single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide 1B1 SLCO1B1 gene in a Finnish population. *Eur J Clin Pharmacol* 62: 409-415.

Pasanen MK, Fredrikson H, Neuvonen PJ and Niemi M (2007) Different effects of SLCO1B1 polymorphism on the pharmacokinetics of atorvastatin and rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther* 82:726-733.

Pasanen MK, Neuvonen PJ and Niemi M (2008) Global analysis of genetic variation in SLCO1B1. *Pharmacogenomics* 9:19-33.

Pazzucconi F, Dorigotti F, Gianfranceschi G, Campagnoli G, Sirtori M, Franceschini G and Sirtori CR (1995) Therapy with HMG CoA reductase inhibitors: characteristics of the long-term permanence of hypocholesterolemic activity *Atherosclerosis* 117:189-198.

Pedro-botet J, Schaefer EJ, Bakker-Arema RG, Black DM, Stein EM, Corella D and Ordovas JM (2001) Apolipoprotein E genotype affects plasma lipid response to atorvastatin in a gender specific manner. *Atherosclerosis* 158:183-193.

Pena R, Lahoz C, Mostaza JM, Jimenez J, Subirats E, Pinto X, Taboada M and Lopez-Pastor A (2002) Effect of apoe genotype on the hypolipidaemic response to pravastatin in an out patient setting. *J Intern Med* 251:518-525.

Plosker GL and McTavish D (1995) Simvastatin. A reappraisal of its pharmacology and therapeutic efficacy in hypercholesterolaemia. *Drugs* 50:334-363.

Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Ho M, Howard V, Kissela B *et al.* (2007) Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 115:69-171.

Salek L, Lutucuta S, Ballantyne CM, Gotto AM and Marian AJ (2002) Effects of SREBP-1a and SCAP polymorphisms on plasma lipid levels, severity, progression and regression of coronary atherosclerosis and response to therapy with fluvastatin. *J Mol Med* 80:737-744.

Schneck DW, Birmingham BK, Zalikowski JA, Mitchell PD, Wang Y, Martin PD, Lasseter KC, Brown CD, Windass AS and Raza A (2004) The effect of gemfibrozil on the pharmacokinetics of rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther* 75:455-463.

SEARCH Collaborative Group, Link E, Parish S, Armitage J, Bowman L, Heath S, Matsuda F, Gut I, Lathrop M, Collins R *et al.* (2008) SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy--a genomewide study. *N Engl J Med* 359:789-799.

Seithel A, Eberl S, Singer K, Auge D, Heinkele G, Wolf NB, Dörje F, Fromm MF and König J (2007) The influence of macrolide antibiotics on the uptake of organic anions and drugs mediated by OATP1B1 and OATP1B3. *Drug Metab Dispos* 35:779-786.

Seithel A, Glaeser H, Fromm MF and König J (2008) The functional consequences of genetic variations in transporter genes encoding human organic anion-transporting polypeptide family members. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4:51-64.

Shitara Y, Itoh T, Sato H, Li AP and Sugiyama Y (2003) Inhibition of transporter-mediated hepatic uptake as a mechanism for drug-drug interaction between cerivastatin and cyclosporin A. *J Pharmacol Exp Ther* 304:610-616.

Smith NF, Figg WD and Sparreboom A (2005) Role of the liver-specific transporters OATP1B1 and OATP1B3 in governing drug elimination. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 1:429-445.

Smith NF, Marsh S, Scott-Horton TJ, Hamada A, Mielke S, Mross K, Figg WD, Verweij J, McLeod HL and Sparreboom A (2007) Variants in the SLCO1B3 gene: interethnic distribution and association with paclitaxel pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 81:76-82.

Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FA, Bertolami MC, Afiune Neto A, Souza AD, Lottenberg AM, Chacra AP, Faludi AA, Loures-Vale AA *et al.* (2007) IV diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose departamento de aterosclerose da sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol* 88:2-19.

Tachibana-Iimori R, Tabara Y, Kusuhara H, Kohara K, Kawamoto R, Nakura J, Tokunaga K, Kondo I, Sugiyama Y and Miki T (2004) Effect of genetic polymorphism of OATP-C (SLCO1B1) on lipid-lowering response to HMG-CoA reductase inhibitors. *Drug Metab Pharmacokinet* 19:375-380.

Tamai I, Nezu J, Uchino H, Sai Y, Oku A, Shimane M and Tsuji A (2000) Polymorphisms in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European- and African-Americans. *J Biol Chem* 276:35669-35675.

Tirona RG, Leake BF, Merino G and Kim RB (2001) Polymorphisms in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European- and African-Americans. *J Biol Chem* 276:35669-35675.

Tirona RG, Leake BF, Wolkoff AW and Kim RB (2003) Human organic anion transporting polypeptide-C (SLC21A6) is a major determinant of rifampin-mediated pregnane X receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther* 304:223-228.

Tomlinson B, Chan P and Lan W (2001) How well tolerated are lipid-lowering drugs? *Drugs Aging* 18:665-683.

Trancon C, Leemann T and Dayer P (1996) In vitro comparative inhibition profiles of major human drug metabolising cytochrome P450 isoenzymes (CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4) by HMG-Coa reductase inhibitors. *Eur J Clin Pharmacol* 50:209-215.

Tsujimoto M, Hirata S, Dan Y, Ohtani H and Sawada Y (2006) Polymorphisms and linkage disequilibrium of the OATP8 (OATP1B3) gene in Japanese subjects. *Drug Met Pharmacokinet* 21:165-169.

Tunstall-Pedoe H, Vanuzzo D, Hobbs M, Mähönen M, Cepaitis Z, Kuulasmaa K and Keil U (2000) Estimation of contribution of changes in coronary care to improving survival, event rates, and coronary heart disease mortality across the WHO MONICA Project populations. *Lancet* 355:688-700.

van Montfoort JE, Hagenbuch B, Fattinger KE, Müller M, Groothuis GM, Meijer DK and Meier PJ (1999) Polyspecific organic anion transporting polypeptides mediate hepatic uptake of amphipathic type II organic cations. *J Pharmacol Exp Ther* 291:147-152.



van Venrooij FV, Stolk RP, Banga JD, Sijmonsma TP, van Tol A, Erkelens DW and Dallinga-Thie GM; DALI Study Group (2003) Common cholesteryl ester transfer protein gene polymorphisms and the effect of atorvastatin therapy in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 26:1216-1223.

Vavricka SR, van Montfoort J, Ha HR, Meier PJ and Fattinger K (2002) Interactions of rifamycin SV and rifampicin with organic anion uptake systems of human liver. *Hepatology* 36:164-172.

Waters DD (2001) Are we aggressive enough in lowering cholesterol? *Am J Cardiol* 88:10F-15F.

Winkelmann BR, Hoffmann MM, Nauck M, Kumar AM, Nandabalan K, Judson RS, Boehm BO, Tall AR, Ruano G and Marz W (2003) Haplotypes of cholesteryl ester transfer protein predict lipid-modifying response to statin therapy. *Pharmacogenomics J* 3:284-296.

Zair ZM, Eloranta JJ, Stieger B and Kullak-Ublick GA (2008) Pharmacogenetics of OATP (SLC21/SLCO), OAT and OCT (SLC22) and PEPT (SLC15) transporters in the intestine, liver and kidney. *Pharmacogenomics* 9:597-624.

Zhang W, Chen BL, Ozdemir V, He YJ, Zhou G, Peng DD, Deng S, Xie QY, Xie W, Xu LY et al. (2007) SLCO1B1 521T-->C functional genetic polymorphism and lipid-lowering efficacy of multiple-dose pravastatin in Chinese coronary heart disease patients. *Br J Clin Pharmacol* 64:346-352.

**ANEXOS**

---

Anexo 1 – Parecer  
do Conselho  
de Ética da  
Universidade

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA PROPESQ

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

### RESOLUÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:


**Número:**200390

**Título do projeto:** Estudo da influência da variabilidade genética na resposta ao tratamento com sinvastatina ( proc. 23078. 001196/03-78)

**Investigador(es) principal(ais):** Mara Helena Hutz/Marilu Fiegenbaun e outros.

O mesmo foi aprovado na reunião nº 22, ata nº 43 do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, 10 de setembro de 2003.



José Roberto Goldim  
Coordenador CEP/UFRGS