

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**EFEITO FARMACOGENÉTICO DO
POLIMORFISMO ALA16VAL DO GENE DA MnSOD
NA RESPOSTA DE PACIENTES
HIPERCOLESTEROLÊMICOS A ROSUVASTATINA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thiago Duarte

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**EFEITO FARMACOGENÉTICO DO POLIMORFISMO
ALA16VAL DO GENE DA MnSOD NA RESPOSTA DE
PACIENTES HIPERCOLESTEROLÊMICOS A
ROSUVASTATINA**

por

Thiago Duarte

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia dos Processos Oxidativos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS, Brasil
2015

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO FARMACOGENÉTICO DO POLIMORFISMO
ALA16VAL DO GENE DA MnSOD NA RESPOSTA DE PACIENTES
HIPERCOLESTEROLÊMICOS A ROSUVASTATINA**

elaborada por
Thiago Duarte

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA

Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Maribel Antonello Rubin, Dr^a. (UFSM)

Olmiro Cezimbra de Souza Filho, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 27 de Fevereiro de 2015.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus queridos vizinhos e amigos José Manuel e Mirela Rosa da Cruz (*in memoriam*) por todas as lembranças inesquecíveis que tenho da nossa história e as quais levarei eternamente no meu coração.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a. Ivana Beatrice Mânica da Cruz, por ter me acolhido no Laboratório de BIOGENÔMICA, pela orientação, incentivo e desenvolvimento acadêmico, que tem me proporcionado, desde que ingressei como aluno de mestrado. Obrigado por sua valiosa contribuição, pois a admiro também como pessoa e profissional.

Aos professores Dra. Maribel Antonello Rubin e Dr. Olmiro Cezimbra de Souza Filho, membros desta banca examinadora, pela sua atenção e disponibilidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro oferecido como apoio para o desenvolvimento desta dissertação.

Aos meus colegas de laboratório Alencar Kolinski Machado, Fernanda Barbisan, Dianni Capelletto e Clarice Pinheiro Mostardeiro (*in memorian*) pela disponibilidade, auxílio técnico, amizade e atenção dispensada durante o desenvolvimento do meu trabalho.

Aos colegas Eduardo, Francine, Verônica, Raul, Charles, Tális, Pauline e demais membros do nosso laboratório pela convivência, companheirismo e amizade que certamente continuará por toda nossa existência.

Aos pacientes e seus familiares, que aceitaram participar deste projeto de pesquisa e compartilharam suas histórias de vida; meu muito obrigado;

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Farmacologia, pela luta constante para a especialização profissional de seus alunos.

À colaboradora do Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Zeli Carvalho pelo auxílio e atenção diante a tantas dúvidas no decorrer de minha caminhada como pós-graduando.

Ao Prof. Dr. Rafael Noal Moresco pelo apoio, auxílio, amizade e ensinamentos durante a minha graduação no curso de Farmácia e durante meu período como aluno de iniciação científica dentro do Laboratório de Bioquímica Clínica (LABICLIN).

Aos meus pais e principalmente, amigos, Paulo Antônio Silva Duarte e Marta Maria Medeiros Duarte, por me amarem incansavelmente e serem exemplos em minha vida. Obrigado pelo apoio e companhia em todos os momentos, sem nunca esperar nada em troca.

“A coragem não consiste em não sentir medo, mas sim em superá-lo. Aquele que enfrenta o perigo sem sentir medo não é um valente, é um irresponsável.”
(Roberto Gómez Bolaños)

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO FARMACOGENÉTICO DO POLIMORFISMO ALA16VAL DO GENE DA MnSOD NA RESPOSTA DE PACIENTES HIPERCOLESTEROLÊMICOS A ROSUVASTATINA

AUTOR: Thiago Duarte

ORIENTADOR: Ivana Beatrice Manica da Cruz

Data e Local da Apresentação: Santa Maria, 27 de Fevereiro de 2015.

A Rosuvastatina é um fármaco utilizado como tratamento de primeira escolha na hipercolesterolemia devido a inibição competitiva da enzima HMG-CoA redutase a qual converte a HMG-CoA em ácido mevalônico que é a etapa limitante na síntese do colesterol. Também atenua o processo inflamatório e oxidativo, principalmente pela redução na produção do ânion superóxido. O ânion superóxido é metabolizado pela enzima superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD ou SOD2) que atua no interior da mitocôndria. Nos seres humanos há um polimorfismo do gene, onde uma alteração de valina (Val) para alanina (Ala) ocorre no cromossomo 16 (Ala16Val-SOD2). Este polimorfismo que possui os dois alelos A e V, resulta em três possíveis genótipos: AA, AV e VV. O genótipo VV foi associado com o risco de desenvolvimento de várias doenças metabólicas, como a hipercolesterolemia. Assim, a fim de compreender melhor este fenômeno, este estudo investigou a influência do polimorfismo Ala16Val-SOD2 no perfil lipídico e nos biomarcadores inflamatórios e fibrinolíticos de 122 pacientes hipercolesterolêmicos tratados com 20 mg de rosuvastatina por 120 dias. Os resultados indicaram que os pacientes portadores do genótipo VV demonstraram uma menor resposta a rosuvastatina, comparados com pacientes portadores dos genótipos AA e AV. O efeito da rosuvastatina em biomarcadores inflamatórios e fibrinolíticos, também foram de menor intensidade nestes pacientes. Estes resultados sugerem alguns efeitos farmacogenéticos do polimorfismo Ala16Val-SOD2 no tratamento da hipercolesterolemia.

Palavras-chave: Hipercolesterolemia. Inflamação. Coagulação. Polimorfismo MTS-SOD2. Rosuvastatina. Farmacogenética.

ABSTRACT

Master's Dissertation

Post-Graduate Program in Pharmacology

Federal University of Santa Maria

PHARMACOGENETIC EFFECT OF ALA16VAL MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE GENE POLYMORPHISM ON HYPERCHOLESTEROLEMIC PATIENTS RESPONSE TO ROSUVASTATIN

AUTHOR: Thiago Duarte

ADVISOR: Prof^ª Dr^ª Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Date and place of the defense: Santa Maria, 27th february, 2015

Rosuvastatin is used as a drug of first choice in treating hypercholesterolemia due to competitive inhibition of HMG-CoA reductase enzyme which converts HMG-CoA to mevalonic acid which is the rate-limiting step in cholesterol synthesis, also attenuates the inflammatory process and oxidative, mainly by reducing the production of superoxide anion. Superoxide anion is metabolized by manganese-dependent superoxide dismutase (MnSOD or SOD2) that act into mitochondria. In humans, there is a gene polymorphism where a valine (Val) to alanine (Ala) substitution occurs at the 16th amino acid (Ala16Val-SOD2). This polymorphism having two alleles A and V, resulting in three possible genotypes: AA, AV and VV. The VV genotype has been associated with the risk of developing several metabolic diseases, such as hypercholesterolemia. Thus, in order to further explore this phenomenon, this study investigated the influence of Ala16Val - SOD2 polymorphism on lipid profile and inflammatory and fibrinolytic biomarkers of 122 hypercholesterolemic patients treated with 20 mg of rosuvastatin for 120 days. The results indicated that patients with the VV genotype showed a lower response to rosuvastatin, compared with patients with the AA and AV genotypes. The effects of rosuvastatin in inflammatory and fibrinolytic biomarkers were also milder in these patients. These results suggest some effects of pharmacogenetic - SOD2 Ala16Val polymorphism in the treatment of hypercholesterolemia.

Keywords: Hypercholesterolemia. Inflammation. Coagulation. MTS-SOD2 polymorphism. Rosuvastatin. Pharmacogenetics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 – Formação da placa de ateroma.....	17
FIGURA 2 – Mecanismo de coagulação.....	21
FIGURA 3 – Mecanismo de formação do D-dímero.....	23
FIGURA 4 – Polimorfismo Ala16Val da MnSOD.....	25

MANUSCRITO

FIGURE 1 – General experimental design of the study.....	49
--	----

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

TABLE 1 – Comparison among several biological and biochemical variables of hypercholesterolemic subject's carrier's different Ala16Val-SOD2 genotypes.....	50
TABLE 2 – Impact of Ala16Val-SOD2 polymorphism on rosuvastatin response of lipid, glicemic, inflammatory and fibrinolytic biomarkers.....	51
TABLE 3 – Multivariate analysis of association between VV-subjects and low response to rosuvastatin treatment when compared to A-allele subjects.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Alanina alanina

AGP – Alfa-1-glicoproteína ácida

Ala16Val – Alanina dezesseis valina

Ala16Val MnSOD – Polimorfismo da superóxido dismutase dependente de manganês Ala / Val

Apo-E – Apolipoproteína E

AV – Alanina valina

A-SOD2 – Alanina-Superóxido dismutase dois

CD4 – Linfócitos T CD4

CE – Células endoteliais

CES – Células espumosas

CML – Células musculares lisas

CMSPs – Células mononucleares do sangue periférico

CT – Colesterol total

kDa – Quilodaltons

DM – Diabetes mellitus

DM2 – Diabetes mellitus tipo II

DNA – Ácido desoxirribunucleico

ERN – Espécies reativas de nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

F – Fibrinogênio

GCT – Alanina

GTT – Valina

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HMG-CoA redutase – Hidróxi-metil-glutaril CoA redutase

ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular um

IDL – Lipoproteína de densidade intermediária

IFN- γ – Interferferon gama

IL-1 – Interleucina 1

IL-2 – Interleucina 2
IL-6 – Interleucina 6
IL-10 – Interleucina 10
IMC – Índice de massa corpórea
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
LRP – Receptor LDL relacionado a proteína
MDA – Malondialdeído
MMP – Metaloproteinases da matriz
MnSOD – Superóxido dismutase dependente de manganês
MTS – Seqüencia mitocondrial alvo
MTS – *Mitochondrial Target Sequence*
NF-Kb – Fator de transcrição nuclear kappa B
NK – Células *Natural Killer*
NO – Óxido nítrico
O₂^{•-} – Ânion superóxido
ox-LDL – Colesterol LDL oxidado
PCR – Proteína c reativa
SNP – Single nucleotide polymorphism
TG – Triglicerídeos
TGF-β – Fator de transformação do crescimento beta
TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa
TR – Células T reguladoras
UV – Ultravioleta
VCAM-1 – Molécula de adesão da célula vascular 1
VLDL – Lipoproteína de baixíssima densidade
V-SOD2 – Valina-Superóxido dismutase dois
VV – Valina Valina

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	15
1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
1.1 Hipercolesterolemia, aterosclerose e inflamação.....	16
1.2 Aterosclerose e coagulação.....	21
1.3 Polimorfismo do gene da superóxido dismutase (MnSOD)	24
1.3.1 Polimorfismo do gene da superóxido dismutase (MnSOD) e influência na saúde humana.....	26
1.3.2. Farmacogenética, estatinas e polimorfismo do gene da superóxido dismutase (MnSOD).....	27
1.4 Hipótese do estudo.....	31
2 OBJETIVO.....	32
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
3 RESULTADOS.....	33
4 DISCUSSÃO.....	52
5 CONCLUSÃO.....	54
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
7 PERSPECTIVAS.....	68
8 ANEXOS.....	69
8.1 Demais trabalhos realizados durante o curso de mestrado	69
8.2 Envio de submissão do artigo.....	70

APRESENTAÇÃO

No item 1, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**, está descrita uma revisão sobre os temas trabalhados nesta Dissertação.

No item 2, **OBJETIVOS**, estão descritos os objetivos, geral e específicos.

Os **RESULTADOS** estão dispostos na forma de artigo, submetidos à publicação na revista **The Pharmacogenomics Journal**, fator de impacto 5.513, organizado no item 3. O artigo científico está descrito na íntegra, contendo as seções introdução, materiais e métodos, resultados, discussão e referências bibliográficas.

No item 4, **DISCUSSÃO**, está apresentado as interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico aqui apresentado.

No item 5, **CONCLUSÕES**, são apresentadas as conclusões gerais do presente trabalho.

O item 6, **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**, refere-se somente às citações que aparecem nos itens 1, 2 e 5 (Introdução, Revisão Bibliográfica e Discussão).

No item 7, **PERSPECTIVAS**, estão expostos alguns possíveis estudos para a continuação desse trabalho.

O item **ANEXO**, refere-se aos demais trabalhos realizados durante o Curso de Doutorado e os artigos aceitos para publicação durante este período.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Hipercolesterolemia, aterosclerose e inflamação.

A hipercolesterolemia é uma condição que se caracteriza pela presença de taxas elevadas de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e diminuição de lipoproteína de alta densidade (HDL), ou seja, quando os níveis de colesterol total forem iguais ou superiores a 160 mg/dL (≥ 4.15 mmol/L) (GRUNDY et al., 2002). É um fator determinante para o surgimento da aterosclerose, a qual é a principal causa do infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, trombose, angina e demais doenças isquêmicas (SKILTON et al., 2007; DUARTE et al., 2010).

O colesterol é transportado por lipoproteínas plasmáticas, classificadas de acordo com a sua densidade em quilomícron, lipoproteína de baixíssima densidade (VLDL), LDL e HDL (GRUNDY et al., 2002; AMORIN et al., 2011). Além destas, existe outra classe de lipoproteínas, as lipoproteínas de densidade intermediária (IDL). As LDL são partículas ricas em colesterol e são responsáveis pelo seu transporte para as células teciduais, permitindo sua deposição nas artérias. Quando em concentrações elevadas, podem contribuir para a formação de placa ateromatosa, a qual pode obstruir o fluxo sanguíneo nos vasos, induzindo doenças cardiovasculares (BADIMÓN; VILAHUR & PADRÓ, 2009).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta a agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (SKÅLÉN, 2002). Esta patologia envolve uma associação de fatores como disfunção endotelial, estresse oxidativo e agregação de leucócitos e plaquetas, conduzindo a um processo isquêmico (WOLBERG & MACKMAN, 2009).

Os principais fatores de risco para aterosclerose incluem a elevação de lipoproteínas aterogênicas (LDL, IDL, VLDL, remanescentes de quilomícrons), diminuição dos níveis de HDL-colesterol (FORRESTER et al., 2005), índice de massa corpórea (IMC) elevado, hipertensão e *Diabetes mellitus* (DM). Além disso, alguns fatores ambientais como tabagismo, desequilíbrio dietético e sedentarismo também contribuem para o desenvolvimento de aterosclerose (ROCHA & LIBBY, 2009; KRAHULEC, 2010).

O processo de aterogênese inicia-se a partir da oxidação do LDL-colesterol induzida por radicais livres produzidos pelos macrófagos, células endoteliais (CE) e células musculares lisas (CML) (HEINECKE, 1998; HARRISON et al., 2003; ARMSTRONG; MORROW & SABATINE, 2006; GAUTIER; JAKUBZICK & RANDOLPH, 2009). O depósito de LDL oxidado (oxLDL), na parede arterial, é o processo-chave para o desenvolvimento da aterogênese, uma vez que a deposição destas moléculas promove dano endotelial (HOLVOET et al., 1998; HARRISON et al., 2003). O oxLDL é reconhecido pelos macrófagos através de receptores *scavenger* tipo SR-AI, SR-AII, CD36 e receptor LDL relacionado à proteína (LRP), (HOLVOET et al., 1998; ROCHA & LIBBY, 2009) os quais são responsáveis por englobarem lipoproteínas modificadas (predominantemente oxLDL), originando células espumosas (CES), também denominadas de *foam cells*. Posteriormente, o colesterol LDL oxidado (ox-LDL) induz as CE a expressarem moléculas de adesão tais como, a molécula de adesão intercelular - 1 (ICAM-1) e a molécula de adesão da célula vascular - 1 (VCAM-1), permitindo que os monócitos e linfócitos T possam se aderir às CE. Além disso, há secreção da proteína quimiotática de monócitos - 1 (MCP-1) que estimula a migração destas células para o espaço endotelial, desempenhando um papel fundamental na progressão da aterosclerose, conforme figura 1 (SCALIA; APPEL & LEFER, 1998; LIBBY; RIDKER & HANSSON, 2011).

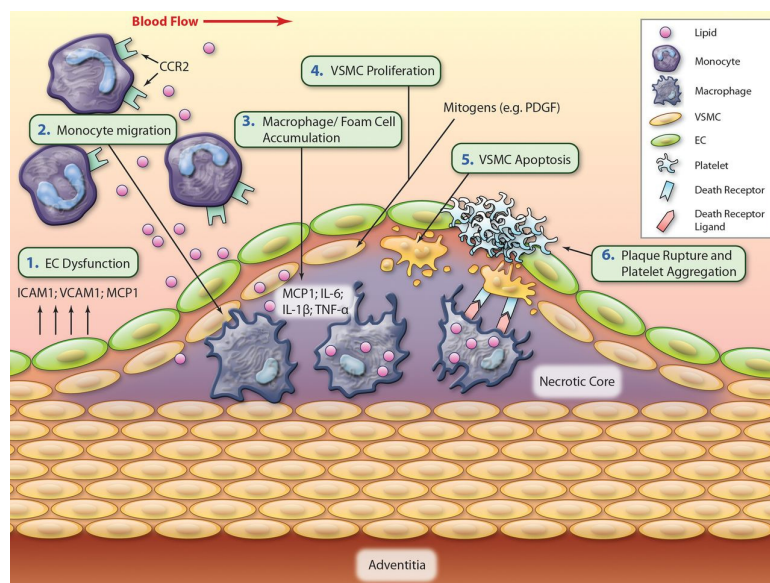


Figura 1 – Formação da placa de ateroma
Adaptado de Wang & Bennett (2012)

A ativação da resposta inflamatória envolve a participação de diversos tipos de células tais como granulócitos, linfócitos B e T, células dendríticas, células progenitoras e, principalmente, monócitos. Estes, quando ativados passam a secretar Interleucina 1 (IL-1) a qual ativará os linfócitos T (CD4), os quais passam a secretar as citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 2 (IL-2) e o interferon gama (IFN- γ), responsáveis por causarem maior ativação de macrófagos, ativação vascular e inflamação (CHARAKIDA et al., 2009). Adicionalmente, também ocorre produção de proteínas de fase aguda como proteína C reativa (PCR), alfa-1-glicoproteína ácida (AGP) e fibrinogênio (F) (HANSSON, 2005; ANFOSSI et al., 2010).

A principal função da IL-1 na aterogênese é a sua capacidade de aumentar a expressão de moléculas de adesão e estimular a produção de proteínas inflamatórias de fase aguda pelo fígado. A IL-1, juntamente com o IFN- γ e o TNF- α , promove o crescimento de fibroblastos e a síntese de colagenases, além de estimular linfócitos T e a proliferação de CML (CHARAKIDA et al., 2009).

O IFN- γ é uma das principais citocinas pró-aterogênicas, devido a seu papel na ativação de macrófagos, na participação da maturação de linfócitos B e no estímulo da síntese de anti-oxLDL. Além disso, induz apoptose de macrófagos, estando envolvido na característica necrótica e pró-aterogênica das lesões avançadas do processo aterosclerótico (LI et al., 2011).

O TNF- α tem como ação principal ativar monócitos e neutrófilos, bem como aumentar a expressão de moléculas de adesão pelas CE, promovendo a ligação de leucócitos ao endotélio no sítio da inflamação (RIDKER et al., 2000; MACKESY & GOALSTONE, 2011). Sendo assim, seu envolvimento na formação da placa ateromatosa deve-se a deposição e a ativação de elementos celulares na parede dos vasos, levando à progressão da aterosclerose. Quando secretado em grandes quantidades, provoca prejuízo das propriedades anticoagulantes normais do endotélio (OLSON et al., 2012). Além disso, o TNF- α associado a IL-1, favorece a expressão de um receptor para oxLDL na superfície de CML, nas CE e nos macrófagos, sendo que nestes é encontrado na forma inativa, favorecendo assim, a formação de CES e ampliando o processo inflamatório (PARK & LAKATTA, 2012).

A IL-6 é sintetizada por diversas células como os monócitos, fibroblastos e CE e é responsável pela estimulação da diferenciação de linfócitos B e a ativação de linfócitos T. Regula a expressão de outras citocinas inflamatórias, como a IL-1 e o TNF- α , além de promover a quimiotaxia de leucócitos e a mitogênese de CML (FUTTERMAN &

LEMBERG, 2002). A IL-6 também estimula a produção de F, PCR e AGP; induz os macrófagos a produzir o fator tecidual e MMP; estimula a agregação plaquetária e a expressão de moléculas de adesão. Juntamente com as demais citocinas pró-inflamatórias, a IL-6 determina uma ampla resposta imunológica frente a estímulos na fase aguda de instabilização da placa de aterosclerose (DA SILVA & MORESCO, 2011).

A PCR, uma proteína de fase aguda sintetizada no fígado, eleva-se rapidamente após o estímulo inflamatório (ROCHA & LIBBY, 2009). Durante a resposta inflamatória da aterosclerose a PCR está envolvida no processo de disfunção endotelial, induzindo a produção de moléculas de adesão e quimiocinas pelas CE, favorecendo o processo de ligação de monócitos ao endotélio, com consequente aumento da formação de CES. Assim, a PCR participa diretamente da amplificação da resposta imune levando à exacerbação do dano tecidual (XU et al., 2011). No processo aterosclerótico, a PCR pode apresentar produção extra-hepática. Na placa aterosclerótica, por exemplo, ocorre uma expressão significativa de RNA mensageiro para PCR e a presença dessa proteína pode ser detectada tanto nas CML quanto nos macrófagos, mostrando que a sua produção local está aumentada (CHEN et al., 2012). A PCR pode também ser produzida por células mononucleares periféricas, células das artérias coronárias e células epiteliais, podendo agir localmente sobre as CE, monócitos e macrófagos ou CML de maneira autócrina e parácrina (ROCHA & LIBBY, 2009). Além disso, a PCR ativa o sistema complemento, o qual promove a formação do complexo de ataque à membrana, com consequente lise e morte celular na placa aterosclerótica, sendo esse processo precursor dos eventos trombóticos (XU et al., 2011).

A AGP é sintetizada pelo fígado, granulócitos e monócitos. Apresenta diferentes funções, como a inibição da agregação plaquetária, a proliferação de linfócitos, redução da resposta quimiotática (CORREALE et al., 2008; ZIAKAS et al., 2011) e, principalmente, a inibição da ligação de neutrófilos ao endotélio pelas selectinas. A AGP ainda possui papel na inibição da produção das espécies reativas de oxigênio (EROs), como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em contrapartida, exerce efeito modulador do processo inflamatório, pois promove a indução da liberação de citocinas de monócitos (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , IL-1Ra e receptor de TNF- α solúvel) (KATORI et al., 2011; KOMORI et al., 2012).

O F é outra proteína inflamatória de fase aguda, que contribui para a aterogênese através de vários mecanismos, incluindo o aumento da formação de fibrina, a viscosidade plasmática, a agregação plaquetária e a proliferação de CML, o que contribui para a

desorganização das CE, alterando assim a permeabilidade vascular (DAVALOS & AKASSOGLU, 2012; HOPPE et al., 2012).

Em suma, todos estes mediadores inflamatórios são liberados no espaço intimal, contribuindo para perpetuação e amplificação do processo de aterogênese, levando finalmente à formação da placa aterosclerótica (ROSS, 1999).

Algumas citocinas com ação anti-inflamatória podem interferir no desenvolvimento da aterosclerose como, por exemplo, a interleucina 10 (IL-10) e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) (KLEEMANN; ZADELAAR & KOOISTRA, 2008). A IL-10 é produzida por linfócitos T (CD4), macrófagos, células *Natural killer* (NK), células dendríticas e células T reguladoras (TR). Esta citocina exerce importante ação inibitória sobre macrófagos e linfócitos T, interferindo na síntese de algumas citocinas pró-inflamatórias como, IL-1, IL-6 e IFN- γ , TNF- α , além de suprimir a expressão de moléculas de adesão e co-estimulação. Além disso, inibe a apoptose e a geração de EROs, sendo uma das mais importantes citocinas inibidoras da ativação da resposta imune na aterosclerose (BINDER et al., 2002).

A redução do volume da placa é influenciada pelos níveis de IL-10, a qual inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, via fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B). A IL-10 também inibe a apoptose de macrófagos, a expressão do fator tecidual, o fibrinogênio e a proliferação de CML, mecanismos esses, diretamente relacionados com a progressão da aterosclerose (NG; BURRIS & NAGARAJAN, 2011).

O TGF- β é uma citocina pluripotente, produzida por uma variedade de células, tais como TR, macrófagos, células dendríticas, plaquetas, CE e CML. É reconhecida como uma citocina protetora na aterosclerose por promover a estabilização da placa aterosclerótica, por suas propriedades anti-inflamatórias e pró-fibróticas (LEBASTCHI et al., 2011). Foi demonstrado que o tratamento subcutâneo com 200 μ g/kg de TGF- β em ratos reduziu significativamente a expressão dos níveis de IFN- γ e promoveu um aumento dos níveis de IL-10, reduzindo em torno de 31% nas lesões ateroscleróticas aórticas de ratos (UCHIYAMA et al., 2012). Na aterosclerose, a síntese de TGF- β está diminuída, possivelmente por ação da oxLDL. Apresenta capacidade de diminuir a expressão de macrófagos e linfócitos T (LIN et al., 2010), moléculas de adesão e pode inibir a adesão de monócitos à parede dos vasos (NAKHJAVANI et al., 2009).

Em modelos animais, o aumento destas citocinas protetoras ou a redução do estímulo pró-inflamatório por meio do uso de anticorpos específicos têm resultado na redução da

aterosclerose ou, pelo menos, na mudança da morfologia de placas de ateroma (UCHIYAMA et al., 2012).

1.2. Aterosclerose e coagulação

A ruptura da placa de ateroma resulta na exposição do fator tecidual subendotelial e colágeno. Assim, a cascata de coagulação é ativada, culminando com a produção de trombina e na formação do coágulo (ABBATE et al., 2012). O colágeno, ao ser exposto, provoca a ativação e o acúmulo de plaquetas. Simultaneamente, o fator tissular inicia o processo de geração de trombina que converte o F em fibrina e ativa as plaquetas (KUMAR; KAR & FAY, 2011).

O mecanismo de coagulação ocorre em três fases: início da coagulação (fator tissular encontra-se exposto), propagação da coagulação (produção de trombina) e finalização da resposta pré-coagulante (ocorre na superfície plaquetária, resultando na produção de altas quantidades de trombina e de fibrina) (MANN et al., 2009), conforme figura 2.

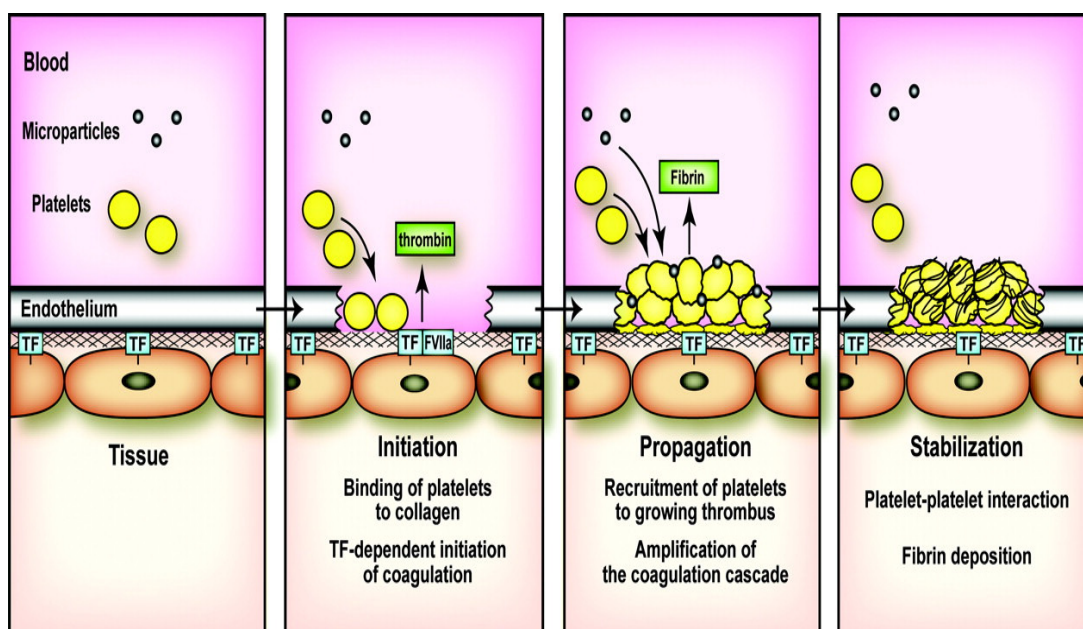


Figura 2 – Mecanismo de coagulação
Adaptado de Kumar; Kar & Fay (2011)

A eficiência da hemostasia depende do equilíbrio dos mecanismos pró-coagulantes e das reações de fibrinólise. O processo fibrinolítico tem como objetivo remover o coágulo depois da cicatrização da lesão vascular e também os coágulos intravasculares, que são potenciais causadores de trombose (HEISSIG et al., 2012). Ao mesmo tempo em que o coágulo de fibrina é formado, o sistema fibrinolítico é ativado para rompê-lo por meio da plasmina, que converte a fibrina em produtos solúveis de degradação, como o D-dímero (ABBATE et al., 2012).

O D-dímero é utilizado como marcador de hipercoagulabilidade oferecendo indicação prognóstica para diversas condições clínicas além da trombose venosa (KESIEME et al., 2011), como coagulação intravascular disseminada, doença cardiovascular, doenças infecciosas e câncer (ADAM et al., 2009; CHAROENSRI & PORNRATANARANGSI, 2011, CHOPRA et al., 2012).

O D-dímero é o menor destes produtos, sendo formado pela ação sequencial de três enzimas: trombina, fator XIIIa e plasmina. A trombina cliva o fibrinogênio, produzindo monômeros de fibrina que polimerizam e servem como um modelo para a formação de fator XIIIa e plasmina (DELLUC et al., 2011). O fator XIIIa catalisa a formação de ligações covalentes entre os domínios D na fibrina polimerizada. A plasmina degrada o retículo de fibrina e libera produtos da degradação da fibrina, expondo o D-dímero (KESIEME et al., 2011; ABBATE et al., 2012), de acordo com a figura 3.

Elevados níveis de D-dímero são encontrados em pacientes com trombose venosa profunda e tromboembolismo pulmonar e, atualmente, a avaliação de seus níveis vem sendo utilizada para a exclusão diagnóstica em pacientes com suspeita destas patologias devido ao seu alto valor preditivo negativo (ADAM et al., 2009). Também é utilizado como marcador de hipercoagulabilidade em pacientes portadores de câncer pancreático (DELLUC et al., 2011). Níveis elevados de D-dímero também são encontrados no soro de pacientes com hemorragia intracerebral aguda (OGATA et al., 2011). Os níveis de D-dímero oferecem indicação prognóstica para diversas condições clínicas além da trombose venosa (KESIEME et al., 2011), como coagulação intravascular disseminada, doença cardiovascular, doenças infecciosas e câncer (ADAM et al., 2009; CHAROENSRI & PORNRATANARANGSI, 2011 ; CHOPRA et al., 2012).

Generation of D-dimer from cross-linked fibrin

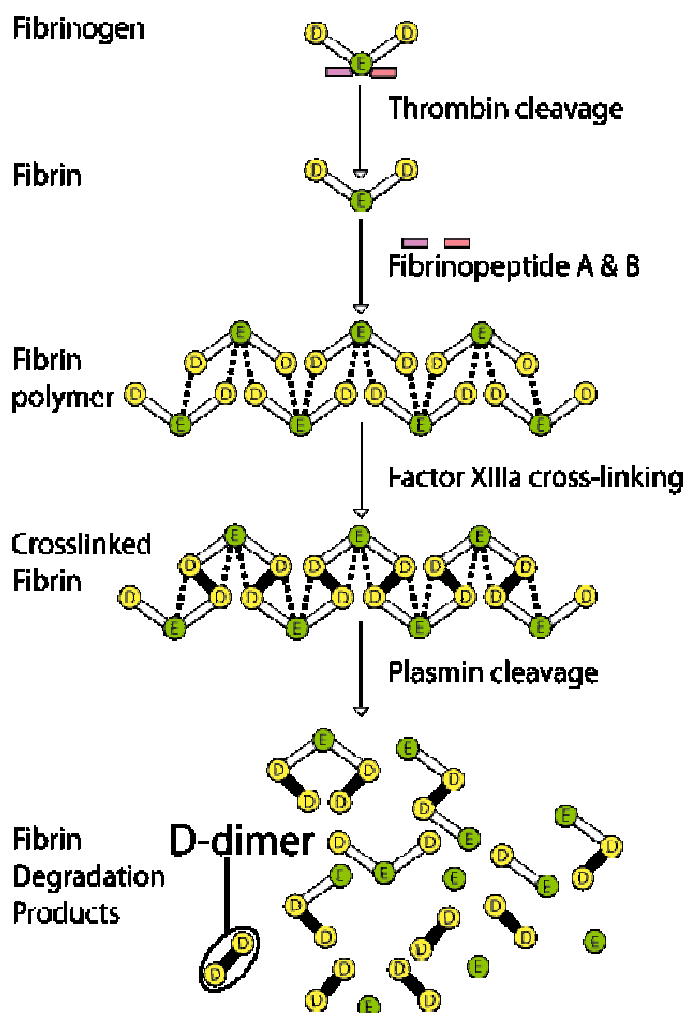


Figura 3 – Mecanismo de formação do D-dímero
Adaptado de Kesieme et al (2011)

Fatores como a hipercolesterolemia, oxLDL, citocinas inflamatórias tais como IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ (KLEEMANN; ZADELAAR & KOOISTRA, 2008), proteínas de fase aguda como PCR, AGP e F são fatores predisponentes à adesão, ativação e agregação plaquetária, favorecendo a coagulação no processo de aterosclerose, bem como a indução de mutações gênicas em diversas enzimas antioxidantes (TOUSOULIS et al., 2003, DEDOUSSIS et al., 2008; ANFOSSI et al., 2010; TOUSOULIS et al., 2011).

1.3 Polimorfismo do gene da superóxido dismutase (MnSOD)

Na hipercolesterolemia, os macrófagos, os linfócitos e as CML liberam citocinas à circulação sistêmica, induzindo a ativação da cascata inflamatória que promove dano oxidativo intracelular e mutação gênica, especialmente da enzima antioxidante superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) (MATTESS, 2000; FORTUNATO e DI TARANTO, 2007; DEDOUSSIS et al., 2008).

A MnSOD é uma molécula homotetramétrica composta por tetrâmeros de aproximadamente 23 quilodaltons (kDa) por subunidade considerada uma enzima antioxidante da primeira linha de defesa, codificada por um gene nuclear e é encontrada na sua forma ativa na matriz mitocondrial, dismutando o ânion ($O_2^{\bullet -}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; BRESCIANI et al., 2013).

O gene da MnSOD está localizado no braço longo do cromossomo 6 na sub-região q25.3, possui 5 éxons e 4 íntrons (existe apenas uma cópia deste gene) e a sua proteína é sintetizada no citosol e modificada pós-transcricionalmente dentro da mitocôndria (WISPE et al., 1989; SHIMODA-MATSUBAYASHI et al., 1996). Por ser produzida no citosol tal enzima precisa ser carregada para o interior da mitocôndria. Este processo é coordenado por uma sequência peptídica sintetizada e presente no início da proteína MnSOD, ainda inativa, conhecida como sequência mitocondrial alvo (*Mitochondrial Target Sequence*, MTS). Quando a MnSOD entra na mitocôndria, a região MTS é clivada por lisossomas tornando-se ativa e funcional (ZELKO; MARIANI & FOLZ, 2002).

Um dos polimorfismos mais estudados do gene da MnSOD ocorre na sequência MTS. Este é genericamente denominado Ala16Val, que se origina por uma mutação estrutural no gene. Na região gênica que codifica a sequência MTS, foi detectado um polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP, *single nucleotide polymorphism*) localizado no éxon 2, nucleotídeo 47, ocorre a substituição de uma timina (T) por uma citosina (C). A substituição da T pela C faz com que haja a inserção de um aminoácido alanina (A) (GCT) ao invés do aminoácido valina (V) (GTT) na posição 9 do códon 16. Por este motivo, este polimorfismo é denominado Ala16Val-SOD2. (WISPE et al., 1989; ZELKO et al., 2002) conforme figura 4.

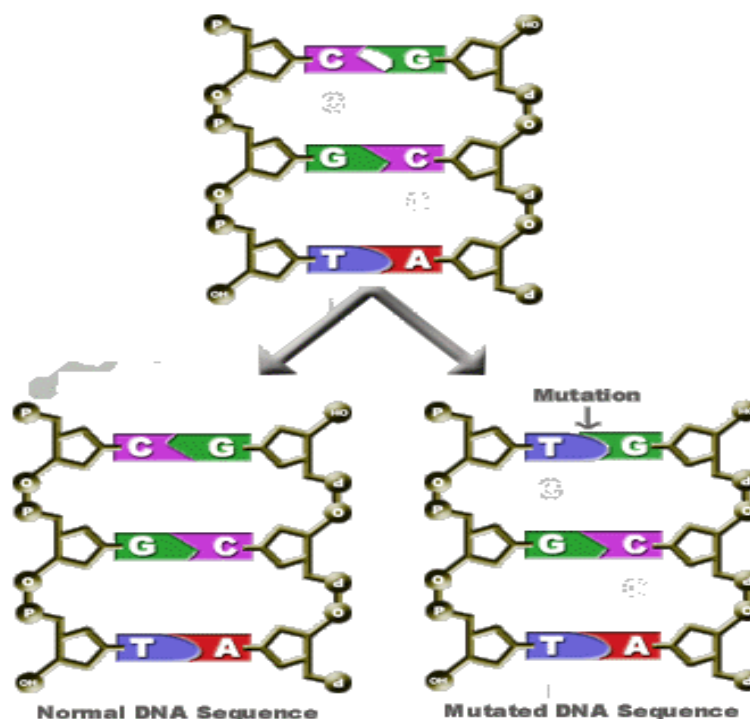


Figura 4 - Polimorfismo Ala16Val da MnSOD.
Adaptado de Rosenblum et al. (1996).

Três genótipos são descritos no polimorfismo da MnSOD: genótipo Alanina Alanina (AA), genótipo Alanina Valina (AV) e genótipo Valina Valina (VV) (ROSENBLUM et al., 1996). A substituição da Alanina por Valina (polimorfismo Ala16Val) mostra que o alelo Val (V) afeta a conformação da sequência da proteína imatura da MnSOD, a qual é sintetizada e está presente no citosol, dificultando o transporte e a entrada da mesma para o interior da mitocôndria, onde a enzima será cortada e se tornará ativa. Essas dificuldades fazem com que indivíduos portadores do alelo Valina-Superoxido Dismutase 2 (V-SOD2) tenham uma menor eficiência enzimática da MnSOD do que os que possuem o alelo Alanina-Superoxido Dismutase 2 (A-SOD2) (SHIMODA-MATSUBAYASHI et al., 1996).

Fenotipicamente, a variante A-SOD2 por apresentar uma estrutura α -hélice, tem grande facilidade em entrar para o interior da mitocôndria, possibilitando os portadores do genótipo AA possuírem uma maior eficiência enzimática. Como a variante V-SOD2 apresenta uma estrutura β -lâmina, fica reprimida no poro da membrana interna mitocondrial dificultando assim a sua entrada, comprometendo a atividade desta enzima nos indivíduos portadores do genótipo VV (SUTTON et al., 2005). Os indivíduos heterozigotos (AV) possuem uma eficiência

intermediária em relação aos genótipos homozigóticos (SUTTON et al., 2003, BAG & BAG, 2008). Estudos conduzidos por Montiel e colaboradores (2013) *in vitro* estimaram que o alelo A-SOD2 é capaz de gerar uma enzima 30-40% mais eficiente que o alelo V-SOD2. Esta grande diferença na eficiência enzimática pode levar a riscos de disfunções e doenças associadas ao estresse oxidativo (BRESCIANI et al., 2013).

1.3.1 Polimorfismo do gene da superóxido dismutase (MnSOD) e influência na saúde humana

Vários estudos têm demonstrado uma forte relação entre o genótipo VV e o estresse oxidativo, processo inflamatório e menor eficácia nos tratamentos de diversas patologias. Estudos conduzidos por Gottlieb e colaboradores (2005) observaram que indivíduos com DM2 apresentavam uma maior frequência do alelo V-SOD2 da MnSOD, bem como maiores níveis de ox-LDL.

Dedoussis e colaboradores (2008) observaram níveis elevados de LDL-oxidado em homens de meia idade e níveis mais baixos em mulheres idosas, ambos do genótipo VV, quando comparados com os outros genótipos (AA e AV). Também em 2008 Isbir e colaboradores demonstraram que pacientes submetidos a cirurgia cardíaca com o genótipo VV apresentaram menores níveis pré e pós-operatórios da atividade da MnSOD e maior liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6.

Montano et al. (2009) encontraram uma maior frequência do genótipo VV em indivíduos obesos. De acordo com os dados estimados a razão de chance (RC) é de 1.5 vezes maior de indivíduos VV serem obesos do que indivíduos AA e AV. Sugerindo que um aumento dos níveis do ânion $O_2^{\bullet-}$ poderia ser ocasionado pela baixa eficiência do genótipo V-SOD2 e assim afetar as vias metabólicas contribuindo para obesidade.

Duarte et al. (2010) sugere uma forte associação entre o genótipo VV e aumento do estresse oxidativo. Bica e colaboradores (2010) também encontraram em suas pesquisas uma associação do genótipo VV com a hipercolesterolemia e câncer de mama com maior potencial metastático.

O genótipo VV por apresentar uma enzima menos eficiente, também está fortemente associado às complicações cardíacas e microvasculares como no diabetes e indicadores bioquímicos associados ao risco cardiometabólico (JONES et al., 2010; TIAN et al., 2011).

Montagner e colaboradores (2010) investigaram a resposta *in vitro* de uma cultura de

linfócitos provenientes de indivíduos saudáveis com os diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val-SOD2, expostas à radiação ultravioleta (UV). Os resultados apresentaram aumento da viabilidade celular e índice mitótico dos linfócitos portadores do genótipo AA, bem como, maior índice de danos no ácido desoxirribonucleico (DNA) quando expostos à radiação UV.

Montano e colegas (2012) observaram a ocorrência de níveis elevados na produção de citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ) em linfócitos portadores do genótipo VV, quando comparados com os linfócitos dos demais genótipos (AA e AV). Costa e colaboradores (2012) observaram que o efeito *in vitro* antioxidante do citrato de clomifeno, um fármaco utilizado para a indução da ovulação, era influenciado pelo polimorfismo Ala16Val-SOD2. No mesmo ano, foi realizado um estudo por Algarve e colaboradores (2012), para avaliar a influência do Ala16Val-SOD2 sobre os efeitos citotóxicos relacionados a exposição *ex vivo* ao metímercurio (MeHg) em leucócitos, sugerindo efeito toxicogénico na resposta das células expostas ao MeHg.

Barbisan e colaboradores (2014) também observaram em um estudo *in vitro* que o polimorfismo Ala16Val-SOD2 é capaz de modular a resposta citotóxica de linfócitos ao fármaco metotrexato (MTX). Este fármaco, um antimetabólito análogo do ácido fólico, é utilizado em doses elevadas no tratamento de neoplasias como a leucemia linfocítica e em baixas doses para o tratamento de doenças autoimunes, como a psoríase e a artrite reumatoide.

Estudos conduzidos por Bairova et. al (2014) relataram que fatores de risco relacionados a hipertensão essencial variam de acordo com as diferenças étnicas entre caucasianos e mongóis. Os adolescentes caucasianos apresentavam elevados níveis de malondialdeído (MDA) para A-SOD2, enquanto adolescentes mongóis apresentavam níveis reduzidos de antioxidantes totais para V-SOD2.

1.3.2 Farmacogenética, estatinas e polimorfismo do gene da superóxido dismutase (MnSOD).

As variações na resposta ao tratamento de patologias podem ser decorrentes de vários fatores como o tipo de doença, diferenças na farmacocinética e farmacodinâmica dos medicamentos, fatores ambientais e fatores genéticos (SHASTRY, 2006). Considerando que os fatores genéticos podem contribuir para a segurança e eficácia de um medicamento,

estudos em relação à farmacogenética têm sido estimulados recentemente. A farmacogenética estuda influências genéticas sobre respostas medicamentosas, estando focada nos efeitos causados isoladamente pelos genes (CHOWBAY; ZHOU & LEE, 2005).

As diferenças nas respostas terapêuticas entre os indivíduos estão associadas geralmente com polimorfismos genéticos presentes em genes que afetam a farmacocinética ou farmacodinâmica (CHOWBAY; ZHOU & LEE, 2005). Estes polimorfismos podem alterar a expressão ou a atividade de sítios de ligação de medicamentos, afetando a estabilidade do RNA mensageiro correspondente ou modificando a estrutura conformacional de proteínas (WEINSHILBOUM, 2003). Essas alterações levam a redução ou aumento da atividade de proteínas codificadas (THORISSON & STEIN, 2003). Evidências sugerem que SNPs em genes que codificam transportadores e enzimas metabolizadoras de medicamentos ou envolvidas na biossíntese e no reparo do DNA, poderiam determinar a eficácia dos medicamentos e sua toxicidade (INGELMAN-SUNDBERG, 2001).

A farmacogenética investiga polimorfismos genéticos hereditários que podem efetuar em respostas à terapia medicamentosa. Tais polimorfismos genéticos podem realizar diferentes funções como alteração de resposta ao tratamento com inibidores da bomba de prótons e influência em receptores farmacológicos e no transporte de medicamentos, bem como no seu metabolismo (METZGER; SOUZA-COSTA & TANUS-SANTOS, 2006). A principal aplicação da farmacogenética consiste na dosagem personalizada dos medicamentos de acordo com a variabilidade dos genótipos e a seleção de tratamento com maior eficácia e menor risco de efeitos adversos para cada um deles (BOUSOLA et al., 2015). Vários estudos tem avaliado o efeito farmacogenético na eficácia clínica e nos efeitos adversos causados pelas estatinas. Os diversos genes podem estar ligados à farmacocinética ou farmacodinâmica das estatinas e ambos são considerados potencialmente importantes, embora hajam resultados discrepantes encontrados nestes estudos (GRYN & HEGELE, 2014).

Não existem estudos relacionando a atividade de fármacos hipolipemiantes como a rosuvastatina com o polimorfismo Ala16Val-SOD2. Os estudos atuais estão relacionados com os genótipos homozigóticos (AA e VV), diretamente relacionados a um estado de desequilíbrio entre metabolismo oxidativo e a atividade antioxidante, que pode induzir a manifestação de diversas patologias a nível basal que podem aumentar o risco de doenças. Deste modo, justifica-se este estudo para entender como tais genótipos se comportam frente a administração de um fármaco hipolipemiante em indivíduos hipercolesterolêmicos.

As estatinas são fármacos reconhecidos como agentes hipolipemiantes podendo ser divididos em duas subclasses de acordo com a sua natureza química: estatinas hidrofílicas e

estatinas hidrofóbicas (HATZITOLIOS et al., 2009). A sinvastatina é classificada como uma estatina hidrofóbica e assim como as outras de sua classe, tem sua entrada em nosso sistema hepático pela veia porta do fígado, diferentemente das estatinas hidrofílicas como a rosuvastatina que requerem transporte ativo no interior da célula. Estas classes de estatinas são utilizadas na prevenção de doenças cardiovasculares, beneficiando também o sistema nervoso e muscular. Podem também impedir o crescimento tumoral (KATZUNG, 2010).

A rosuvastatina é um fármaco hipolipemiante de caráter hidrofílico e sua administração é dependente de transporte ativo intracelular. Foi testada em ensaios clínicos e utilizada na prática clínica brasileira desde maio de 2004, data de registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (ELLSWORTH et al., 2007).

A biodisponibilidade oral de rosuvastatina é de 20%, comparável à da atorvastatina, pravastatina, fluvastatina e qualitativamente superior à sinvastatina e à lovastatina. A concentração plasmática máxima é alcançada depois de 5 horas, após uma dose oral, sendo considerada a mais longa entre os inibidores da enzima hidróxi-metil-glutaril CoA redutase (HMG-CoA redutase), que atingem concentrações plasmáticas máximas em menos de 3 horas. O pico de concentração no plasma mostra uma grande relação linear com o aumento da dose da rosuvastatina de 5 a 80 mg (MARTIN et al., 2003).

A administração de rosuvastatina pode ser realizada tanto em jejum ou no estado alimentado, podendo ser tomada pela manhã ou pela noite. A ingestão de alimentos diminui a taxa de absorção para 20%, mas não prejudica e nem prolonga o processo de redução do colesterol. Aproximadamente 90% da rosuvastatina é ligada a proteínas, principalmente à albumina. Seu volume médio de distribuição é de 134 litros em estado estacionário. (CRESTOR, 2013).

Estudos de hepatócitos humanos indicam que a rosuvastatina é um substrato pobre para o metabolismo pelo citocromo P450 e, portanto, 90% do fármaco é excretado inalterado. A CYP2C9 é a principal isoenzima envolvida no metabolismo com um efeito mínimo pelo CYP2C19. A rosuvastatina é a droga com a menor probabilidade de causar interações devido ao seu metabolismo limitado pela ação de isoenzimas do Citocromo P. (MARTIN et al., 2003; KATZUNG, 2010). A meia vida plasmática da rosuvastatina é de dezenove horas. É eliminada em torno de 90% pelas fezes e 10% pelos rins (MARTIN et al., 2003).

Os inibidores da HMG CoA redutase têm demonstrado benefícios na prevenção de eventos cardiovasculares primários e secundários independentemente do nível de colesterol (KOREN & HUNNINGHAKE, 2004).

O mecanismo de ação da rosuvastatina consiste na inibição competitiva da enzima HMG-CoA redutase de forma seletiva e reversível. Esta enzima converte a HMG-CoA em ácido mevalônico na via biossintética do colesterol que é a etapa limitante na síntese do colesterol (BUCKETT et al., 2000; ISTVAN & DEISENHOFER, 2001). Por conseguinte, a rosuvastatina diminui a síntese hepática de esterol, reduzindo a concentração de colesterol nos hepatócitos. Os hepatócitos respondem a esta diminuição intracelular de colesterol aumentando o número de receptores de LDL na superfície celular para elevar a captação de LDL hepático da circulação. O resultado deste processo é um aumento do catabolismo da LDL que reduz as concentrações séricas de LDL e do colesterol total (DURRINGTON, 2007).

A rosuvastatina é relativamente hidrofílica e é altamente seletiva para as células hepáticas. O transporte da rosuvastatina para dentro o fígado é mediada por ânion orgânico transportador de polipeptídeo (OATP)-1B1 (ISTVAN & DEISENHOFER, 2001).

A rosuvastatina tem demonstrado reduções de triglicerídeos (TG) comparáveis a de outras estatinas, porém é mais eficiente que as demais estatinas em pacientes com níveis basais de TG muito elevados. Estudos mostraram também um aumento de 8% à 12% de HDL (DAVIDSON et al., 2001; STEIN et al., 2003). Esta estatina apresenta efeitos pleiotrópicos independentes da inibição da HMG-CoA redutase, os quais beneficiam funções antitrombóticas, anti-inflamatórias e antioxidantes (GROSSER et al., 2004). Além disso, este fármaco garante melhorias na função endotelial por promover o aumento da produção de óxido nítrico (ON) e a redução da formação de EROs, sendo também responsável pela redução de PCR, um importante marcador inflamatório e preditor de riscos cardiovasculares (MAYER et al., 2007). Outra importância da rosuvastatina é a inibição da agregação plaquetária impedindo a formação de coágulos em endotélio danificado (LAUMEN et al., 2008).

Estudos atuais conduzidos por Siddiqui et al. (2014) demonstraram que houve modulação nas metaloproteinases, no fator de crescimento endotelial e no receptor de estrogênio α em ratos apolipoprotéina E (Apo-E) *knockout* submetidos à dieta hipercolesterolêmica, favorecendo a reconstrução arteriolar. Moon et al. (2014), observou uma redução nos níveis de MDA e oxLDL em pacientes que sofreram acidente vascular cerebral (AVC) após administração de dose diária de 20mg de rosuvastatina após um mês de tratamento.

Kostapanos e colaboradores (2014) sugerem que os riscos associados ao uso crônico de rosuvastatina que acarretam efeitos adversos musculares, hepáticos e renais são menores do que os benefícios vasculares em indivíduos com doenças cardiovasculares.

Tem sido descrito que a associação de rosuvastatina com bexaroteno, medicamento antiangiogênico, reduziu a formação de aneurismas devido a redução de inflamação e neovascularização, quando comparado com o tratamento individual, servindo assim como um tratamento mais seguro para evitar o aneurisma aórtico abdominal (ESCUDEIRO et al., 2015).

Apesar do acúmulo de evidências epidemiológicas que sugerem a associação entre a hipercolesterolemia, marcadores bioquímicos, inflamatórios e fibrinolíticos, a influência de fatores genéticos envolvendo as doenças cardiovasculares ainda não está completamente elucidada. Considerando que a Rosuvastatina é um fármaco utilizado como tratamento de primeira escolha na hipercolesterolemia, avaliar a possível interação farmacogenética do mesmo com o polimorfismo da MnSOD e com os marcadores inflamatórios e fibrinolíticos, torna-se relevante.

1.4 Hipótese do estudo

A hipótese deste estudo é que a rosuvastatina, um fármaco hipolipemiante usado na prática clínica de rotina, detentor de efeitos pleiotrópicos antioxidantes, anti-inflamatórios e antitrombóticos, independentes de seu mecanismo de ação exerça um efeito farmacogenético dependente do polimorfismo Ala16Val-SOD2.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a interação farmacogenética da Rosuvastatina e polimorfismo MnSOD na modulação de marcadores inflamatórios e fibrinolíticos em pacientes hipercolesterolêmicos.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar os níveis séricos de CT, HDL, LDL, TG e da glicose nos indivíduos envolvidos no estudo antes e após administração de Rosuvastatina;
- Investigar os níveis das citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ e da citocina anti-inflamatória, IL-10, nos indivíduos envolvidos no estudo antes e após administração de Rosuvastatina;
- Determinar os níveis das proteínas de fase aguda PCR, AGP e F nos indivíduos envolvidos no estudo antes e após o uso de Rosuvastatina;
- Avaliar a ativação da fibrinólise através da mensuração dos níveis de D-Dímero nos indivíduos envolvidos no estudo antes e após o uso de Rosuvastatina;
- Analisar os diferentes genótipos da MnSOD na modulação de marcadores inflamatórios e fibrinolíticos

3 RESULTADOS

Os resultados, assim como a metodologia utilizada neste estudo, estão organizados sob forma de um manuscrito científico submetido para publicação na revista The Pharmacogenomics Journal (fator de impacto 5.513).

Título: Rosuvastatin effects on lipid-lowering, inflammatory, antioxidant and fibrinolytic blood biomarkers are influenced by Ala16Val superoxide dismutase manganese dependent gene polymorphism

Autores: Thiago Duarte, Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Fernanda Barbisan, Dianni Capelleto, Rafael Noal Moresco, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte

Rosuvastatin effects on lipid-lowering, inflammatory, antioxidant and fibrinolytic blood biomarkers are influenced by Ala16Val superoxide dismutase manganese dependent gene polymorphism

Thiago Duarte^a, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^b, Fernanda Barbisan^a, Dianni Capelleto^a, Rafael Noal Moresco^c, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte^{ad}

^a PGP Pharmacology, Biogenômica Laboratory, Federal University of Santa Maria (UFSM)

^b Department of Morphology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM)

^c Department of Clinical and Toxicological Analysis, Center of Health Sciences, Labiclin Laboratory, Federal University of Santa Maria (UFSM)

^d Center of Health Sciences, Lutheran University of Brazil (ULBRA)

Abstract

Rosuvastatin, a cholesterol lowering drug that also attenuates inflammatory process and oxidative stress mainly by reduction of superoxide anion production. Superoxide anion is metabolized by manganese-dependent superoxide dismutase (MnSOD or SOD2) that act into mitochondria. In humans, there is a gene polymorphism where a change of valine (Val) to alanine (Ala) occurs at the 16th amino acid (Ala16Val-SOD2). The VV genotype has been associated with the risk of developing several metabolic diseases, such as hypercholesterolemia. Thus, in order to explore this phenomenon further, this study investigated the influence of Ala16Val-SOD2 polymorphism on the lipid profile, inflammatory and fibrinolytic biomarkers of 122 hypercholesterolemic patients undergoing the first pharmacological cholesterol-lowering therapy that were treated with 20 mg rosuvastatin for 120 days. The findings indicate that the VV patients that present a low-efficient SOD2 enzyme exhibit attenuated response to rosuvastatin compared to the A allele patients. The rosuvastatin effect on inflammatory and fibrinolytic biomarkers was also less intense in the VV patients. These results suggest some pharmacogenetic effects of Ala16Val-SOD2 in hypercholesterolemia treatment using rosuvastatin.

Introduction

Statins were originally developed for their LDL cholesterol-lowering effects, but are now thought to improve cardiovascular morbidity and mortality through pleiotropic effects, antioxidant, anti-inflammatory and antiplatelet properties.¹ Among these is rosuvastatin, a synthetic hydrophilic statin, which is the most potent inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase enzyme. This statin undergoes relatively little metabolism by the hepatic CYP system; it has a moderate degree of systemic bioavailability and a relatively long elimination half-life.² Rosuvastatin has been studied in clinical trials involving 46,000 patients and the results obtained have shown its efficacy and safety in patients with a broad range of demographic and clinical characteristics, including younger and elderly patients, men and women, and accompanied those exposed to other risk factors or suffering from concomitant diseases.³

Prior investigations have shown that reactive oxygen species (ROS) that generate oxidative stress and inflammation processes are potent target sites for

rosuvastatin. This drug attenuates oxidative stress, mediating several antioxidant effects by reduction of NADPH oxidase levels, decreasing superoxide anion production.⁴ Rosuvastatin also up-regulates antioxidant enzymes, decreasing genotoxic effects caused by high hydrogen peroxide (H_2O_2) levels.^{5,6} Therefore, rosuvastatin effects are considered very important to the maintenance of the redox-state of the cells of the vascular wall, and thus helps in decreasing the atherogenesis process.

However, the potential pharmacogenetic effect of rosuvastatin with respect to its ability to alter the basal oxidative metabolism of the individuals remains to be explored. Presently it is believed to be due to the presence of functional genetic polymorphism in molecules participating in the enzymatic antioxidant system. Human beings present a polymorphism in the manganese-dependent superoxide dismutase (MnSOD or SOD2) gene located in nuclear DNA.

SOD2 enzyme is considered a vital enzyme since it dismutates superoxide anion production hydrogen peroxide (H_2O_2) mitochondria. Further, its intermediary molecule is catalyzed in H_2O_2 and O_2 by the glutathione peroxidase (GPX) enzyme. The relevance of SOD2 enzyme primarily pertains to the control of superoxide anion levels in mitochondria. Extant evidence indicates that increased superoxide anion production is a feature of vascular disease states, including atherosclerosis, hypertension and diabetes.⁷ In addition, nitric oxide scavenging by superoxide reduces the bioactivity of nitric oxide and produces peroxynitrite, a strong oxidant molecule that nitrosylates cellular proteins and lipids.⁸

The functional single nucleotide polymorphism (SNP) occurs via change of alanine (Ala) to valine (Val) at the 16th amino acid (the 16th amino acid from the beginning of the signal sequence, or the 9th amino acid from the first amino acid of the mature protein) of the SOD2 (Ala16Val-SNP) signal sequence. This is believed to change the secondary structure of the premature protein and therefore the mitochondrial targeting of the enzyme.⁹ In vitro investigations performed using the import of chimeric proteins in mice showed that, compared to the Val-SOD2 precursor, the Ala-SOD2 precursor generated 30-40% more of the active processed matrical SOD2 homotetramer. In this case, Ala-SOD2/MTS allows efficient SOD2 import into the mitochondrial matrix, while the Val-variant causes partial arrest of the precursor within the inner membrane and decreased formation of the active SOD2 homotetramer in the mitochondrial matrix.¹⁰

Previous investigations have associated V allele and/or VV genotype with several metabolic chronic dysfunctions and diseases¹¹, including hypercholesterolemia¹², obesity¹³, and elevated levels of oxidized LDL^{14,15} inflammatory cytokines, such as interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interferon gamma (IFN γ), as well as to the reduction in the anti-inflammatory Interleukin 10 (IL-10) levels.¹⁶ An association between the V allele and presence of carotid atherosclerosis¹⁷, as well as with type 2 diabetes development¹⁸ and diabetes complications.^{19,20,21,22,23} was also described. In addition, an *in vitro* study also yielded findings suggesting that VV genotypes present an impaired anti-inflammatory response to methotrexate (MTX), a drug used in the treatment of autoimmune diseases, such as psoriasis and rheumatoid arthritis.²⁴

In order to gain a better understanding of these relationships, the present study aimed to investigate whether Ala16Val-SNP was associated with response to rosuvastatin therapy. This was achieved by evaluating the effect on lipid profile, inflammatory and fibrinolytic biomarkers in diagnosed hypercholesterolemic subjects undergoing the first pharmacological cholesterol-lowering therapy. Using multivariate analysis, we also sought to establish if these results are influenced by sex, age and body mass index (BMI= Kg/m²) of patients.

Material & Methods

Setting and study sample

This study is a part of a broader research project in which gene environmental interaction associated with aging processes and chronic diseases (Genesis project) was analyzed. The research was developed in a free-living populations from Southern Brazilian Region²⁵, and included an investigation conducted by Duarte et al.¹², which described the association between Ala16Val-SNP and hypercholesterolemia. All study participants provided their written informed consent

and this protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (number 23081.009087/2008).

Figure 1 presents the general experimental design of the study discussed in this work. The sample consisted of 122 hypercholesterolemic individuals (41 AA, 41 VV and 40 AV genotypes) that have not previously undergone pharmacological cholesterol lowering therapy. All patients were diagnosed in the period between 1 January 2013 and December 2014 and were prospectively enrolled at LABIMED, located in Santa Maria-RS, Brazil. All study participants had high cholesterol levels, ranging from ≥ 240 to 529 mg/dL (6.47–13.70 mmol/L) and LDL cholesterol ≥ 160 mg/dL (4.15 mmol/L). We used a maximum value of 529 mg/dL to decrease the possibility of including individuals with familial hypercholesterolemia, who typically present with very high levels of total cholesterol.²⁶ The exclusion criteria were previous coronary disease, stroke, neoplasias, morbid obesity (>35 kg/m²), type 2 diabetes, and metabolic syndrome. Individuals undergoing hypolipemic treatment or taking anti-inflammatory or other medications that could alter cholesterol levels were also excluded, as were smokers and carriers of other diseases or dysfunctions that could influence the data obtained. Patients' weight (in kilograms) and height (in meters) was obtained using a mechanical scale with a tape measure. This allowed their BMI to be calculated by dividing the weight in kilograms by the square of the height in meters (kg/m²). The systolic and diastolic blood pressure (SBP and DBP, respectively) were measured using a mercury sphygmomanometer with an adequate cuff for the right arm circumference. Each participant remained at rest (sitting) for at least 5 minutes prior to the measurements.²⁴ Figure 1 here

Outcome

In this study, the outcome of interest was the effect of a 120 day therapy consisting of daily 20 mg dose of rosuvastatin on patients' lipid profile (mainly total and LDL cholesterol) response, as well as on the modulation of other lipid molecules (HDL cholesterol and triglycerides), glucose and several inflammatory and fibrinolytic biomarkers, influenced by Ala16Val-SOD2 SNP. To analyze the pharmacogenetic influence, the reductions in these biochemical variables among subjects grouped by genotypes were determined. These were calculated as the difference between the

last measurement before starting the statin therapy and the first measurement after its completion. The differences between these two values were presented as a percentage of the basal values of each variable.

Covariables

Age, sex and BMI were considered as potential confounders or effect modifiers in the association between the Ala16Val-SOD2 polymorphism and the change in lipid and other biochemical biomarkers investigated here.

Ala16Val-SOD2 genotyping

At baseline examination of the volunteers, the Ala16Val-SOD2 genotyping was determined by polymerase chain reaction using a direct total blood cell sample and Tetra-Primer ARMS-PCR assay, as described by Ruiz-Sanz et al.²⁷ with slight modifications. Briefly, two primer pairs were used to amplify and determine the genotype of a DNA fragment containing the Ala16Val polymorphism in the human SOD2 sequence. The 3'-end of the allele-specific primers was underlined (lowercase bases indicate the introduced mismatches). The PCR reaction was carried out in a total volume of 40 μ L containing 20–40 ng of genomic DNA as the template, 0.5 μ M of each primer, 100 μ M of each dNTP, 1.25 mM of MgCl₂, PCR buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl), 5% dimethyl sulfoxide (DMSO), and 1.25 units of DNA polymerase. The PCR amplification was carried out with an initial denaturation at 94 °C for 7 minutes, followed by 35 cycles of 60 seconds of denaturation at 94 °C, 20 seconds of annealing at 60 °C, and 30 seconds of extension at 72 °C, which were followed by additional 7 minutes of extension at 72 °C at the end of the final cycle. A 20- μ L aliquot of the PCR products was mixed with 6 μ L of loading buffer and resolved by electrophoresis in a 1.5% agarose gel. This procedure resulted in three bands in heterozygotes (514, 366, and 189 bp) and two bands in homozygotes (Val/Val resulting in bands of 514 and 189 bp, and Ala/Ala resulting in bands of 514 and 366 bp).

Laboratory analyses

Blood samples from volunteers obtained before and after rosuvastatin treatment were collected by venous puncture into gray and red top Vacutainers® (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes, after 12 h overnight fasting. Plasma was used to measure the levels of fasting glucose and serum total cholesterol, and triglyceride concentrations were measured by applying standard enzymatic methods by use of Ortho-Clinical Diagnostics® reagents on the fully automated analyzer (Vitros950®dry chemistry system; Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA). High-density lipoprotein cholesterol was measured in the supernatant plasma after the precipitation of apolipoprotein-B containing lipoproteins with dextran sulfate and magnesium chloride, as previously described.²⁸ Low-density lipoprotein cholesterol was estimated using the Friedewald equation.²⁹ Plasma-citrate was collected for the subsequent analysis of coagulation parameters. The D-dimer and fibrinogen levels were measured by immunoturbidimetric method on Cobas INTEGRA 400® (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

The following inflammatory metabolism biomarkers were measured: high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) determined by nephelometry (DadeBehring, Newark, DE, EUA); Inflammatory cytokines interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF α), interferon gamma (IFN γ) and anti-inflammatory cytokine interleukin 10 (IL-10) quantified using the Quantikine Human, according to the manufacturer's instructions. Briefly, all reagents and working standards were prepared and the excess microplate strips were removed. The assay diluent RD1W was added (50 μ L) to each well. Further, 100 μ L of standard control for our sample was added per well, after which the well was covered with the adhesive strip and incubated for 1.5 hours at room temperature. Each well was aspirated and washed twice for a total of three washes. The antiserum of each molecule analyzed here was added to each well and covered with a new adhesive strip before being incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated, after which the caspase-1 conjugate (100 μ L) was added to each well and incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated before adding 200 μ L of substrate solution to each well and incubating for 20 min at room temperature. Finally, 50 μ L of stop solution was added to each well and the optical density was determined within 30 min using a microplate reader set to 450 nm.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using SPSS software program (Version 19.0). Initially, the lipid, inflammatory and fibrinolytic variables were compared among hypercholesterolemic carriers of different Ala16Val-SOD2 genotypes (AA, VV and AV) using analysis of variance, followed by Bonferroni *post hoc* test. A second analysis was performed to evaluate whether rosuvastatin response was influenced by the polymorphism investigated here using analysis of variance two-one, followed by Bonferroni *post hoc* test or paired Student's t-test. A multivariate analysis using logistic regression (Backward Wald Model) was also performed to observe the potential influence of sex, age and BMI, as the intervenient variables. The $p < 0.05$ values were considered significant.

Results

The mean age of the study sample was 45.7 ± 11.2 years old (minimum = 23; maximum = 70). Moreover, 50.8% ($n=62$) of the patients were male and 49.2% ($n=60$) were female. The sex and age were similar among patients with different Ala16Val-SOD2 genotypes. Comparisons of biochemical variables among hypercholesterolemic subjects were firstly performed and the results are presented in Table 1. Hypercholesterolemic carriers of VV genotype presented higher levels of SBP, total cholesterol, LDL cholesterol, IL-1, IL-6, TNF α , α -acid glycoprotein and d-dimer compared to the A allele (AA and AV) carriers. On the other hand, VV patients also presented lower HDL cholesterol and IL-10 levels compared to the AA and AV carriers.

Table 1 here

As expected, rosuvastatin lowered the lipid levels after 120 days of treatment. However, the intensity of response was significantly influenced by Ala16Val-SOD2 polymorphism (Table 2). More specifically, in AA carriers, a high response to rosuvastatin on total cholesterol, as well as HDL and LDL cholesterol, was noted. On the other hand, the VV group showed a less pronounced response to statin

treatment, whereas heterozygous subjects presented an intermediary response when compared to the homozygous individuals. Glucose levels did not change in all participants, independent of the Ala16Val-SOD2 genotype.

Rosuvastatin exhibited a lowering effect on the inflammatory biomarkers analyzed here. However, the intensity of its effect was influenced by the Ala16Val-SOD2 polymorphism. Hs-PCU levels decreased by approx.30-40% when compared to the basal levels in all patients treated with rosuvastatin during the first 90 days ($p=0.001$). The lowering effect on the IL-1 cytokine was more intense in the AA- than V-allele group ($p=0.001$). On the other hand, lower IL-6 cytokine, TNF α and Interferon γ concentrations were observed in VV relative to the A-allele group ($p=0.001$). All patients presented an increase in the IL-10 levels after completing the rosuvastatin treatment. However, this effect was more pronounced in the AA than in the V-allele group ($p=0.001$). The concentration of fibrinolytic biomarkers did not change in the VV individuals treated with rosuvastatin, where as, in the A-allele group, in the concentration of α -acid glycoprotein, d-dimer and fibrinogen decreased relative to the basal levels ($p=0.001$).

Table 2 here

A multivariate analysis was performed to establish if the low responsiveness to rosuvastatin associated with the VV genotype was independent of gender, age and BMI. As can be seen in Table 3, the association between the VV group's low response to rosuvastatin in terms of the total cholesterol, HDL cholesterol and triglyceride levels was maintained independent of these variables. On the other hand, the lowering effect of rosuvastatin on the LDL cholesterol level was effective and exhibited similar intensity among subjects with different Ala16Val-SOD2 genotypes.

Table 3 here

Discussion

Rosuvastatin is a drug considered to provide potential benefits in reducing the risk factors for many diseases by its potent lowering effect, mainly on LDL cholesterol and triglyceride levels. Its effects involve maintenance of the balance between

oxidant production and oxidant scavenging molecules.¹ For this reason, this study aimed to ascertain whether a basal oxidative imbalance related to a human SNP mutation in the MTS target sequence of the SOD2 gene could affect the rosuvastatin response. To test this hypothesis, we selected hypercholesterolemic patients that were carriers of different Ala16Val-SOD2 genotypes as study participants. These individuals were treated with rosuvastatin for 120 days. Our results showed that, despite the general lowering effect of rosuvastatin observed in the patients, the intensity of this effect was directly influenced by Ala16Val-SOD2. More specifically, VV genotype carriers presented a less effective response in lipid levels when compared to the A-allele carriers (AA and AV groups). These results are mostly in agreement with those obtained in previous investigations that described the association between the VV genotype and high levels of lipid and oxidant biomarkers in hypercholesterolemic¹² and obese individuals.¹³

In contrast, AA patients' lipid profile presented an intense response to rosuvastatin, which was in line with the levels reported in previous investigations. Authors of several extant studies have estimated that statins could decrease the LDLcholesterol level by 37-57% in patients with primary hypercholesterolemia^{29,30,31,32}. In the present case, when AA patients were treated with 20 mg rosuvastatin, this lowered their LDL cholesterol levels by 52% in comparison with the basal level observed on day zero. The differential response to rosuvastatin treatment is in line with the view shared by Simon et al., who noted that the magnitude of LDLcholesterol response is related to genotypic, phenotypic, demographic and as yet unexplained characteristics.³³

In genetic terms, evidences suggests that around 50% of the variability in the LDL cholesterol plasma is associated with some type of genetic inheritance.³⁴ However, thus far, pharmacogenetic studies have primarily focused on lowering the LDL cholesterol associated with statin therapy. Thus, most of the work in this field has been conducted on genes related to cholesterol synthesis, lipoprotein lipid transport and some other genes associated with lipid metabolism, such as Apolipoprotein E.³⁵ In these terms, the results presented here may imply that genetically caused oxidative imbalance affects the pharmacological response to rosuvastatin treatment.

Rosuvastatin has anti-atherogenic properties due to its hypolipemiant, anti-inflammatory and antioxidant effects.³⁶ However, it is interesting to note its different

effects on two Ala16Val-SOD2 homozygous genotypes (VV and AA) that exhibit imbalance in the levels of superoxide anion and hydrogen peroxide. The AA genotype produces an excess of hydrogen peroxide due high efficiency of the SOD2 enzyme. On the other hand, as VV genotype presents low SOD2 enzyme efficiency, this may cause a potential increase in the superoxide anion levels.¹¹

The greater impact of superoxide anion accumulation in the VV genotype is due the high affinity of this free radical with nitric oxide molecules generating peroxynitrite, a reactive nitrogen species (RNSs). This molecule causes an extensive lipoperoxidation of cellular membranes, thus decreasing, for example, endothelial function. This is recognized as an important indicator of the risk of developing cardiovascular diseases.¹¹

Our results also showed that inflammatory and fibrinolytic biomarkers were also affected by rosuvastatin in an Ala16Val-SOD2 genotype-dependent way. Again, VV individuals presented less anti-inflammatory and anti-fibrinolytic response when treated with rosuvastatin when compared to the AA patients. These results corroborate an investigation that described high levels of inflammatory cytokines produced by VV cells when compared to the A-allele cells.¹⁶ A recent *in vitro* study also described differential response of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to the exposition of methotrexate (MTX), a drug used to treat autoimmune diseases with high inflammatory grade, such as psoriasis and rheumatoid arthritis.³⁷

When our results are considered as a whole, noting some methodological constraints that include the relatively small number of participant, we have provided adequate evidence to suggest that the VV genotype from Ala16Val-SOD2 polymorphism is associated with some level of resistance to the lipid lowering effects of rosuvastatin.

References

- ¹ Mahalwar R, Khanna D. Pleiotropic antioxidant potential of rosuvastatin in preventing cardiovascular disorders. *Eur J Pharmacol.* 2013; **711**: 57-62.
- ² McTaggart F. Comparative pharmacology of rosuvastatin. *Atherosclerosis* 2003; **4**:9-14.

- ³ Nicholls SJ, Brandrup-Wognsen G, Palmer M, Barter PJ. Meta-analysis of comparative efficacy of increasing dose of Atorvastatin versus Rosuvastatin versus Simvastatin on lowering levels of atherogenic lipids (from VOYAGER). *Am J Cardiol*. 2010; **105**:69-76.
- ⁴ Haas MJ, Horani MH, Parseghian SA, Mooradian AD. Statins prevent dextrose-induced endothelial barrier dysfunction, possibly through inhibition of superoxide formation. *Diabetes* 2006; **55**:474-479.
- ⁵ Schupp N, Schmid U, Heidland A, Stopper H. Rosuvastatin protects against oxidative stress and DNA damage in vitro via upregulation of glutathione synthesis. *Atherosclerosis* 2008; **199**:278-287.
- ⁶ Laufs U, Gertz K, Dirnagl U, Böhm M, Nickenig G, Endres M. Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. *Brain Res*. 2002; **942**:23-30.
- ⁷ Huang J, Lin SC, Nadershahi A, Watts SW, Sarkar R. Role of redox signaling and poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase activation in vascular smooth muscle cell growth inhibition by nitric oxide and peroxynitrite. *J Vasc Surg*. 2008; **47**:599-607.
- ⁸ Muller G, Morawietz H. Nitric Oxide, NAD(P)H Oxidase and Atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal*. 2009; **11**: 1711-1731.
- ⁹ Johnson P. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2002; **133**: 493-505.
- ¹⁰ Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; **226**: 561-565.
- ¹¹ Bresciani G, Cruz IB, de Paz JA, Cuevas MJ, González-Gallego J. The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. *Free Radic Res*. 2013; **47**: 781-792.
- ¹² Duarte MM, Moresco RN, Duarte T, et al. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. *Clin Biochem*. 2010; **43**: 1118-1123.
- ¹³ Montano MA, Barrio Lera JP, Gottlieb MG, Schwanke CH, Da Rocha MI, Manica Cattani MF, et al. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. *Mol Cell Biochem*. 2009; **32**: 33-40.
- ¹⁴ Gottlieb MG, Schwanke CH, Santos AF, Jobim PF, Müssel DP, da Cruz IB. Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms,

and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. *Genet Mol Res*. 2005; **4**: 691-703.

¹⁵ Fujimoto H, Kobayashi H, Ohno M. Age-induced reduction in mitochondrial manganese superoxide dismutase activity and tolerance of macrophages against apoptosis induced by oxidized low density lipoprotein. *Circ J*. 2010; **74**: 353-360.

¹⁶ Montano MA, da Cruz IB, Duarte MM, et al. Inflammatory cytokines in vitro production are associated with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism of peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine*. 2012; **60**: 30-33.

¹⁷ Kakko S, Päivänsalo M, Koistinen P, Kesäniemi YA, Kinnula VL, Savolainen MJ. The signal sequence polymorphism of the MnSOD gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2003; **168**:147-152.

¹⁸ Nakanishi S, Yamane K, Ohishi W, et al. Manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism is associated with the development of type 2 diabetes in Japanese-Americans. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008; **81**: 381-385.

¹⁹ Chen H, Yu M, Li M, et al. Polymorphic variations in manganese superoxide dismutase (MnSOD), glutathione peroxidase-1 (GPX1), and catalase (CAT) contribute to elevated plasma triglyceride levels in Chinese patients with type 2 diabetes or diabetic cardiovascular disease. *Mol Cell Biochem*. 2012; **363**: 85-91.

²⁰ Möllsten A, Jorsal A, Lajer M, Vionnet N, Tarnow L. The V16A polymorphism in SOD2 is associated with increased risk of diabetic nephropathy and cardiovascular disease in type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2009; **52**: 2590-2593.

²¹ Hovnik T, Dolzan V, Bratina NU, Podkrajsek KT, Battelino T. Genetic polymorphisms in genes encoding antioxidant enzymes are associated with diabetic retinopathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2009; **322**: 258-262.

²² Kangas-Kontio T, Vavuli S, Kakko SJ, et al. Polymorphism of the manganese superoxide dismutase gene but not of vascular endothelial growth factor gene is a risk factor for diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*. 2009; **93**:1401-1406.

²³ Möllsten A, Marklund SL, Wessman M, et al. A functional polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene and diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2007; **56**: 265-269.

²⁴ Fujimoto H, Kobayashi H, Ohno M. Age-induced reduction in mitochondrial manganese superoxide dismutase activity and tolerance of macrophages against apoptosis induced by oxidized low density lipoprotein. *Circ J*. 2010; **74**: 353-360.

- ²⁵ Taufer M, Peres A, de Andrade VM, et al. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? *J Gerontol A BiolSci Med Sci*. 2005; **60**:432-438.
- ²⁶ Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease: a HuGE association review. *Am J Epidemiol*. 2004; **160**: 421-429.
- ²⁷ Ruiz-Sanz JI, Aurrekoetxea I, Matorras R, Ruiz-Larrea MB. Ala16Val SOD2 polymorphism is associated with higher pregnancy rates in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*. 2011; **95**:1601-1605.
- ²⁸ Bachorik PS, Albers JJ. Precipitation methods for quantification of lipoproteins. *Methods Enzymol*. 1986; **129**:78-100.
- ²⁹ Jones P, Kafonek S, Laurora I, Hunninghake D. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). *Am J Cardiol* 1998; **81**: 582–587.
- ³⁰ Stein EA, Davidson MH, Dobs AS, et al. Efficacy and safety of simvastatin 80 mg/day in hypercholesterolemic patients. The Expanded Dose Simvastatin U.S. Study Group. *Am J Cardiol*. 1998; **82**: 311-316.
- ³¹ Ballantyne CM, Weiss R, Moccetti T, et al. Efficacy and safety of rosuvastatin 40 mg alone or in combination with ezetimibe in patients at high risk of cardiovascular disease (results from the EXPLORER study). *Am J Cardiol*. 2007; **99**:673–680.
- ³² Sacks FM, Moye LA, Davis BR, et al. Relationship between plasma LDL concentrations during treatment with pravastatin and recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events trial. *Circulation*. 1998; **97**: 1446-1452.
- ³³ Simon JA, Lin F, Hulley SB, et al. Phenotypic predictors of response to simvastatin therapy among African–Americans and Caucasians: the Cholesterol and Pharmacogenetics (CAP) Study. *Am J Cardiol*. 2006; **97**:843-850.
- ³⁴ Burnett JR, Hooper AJ. Common and rare gene variants affecting plasma LDL cholesterol. *Clin Biochem Rev*. 2008; **29**:11-26.
- ³⁵ Thompson JF, Hyde CL, Wood LS, et al. Comprehensive whole-genome and candidate gene analysis for response to statin therapy in the Treating To New Targets (TNT) Cohort. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009; **2**:173-181.
- ³⁶ Ihu M, Tomlinson B. Current Perspectives on rosuvastatin. *Integr Blood Press Control*. 2013; **6**: 15-25.

³⁷ Barbisan F, Motta J de R, Trott A, Azzolin V, Dorneles EB, Marcon M, Eet al. Methotrexate-Related Response on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells May Be Modulated by the Ala16Val-SOD2 Gene Polymorphism. *PLoS One*. 2014; **9**: e107299.

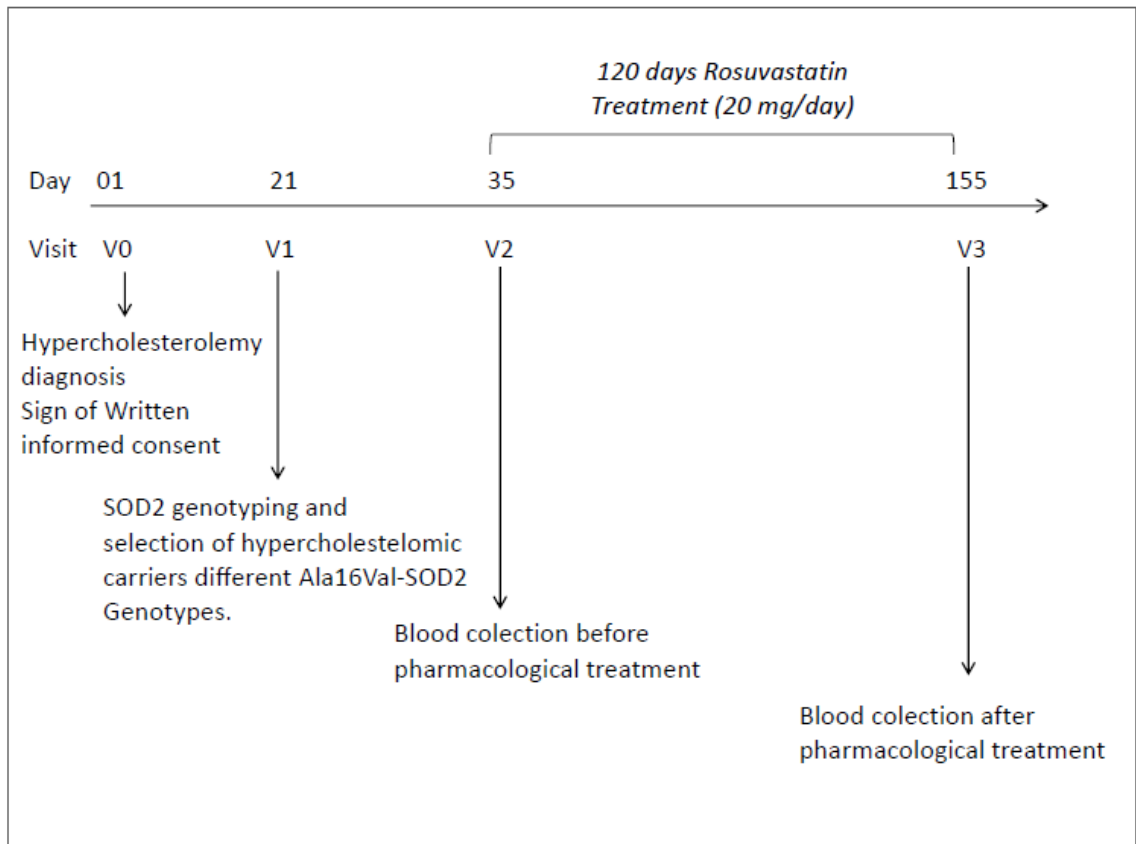
LEGEND FIGURE**Figure 1** General experimental design of the study

Table 1 Comparison among several biological and biochemical variables of hypercholesterolemic subject's carrier's different Ala16Val-SOD2 genotypes.

Variables	SOD2 Genotypes			<i>p</i>
	AA Mean ± SD	VV Mean ± SD	AV Mean ± SD	
BMI (Kg/m ²)	22.4±2.3 ^a	22.5±2.7 ^a	22.5±4.7 ^a	0.98
SPB (mmHg)	118.5±4.7 ^a	122.2±7.2 ^b	120.2±5.3 ^a	0.02
DBP (mmHg)	78.5±4.7 ^a	101.4± 6.4 ^a	80.2± 5.3 ^a	0.29
Cholesterol (mg/dL)	281.6±20.8 ^a	320.3±53.1 ^b	300.6±63.0 ^a	0.02
HDL-cholesterol (mg/dL)	46.2±10.8 ^a	36.95±14.0 ^b	42.23±11.4 ^{ab}	0.03
LDL-cholesterol (mg/dL)	200.4±24.4 ^a	242.2±57.6 ^b	213.1±71.4 ^a	0.03
Triglycerides(mg/dL)	174.1±45.1 ^a	205.9±82.1 ^a	226.3±87.3 ^a	0.14
Glucose (mg/dL)	82.7±9.0 ^a	81.7±9.0 ^a	81.8±7.8 ^a	0.85
PCU	1.6±1.5 ^a	2.30±1.8 ^a	1.77±1.4 ^a	0.17
Interleukin 1	175.9±66.8 ^a	269.3±54.7 ^b	175.73±45.0 ^a	0.0001
Interleukin 6	192.1±67.0 ^a	315.6±47.4 ^b	186.53±48.2 ^a	0.0001
TNFα	206.6±76.3 ^a	335.3±61.8 ^b	224.13±46.9 ^a	0.0001
Interferon gama	229.5±80.2 ^a	398.6±59.1 ^b	305.90±43.9 ^c	0.0001
Interleukin 10	65.1±20.3 ^a	37.6±10.0 ^b	71.3±13.3 ^a	0.0001
Alpha	110.8±33.7 ^a	161.7±25.9 ^b	119.33±8.0 ^a	0.0001
Fibrinogen	318.9±94.7 ^a	334.0±87.8 ^b	322.1±41.1 ^b	0.657
d-dimer	474.0±141.7 ^a	622.7±200.8 ^b	500.3±75.7 ^a	0.0001

SBP= systolic blood pressure; DBP= diastolic blood pressure; SD= standard deviation; p value= determined by analysis of variance followed by Bonferroni *post hoc* test. Different letters indicate significant differences among genotypes to each variable investigated.

Table 2 Impact of Ala16Val-SOD2 polymorphism on rosuvastatin response of lipid, glicemic, inflammatory and fibrinolytic biomarkers

Variables	AA		VV		AV	
	Mean \pm SD	% of basal value	Mean \pm SD	% of basal value	Mean \pm SD	% of basal value
Cholesterol total (mg/dL)	175 \pm 31	62	292 \pm 40	91	254 \pm 39	84
LDL-cholesterol (mg/dL)	105 \pm 43	52	215 \pm 47	88	176 \pm 40	82
HDL-cholesterol (mg/dL)	57 \pm 9	124	42 \pm 8	116	45 \pm 8	107
Triglycerides (mg/dL)	94 \pm 40	54	169 \pm 71	82	162 \pm 68	71
Glucose (mg/dL)	79 \pm 8	95	80 \pm 6	97	80 \pm 5	97
Protein C reactive	1 \pm 0.9	59	1.5 \pm 1	63	1.2 \pm 0.8	70
Interleukin 1	120 \pm 30	68	260 \pm 55	96	160 \pm 34	91
Interleukin 6	147 \pm 38	76	303 \pm 43	43	170 \pm 36	92
TNF α	163 \pm 32	79	331 \pm 61	61	196 \pm 34	87
Interferon γ	204 \pm 36	89	382 \pm 65	65	263 \pm 38	86
Interleukin 10	112 \pm 19	173	41 \pm 9	109	90 \pm 10	127
Alpha	61 \pm 30	64	157 \pm 25	97	85 \pm 11	72
d-dimer	315 \pm 103	67	329 \pm 86	99	284 \pm 25	88
Fibrinogen	218 \pm 71	68	621 \pm 183	99	406 \pm 55	81

SD= standard deviation; % of basal value was calculated based in the value observed after 120 days rosuvastatin treatment in relation to value observed before start the treatment.

Table 3 Multivariate analysis of association between VV-subjects and low response to rosuvastatin treatment when compared to A-allele subjects

Variables	Wald	p-Value
Cholesterol total	11.899	0.001
HDL-cholesterol	4.980	0.026
LDL-cholesterol	0.161	0.698
Triglycerides	6.454	0.011
Age	0.524	0.469
Gender	0.002	0.964
BMI	0.172	0.679
SBP	0.166	0.684
DBP	0.001	0.971

Analysis included sex, age and body mass index (BMI) as potential intervenient variables in the differential response of VV-genotype to rosuvastatin treatment. The multivariate analysis was performed using the percent of lipid values after 90 days treatment in relation to basal values (0 day).

4 DISCUSSÃO

A Rosuvastatina é um fármaco que pode diminuir os fatores de risco de muitas doenças, especialmente pela redução nos níveis de LDL e TG. Esse efeito ocorre devido a manutenção do equilíbrio entre a produção de moléculas oxidante e antioxidantes (MAHALWAR & KHANNA, 2013). Por esta razão, este estudo teve como objetivo verificar se um desequilíbrio oxidativo basal relacionado a uma mutação de polimorfismo de nucleotídeo simples humana SNP na seqüência alvo MTS do gene da MnSOD poderia afetar a resposta da rosuvastatina. Para testar esta hipótese, 122 pacientes hipercolesterolêmicos portadores de diferentes genótipos de Ala16Val-SOD2 foram selecionados como participantes do estudo, os quais foram tratados com rosuvastatina por 120 dias.

Nossos resultados mostraram que, apesar do efeito geral observado da rosuvastatina nos pacientes, a intensidade do mesmo foi diretamente influenciada por este polimorfismo, onde os portadores do genótipo VV apresentaram uma menor resposta efetiva nos níveis lipídicos quando comparados com portadores do alelo A-SOD2 (Grupos AA e AV). Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos em investigações prévias que descreveram a associação entre o genótipo VV e os altos níveis de lipídios e biomarcadores oxidantes em indivíduos obesos (MONTANO et al., 2009) e hipercolesterolêmicos (DUARTE et al., 2010).

Em contraste, o perfil lipídico dos pacientes AA apresentou uma resposta satisfatoriamente efetiva a rosuvastatina. Autores de muitos estudos estendidos tem estimado que as estatinas poderiam diminuir os níveis de LDL em 37% a 57% em pacientes com hipercolesterolemia primária (JONES et al., 1998; SACKS et al., 1998; STEIN et al., 1998; BALLANTYNE et al., 2007). No presente caso, quando pacientes AA foram tratados com rosuvastatina, houve uma redução nos níveis de LDL em 52% em comparação com o nível basal observado no dia zero. A resposta diferencial para o tratamento com rosuvastatina está na linha de visão compartilhada por Simon e colaboradores (2006) que notou que a magnitude nas respostas de LDL está relacionada com características genótípicas, fenotípicas, demográficas e ainda não explicada.

Em termos genéticos, evidências sugerem que cerca de 50% da variabilidade nos níveis plasmáticos de LDL estão associados com algum tipo de herança genética (BURNETT & HOOPER, 2008). No entanto, até agora, estudos farmacogenéticos tem focado na redução de LDL associado com terapia utilizando estatinas. Assim, vários estudos

têm sido conduzidos analisando a influência de genes envolvidos em síntese do colesterol, transporte de lipoproteínas e em alguns outros genes associados com o metabolismo lipídico na resposta a estatinas (THOMPSON et al., 2009).

Nestes termos, os resultados apresentados aqui podem implicar que um desequilíbrio oxidativo causado geneticamente afeta a resposta farmacológica ao tratamento com rosuvastatina.

A Rosuvastatina possui propriedades anti-aterogênicas devido a seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (IHU & TOMLINSON, 2013). Contudo, é interessante notar sua diferença nos dois genótipos homocigotos de Ala16Val-SOD2 (AA e VV) que exibem desequilíbrio nos níveis de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . O genótipo AA produz H_2O_2 em excesso devido a alta eficiência da MnSOD. Por outro lado, como o genótipo VV apresenta baixa eficiência enzimática da MnSOD, pode induzir a um potencial aumento nos níveis de $O_2^{\bullet-}$ (BRESCIANI et al., 2013).

O maior impacto do acúmulo de $O_2^{\bullet-}$ no genótipo VV está de acordo com a alta afinidade deste radical livre com moléculas de ON gerando peroxinitrito, uma espécie reativa de nitrogênio (ERN). Esta molécula causa uma lipoperoxidação extensiva de membranas celulares, diminuindo assim, a função endotelial. Isto é reconhecido como um importante indicador de risco ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (BRESCIANI et al., 2013).

Nossos resultados também mostraram que biomarcadores fibrinolíticos e inflamatórios também foram afetados por rosuvastatina de uma maneira dependente do genótipo da Ala16Val-SOD2. Novamente, indivíduos VV apresentaram menor resposta antiinflamatória e antifibrinolítica quando tratados com rosuvastatina comparados aos pacientes AA.

Estes resultados corroboram uma investigação que descreveu altos níveis de citocinas inflamatórias em portadores VV quando comparados aos portadores do alelo A-SOD2 (MONTANO et al., 2012). Um recente estudo também descreveu respostas diferenciais de células mononucleares de sangue periférico (CMSPs) diante exposição de metotrexato (MTX) – uma droga usada para tratar doenças autoimunes com alto grau de inflamação, tais como psoríase e artrite reumatóide (BARBISAN et al., 2014).

Quando nossos resultados são considerados como um todo, observando algumas limitações metodológicas que incluem um número relativamente pequeno de participantes, nós conseguimos providenciar algumas evidências, as quais sugerem que o genótipo VV do polimorfismo Ala16Val-SOD2 está associado com algum nível de resistência diante a terapia de redução lipídica utilizando rosuvastatina.

5 CONCLUSÃO

- Após o tratamento com rosuvastatina os pacientes portadores do genótipo VV apresentaram menor redução do perfil lipídico (CT, LDL) e menores níveis de HDL quando comparados com os portadores do alelo A-SOD2 (AA e VV). Os níveis glicêmicos mantiveram-se inalterados entre os 3 genótipos.
- As concentrações dos marcadores inflamatórios (IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ) mantiveram-se superiores nos portadores VV E a citocina anti-inflamatória (IL-10) reduzida após o uso de rosuvastatina.
- Os portadores do genótipo VV antes e após a administração de rosuvastatina apresentaram níveis superiores de proteínas de fase aguda (PCR, AGP e F) comparativamente com o alelo A.
- Os indivíduos com genótipo VV apresentaram menor resposta antifibrinolítica o que explica os elevados níveis de D-dímeros nestes pacientes.
- Sugere-se que o genótipo VV do polimorfismo Ala16Val-SOD2 está associado com algum nível de resistência diante a terapia de redução lipídica utilizando rosuvastatina,

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

____. Manual do Operador Immulite 1000, (Catálogo), n. 90045-5597, USA, 2000.

____. Vitros Test Methodology Manual, (Catálogo), n. 832-1622, USA, 1997.

____. CRESTOR. Rosuvastatina Cálcica. Osaka, Japan, 2013. Bula de medicamento

ABBATE, R. et al. Thrombosis and Acute coronary syndrome. **Thromb Res**, v.129, n.3, p.235-240, 2012.

ADAM, S. S. et al. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. **Blood**, v.113, n. 13, p. 2878-2887, 2009.

ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.G. Enzymatic Determination of Total Cholesterol in Serum. **Clin Chem**, v.20, p.470, 1974.

ALGARVE, T. D. et al. *In vitro* effects of Ala16Val manganese superoxide dismutase gene polymorphism on human white blood cells exposed to methylmercury. **Genet Mol Res**, v.12, n.4, p.5134-5144, 2013.

AMORIN, F. G. et al. Bioquímica clínica da aterosclerose provocada por hiperhomocisteinemia. **Rev Eletr Farm**, v.8, n.1, p.36-59, 2011.

ANFOSSI, G. et al. Adipocytokines in atherothrombosis: focus on platelets and vascular smooth muscle cells, **Mediators Inflamm**, v.1, p.1-26, 2010.

ARMSTRONG, E. J.; MORROW, D. A.; SABATINE, M. S. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes: part I: introduction and cytokines. **Circulation**, v.113, p.72-75, 2006.

AUSTIN, M. A. et al. Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease: a HuGE association review. **Am J Epidemiol**, v.160, n.5, p.421-429, 2004.

BACHORIK, P. S.; ALBERS, J. J. Precipitation methods for quantification of lipoproteins. **Methods Enzymol.**, v.129, p.78-100, 1986.

BADIMÓN, L.; VILAHUR, G.; PADRÓ, T. Lipoproteins, platelets and atherothrombosis. **Rev Esp Cardiol**, v.62, p.1161-1178, 2009.

BAG, A.; BAG, N. Target Sequence Polymorphism of Human Manganese Superoxide Dismutase Gene and Its Association with Cancer Risk: A Review. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.17, n.12, p. 3298-3305, 2008.

BAIROVA, T.A. et al. Lipid Peroxidation and Mitochondrial Superoxide Dismutase-2 Gene in Adolescents with Essential Hyperten. **Bull Exp Biol Med**, v.158, n.8, p.141-144, 2014.

BALLANTYNE, C. M. et al. Efficacy and safety of rosuvastatin 40 mg alone or in combination with ezetimibe in patients at high risk of cardiovascular disease (results from the EXPLORER study). **Am J Cardiol**, v.99, n.5, p.673-680, 2007 [PubMed].

BARBISAN, F. et al. Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. **Plos One**. 2014 (ahead pub).

BICA, C. G. et al. Polymorphism (ALA16VAL) correlates with regional lymphnode status in breast cancer. **Cancer Genet Cytogenet**, v.196, p.153-158, 2010.

BINDER, C.J. et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis. **Nat Med**, v.8, n.11, p.1218-1226, 2002.

BRESCIANI, G. et al. The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. **Free Radic Res**, v.47, n.10, p.781-792, 2013.

BUCKETT, L.; BALLARD, P.; DAVIDSON, R. et al. Selectivity of ZD4522 for inhibition of cholesterol synthesis in hepatic versus non-hepatic cells. **Atherosclerosis**, v.151, n.1, p.41, 2000.

BURNETT, J. R.; HOOPER, J. R. Common and rare gene variants affecting plasma LDL cholesterol. **Clin Biochem Rev**, v.29, n.1, p.11-26, 2008.

CHARAKIDA, M. et al. Inflammatory and thrombotic processes are associated with vascular dysfunction in children with familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, v.204, n.1, p.532-537, 2009.

CHAROENSRI, N.; PORNRATANARANGSI, S. D-dimer plasma levels in NSTEMI-ACS patient. **J Med Assoc Thai**, v.94, n.1, p.S39-S45, 2011.

CHEN, H. et al. Polymorphic variations in manganese superoxide dismutase (MnSOD), glutathione peroxidase-1 (GPX1), and catalase (CAT) contribute to elevated plasma triglyceride levels in Chinese patients with type 2 diabetes or diabetic cardiovascular disease. **Mol Cell Biochem**, v.363, n.1-2, p.85-91, 2012.

CHEN, J. et al. C-reactive protein down-regulates endothelial nitric oxide synthase expression and promotes apoptosis in endothelial progenitor cells through receptor for advanced glycation end-products. **Gene**, v.496, n.2, p.128-135, 2012.

CHOPRA, N. et al. An elevated D-dimer value: a burden on our patients and hospitals. **Int J Gen Med**, v.5, n.1, p.87-92, 2012.

CHOWBAY B.; ZHOU S.; LEE E. J. An interethnic comparison of polymorphisms of the genes encoding drug-metabolizing enzymes and drug transporters: experience in Singapore. **Drug Metab Rev**, v.37, n.2, p.327-378, 2005.

COSTA, F. et al. Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. **Reprod BioMed Online**, v.24, n.4, p.474-481, 2012.

CORREALE, M. et al. Acute phase proteins in atherosclerosis (acute coronary syndrome). **Cardiovasc Hematol Agents Med Chem**, v.6, n.4, p.272-277, 2008.

DAVALOS, D.; AKASSOGLU, K. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. **Semin Immunopathol**, v.34, n.1, p.43-62, 2012.

DAVIDSON, M.H.; MA, P.T.S.; STEIN, E. et al. Rosuvastatin is superior to atorvastatin in decreasing low density lipoprotein cholesterol and increasing high-density lipoprotein cholesterol in patients with type IIa or IIb hypercholesterolemia. **J Am Coll Cardiol.**, v.37, p.292, 2001 [abstract].

DA SILVA, S.H.; MORESCO, R.N. Biomarcadores cardíacos na avaliação da síndrome coronariana aguda. **Sci Med**, v.21, n.3, p.132-142, 2011.

DEDOUSSIS, G. V. et al. Age-dependent dichotomous effect of superoxide dismutase Ala16Val polymorphism on oxidized LDL levels. **Exp Mol Med**, v.40, p.27-34, 2008.

DELLUC, A. et al. Venous thromboembolism in patients with pancreatic cancer: implications of circulating tissue factor. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v.22, n.4, p.295-300, 2011.

DUARTE, M. M. M. F. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. **FEBS J**, v. 274, p.2707-2714, 2007.

DUARTE, M.M.M.F. et al. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. **Clin Biochem**, v.43, n.13-14, p.1118-1123, 2010.

DURRINGTON, P.N. **Hyperlipidemia: diagnosis and management**. 3rd edition. Hodder Arnold: London, 2007.

ELLSWORTH J.A. et al. **Medical Drug Reference**. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2007.

ESCUDEIRO, P. Combined treatment with Bexarotene and Rosuvastatin reduces angiotensin-II-induced abdominal aortic aneurysm in apoE^{-/-} mice and angiogenesis. **Br J Pharmacol**, 2015 [Epub ahead of print].

FERREIRA, A. L.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas e sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Assoc Med Bras**, v.43, p. 61-68, 1997.

FORRESTER, J. S. et al. Increasing high-density lipoprotein cholesterol in dyslipidemia by cholesteryl ester transfer protein inhibition. **Circulation**, v.111, p. 1847-1854, 2005.

FORTUNATO, G.; Di TARANTO, M. D. Polymorphisms and the expression of genes encoding enzymes involved in cardiovascular diseases. **Clin Chim Acta**, v.381, p.21-25, 2007.

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

FUJIMOTO, H.; KOBAYASHI, H.; OHNO, M. Age-induced reduction in mitochondrial manganese superoxide dismutase activity and tolerance of macrophages against apoptosis induced by oxidized low density lipoprotein. **Circ J**, v.74, n.2, p.353-360, 2010

FUTTERMAN, L.G.; LEMBERG, L. Novel markers in the acute coronary syndrome: BNP, IL-6, PAPP-A. **Am J Crit Care**, v.11, n.1, p.168-172, 2002.

GAUTIER, E.; JAKUBZICK, C.; RANDOLPH, G.J. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.29, p.1412-1418, 2009.

GOTTLIEB, M.G. et al. Association among oxidized LDL levels, SOD2, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. **Genet Mol Res**, v.4, p.691-703, 2005.

GROSSER, N.; ERDMANN K.; HEMMERLE, A. et al. Rosuvastatin upregulates the antioxidant defense protein heme oxygenase-1. **Biochem Biophys Res Commun**, v.325, n.3, p.871-876, 2004.

GRUNDY, S.M. et al. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel 439 on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult 440 Treatment Panel III) final report. **Circulation**, v.106, n.1, p.3143-3421. 2002.

GRYN, S. E.; HEGELE, R. A. Pharmacogenomics, lipid disorders, and treatment options. **Clin Pharmacol Ther**, v.96, n.1, p.36-47, 2014.

HAAS, M. J. et al. Statins prevent dextrose-induced endothelial barrier dysfunction, possibly through inhibition of superoxide formation. **Diabetes**, v.55, n.2, p.474-479, 2006.

HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N Engl J Med**, v. 352, p.1685-1695, 2005.

HARRISON, D. et al. Role of oxidative stress in atherosclerosis. **Am J Cardiol**, v.91, p. 7A-11A, 2003.

HATZITOLIOS, A.I. et al. IMPROVE Collaborative Group. Implementation of strategy for the management of overt dyslipidemia: the IMPROVE-dyslipidemia study. **Int J Cardiol**, v.134, n.3, p.322-329, 2009.

HEINECKE, J. W. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidised low density lipoprotein hypothesis. **Arteriosclerosis**, v.141, p. 1-15, 1998.

HEISSIG, B. et al. New functions of the fibrinolytic system in bone marrow cell-derived angiogenesis. **Int J Hematol**, v.95, n.2, p.131-137, 2012.

HOLVOET, P. et al. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. **Circulation**, v.98, p.1487-1494, 1998.

HOPPE, B. et al. Fibrinogen and factor XIII A-subunit genotypes interactively influence C-reactive protein levels during inflammation. **Ann Rheum Dis**, v.71, n.7, p.1163-1169, 2012.

HOVNIK, T. Genetic polymorphisms in genes encoding antioxidant enzymes are associated with diabetic retinopathy in type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v.32, n.12, p.258-262, 2009.

HUANG, J. et al. Role of redox signaling and poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase activation in vascular smooth muscle cell growth inhibition by nitric oxide and peroxynitrite. **J Vasc Surg**, v.47, n.3, p.599-607, 2008.

INGELMAN-SUNDBERG, M. Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. **J Intern Med**, v.250, n.3, p.186-200, 2001.

IHU, M.; TOMLINSON, B. Current Perspectives on rosuvastatin. **Integr Blood Press Control**, v.6, p.15-25, 2013.

ISBIR, S. et al. Effect of Ala16Val genetic polymorphism of *MnSOD* on antioxidant capacity and inflammatory response in open heart surgery. **In Vivo**, v.22, n.1, p.147-151, 2008.

ISTVAN, E.S.; Deisenhofer, J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. **Science**, v.292, n.5519, p.1160-1164, 2001.

JONES, D. A. et al. Association between the rs4880 superoxide dismutase 2 (C>T) gene variant and coronary heart disease in diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Practice**, v.90, n.2, p.196-201, 2010.

JONES, P. et al. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). **Am J Cardiol**, v.81, n.5, p.582-587, 1998.

JOHNSON, P. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v.133, n.4, p.493-505, 2002.

KANGAS-KONTIO, T. et al. Polymorphism of the manganese superoxide dismutase gene but not of vascular endothelial growth factor gene is a risk factor for diabetic retinopathy. **Br J Ophthalmol**, v.93, n.10, p.1401-1406, 2009.

KAKKO, S. et al. The signal sequence polymorphism of the MnSOD gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v.168, n.1, p.147-152, 2003.

KATORI, N. et al. Genetic variations of orosomucoid genes associated with serum alpha-1-acid glycoprotein level and the pharmacokinetics of paclitaxel in Japanese cancer patients. **J Pharm Sci**, v.100, n.10, p.4546-4559, 2011.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2010.

KESIEME, E. et al. Deep vein thrombosis: a clinical review. **J Blood Med**, v.2, n.1, p.59-69, 2011.

KLEEMANN, R.; ZADELAAR, S.; KOOISTRA, T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. **Cardiovasc Res**, v.79, n.3, p.360-376, 2008.

KOMORI, H. et al. Characterization of hepatic cellular uptake of α 1-acid glycoprotein (AGP), part 2: Involvement of hemoglobin β -chain on plasma membranes in the uptake of human AGP by liver parenchymal cells. **J Pharm Sci**, v.101, n.4, p.1607-1615, 2012.

KOREN, M.; HUNNINGHAKE, D.B. ALLIANCE Investigators. Clinical outcomes in managed-care patients with coronary heart disease treated aggressively in lipid-lowering disease management clinics: the ALLIANCE study. **J Am Coll Cardiol**, v.44, n.9, p.72-79, 2004.

KOSTAPANOS, M. S. ; RIZOS, C. V. ; ELISAF, M. S. Benefit-risk assessment of rosuvastatin in the treatment of atherosclerosis and related diseases. **Drug Saf**. 2014 [Epub ahead of print].

KRAHULEC, B. Complications of obesity-pathogenesis. **Vnitr Lek**, v.56, p.1050-1052, 2010.

KUMAR, A.; KAR, S.; FAY, W.P. Thrombosis, physical activity, and acute coronary syndromes. **J Appl Physiol**, v.111, n.2, p.599-605, 2011.

LAUFS, U. et al. Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. **Brain Res.**, v.942, n.1-2, p.23-30, 2002.

LAUMEN, H.; SKURK, T.; HAUNER, H. et al. The HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin inhibits plasminogen activator inhibitor-1 expression and secretion in human adipocytes. **Atherosclerosis**, v.196, n.2, p.565–573, 2008.

LEBASTCHI, A.H. et al. Activation of human vascular cells decreases their expression of transforming growth factor-beta. **Atherosclerosis**, v.219, n.2, p.417-424, 2011.

LI, J. et al. Interferon- α priming promotes lipid uptake and macrophage-derived foam cell formation: A novel link between interferon- α and atherosclerosis in lupus. **Arthritis Rheum**, v.63, n.2, p.492-502, 2011.

LIBBY, P.; RIDKER, P.M.; HANSSON, G.K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature**, v. 473, n. 7347, p.317–325, 2011.

LIN, J. et al. The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in macrophage-derived foam-cell formation. **J Lipid Res**, v.51, n.5, p.1208-1217, 2010.

MACKESY, D.Z.; GOALSTONE, M.L. Insulin augments tumor necrosis factor-alpha stimulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vascular endothelial cells. **J Inflamm (Lond)**, v.17, n.1, p.8:34, 2011.

MAHALWAR, R.; KHANNA, D. Pleiotropic antioxidant potential of rosuvastatin in preventing cardiovascular disorders. **Eur J Pharmacol**, v.711, n.1-3, p.57-62, 2013.

MANN, K. G. et al. Blood coagulation dynamics in haemostasis. **Hamostaseologie**, v.29, n. 1, p.7-16, 2009.

MARTIN, P.D. et al. Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of rosuvastatin in healthy adult male volunteers. **Clin Ther**, v.25, n.11, p.2822-2835, 2003.

MATTES, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v.153, p.83-104, 2000.

MAYER, C.; GRUBER H.J.; LANDL E.M. et al. Rosuvastatin reduces interleukin-6 induced expression of C-reactive protein in human hepatocytes in a STAT3- and C/EBP-dependent fashion. **Int J Clin Pharmacol Ther**, v.45, n.6, p.319–327, 2007.

McTAGGART, F. Comparative pharmacology of rosuvastatin. **Atherosclerosis**, v.4, n.1, p.9-14, 2003.

METZGER, I. F.; SOUZA-COSTA, D. C.; TANUS-SANTOS, J. E. Farmacogenética: princípios, aplicações e perspectivas. **Rev Facul Med RPret**, v.39, n.4, p.515-521, 2006.

MÖLLSTEN, A. et al. A functional polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene and diabetic nephropathy. **Diabetes**, v.56, n.1, p.265-269, 2007.

MÖLLSTEN, A. et al. The V16A polymorphism in SOD2 is associated with increased risk of diabetic nephropathy and cardiovascular disease in type 1 diabetes. **Diabetologia**, v.52, n.12, p.2590-2593, 2009.

MONTAGNER, G. F. S. et al. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicol in Vitro**, v.24, n.5, p.1410-1416, 2010.

MONTANO, M. A. E. et al. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. **Mol Cell Biochem**, v.328, n.2-3, p.33-40, 2009.

MONTANO, M. A. E. et al. Inflammatory cytokines in vitro production are associated with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism of peripheral blood mononuclear cells. **Cytokine**, v.60, n.1, p.30-33, 2012.

MONTIEL, I. J. et al. SOD2 gene Val16Ala polymorphism is associated with macroalbuminuria in Mexican Type 2 Diabetes patients: a comparative study and meta-analysis. **BMC Med Genet**, v.14, p.110, 2013.

MOON, G.J et al. Antioxidant effects of statins in patients with atherosclerotic cerebrovascular disease. **J Clin Neurol**, v.10, n.2, p.140-147, 2014.

MULLER, G.; MORAWIETZ, H. Nitric Oxide, NAD(P)H Oxidase and Atherosclerosis. **Antioxid Redox Signal.**, v.11, n.7, p.1711-1731, 2009.

NAKANISHI, S. et al. Manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism is associated with the development of type 2 diabetes in Japanese-Americans. **Diabetes Res Clin Pract**, v.81, n.3, p.381-385, 2008.

NAKHJAVANI, M. et al. Association of oxidized low-density lipoprotein and transforming growth factor-beta in type 2 diabetic patients: a cross-sectional study. **Transl Res**, v.153, n.2, p.86-90, 2009.

NG, H.P.; BURRIS, R.L.; NAGARAJAN, S. Attenuated atherosclerotic lesions in apoE-Fc γ -chain-deficient hyperlipidemic mouse model is associated with inhibition of Th17 cells and promotion of regulatory T cells. **J Immunol**, v.187, n.11, p.6082-6093, 2011.

NICHOLLS, S. J. et al. Meta-analysis of comparative efficacy of increasing dose of Atorvastatin versus Rosuvastatin versus Simvastatin on lowering levels of atherogenic lipids (from VOYAGER). **Am J Cardiol**, v.105, n.1, p.69-76, 2010.

OGATA, T. et al. Association of location of deep venous thrombosis and d-dimer value in acute intracerebral hemorrhage. **Nihon Ronen Igakkai Zasshi**, v.48, n.6, p.686-690, 2011.

OLSON, N.C, et al. Circulating Levels of TNF- α Are Associated with Impaired Glucose Tolerance, Increased Insulin Resistance, and Ethnicity: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. **J Clin Endocrinol Metab**, v.97, n.3, p.1032-1040, 2012.

PARK, S.; LAKATTA, E.G. Role of inflammation in the pathogenesis of arterial stiffness. **Yonsei Med J**, v.53, n.2, p.258-261, 2012.

RIDKER, P.M. et al. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increase risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. **Circulation**, v.101, n.1, p.2149-2153, 2000.

ROCHA, V.Z.; LIBBY, P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. **Nat Rev Cardiol**, v. 6, p.399-409, 2009.

ROSENBLUM, J. S.; GILULA, N. B.; LERNER, R. A. On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, p.4471-4473, 1996.

ROSS, R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. **N Engl J Med**, v.340, n.2, p.115-126, 1999.

RUIZ-SANZ, J. I. Ala16Val SOD2 polymorphism is associated with higher pregnancy rates in in vitro fertilization cycles. **Fertil Steril**, v.95, n.5, p.1601-1605, 2011.

SACKS, F. M. et al. Relationship between plasma LDL concentrations during treatment with pravastatin and recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events trial. **Circulation**, v.97, n.15, p.1446-1452, 1998.

SCALIA, R.; APPEL, J. Z.; LEFER, A. M. Leukocyte-endothelium interaction during the early stages of hypercholesterolemia in the rabbit: role of P-selectin, ICAM-1, and VCAM-1. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.18, p.1093-1100, 1998.

SCHUPP, N. et al. Rosuvastatin protects against oxidative stress and DNA damage in vitro via upregulation of glutathione synthesis. **Atherosclerosis**, v.199, n.2, p.278-287, 2008.

SHASTRY, B. S. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. **Pharmacogenomics J**, v.6, n.1, p.16-21, 2006.

SHIMODA-MATSUBAYASHI, S. et al. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. **Biochem Biophys Res Commun**, v.226, p.561-565, 1996.

SIDDIQUI, A.J. et al. Rosuvastatin inhibits TIMP-2 and promotes myocardial angiogenesis. **Pharmacology**, v.93, n.3-4, p.178-184, 2014.

SIMON, J. A. et al. Phenotypic predictors of response to simvastatin therapy among African-Americans and Caucasians: the Cholesterol and Pharmacogenetics (CAP) Study. **Am J Cardiol** v.97, n.6, p.843-850, 2006.

SKÅLÉN, K. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. **Nature**, v.413, n.417, p.750-754, 2002.

SKILTON, M.R. et al. A comparison of the NCEP-ATPIII, IDF and AHA/NHLBI metabolic syndrome definitions with relation to early carotid atherosclerosis in subjects with hypercholesterolemia or at risk of CVD: evidence for sex-specific differences. **Atherosclerosis**, v.190, p.414-422, 2007.

SPAYD, R. Multilayer Film Elements for Clinical Analysis. **Clin Chem**, v.24, p.1348-1350, 1978.

STEIN, E.; STRUTT, K.; SOUTHWORTH, H. et al. Comparison of rosuvastatin versus atorvastatin in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. **Am J Cardiol.**, v.92, n.11, p.1287–1293, 2003.

STEIN, E. A. et al. Efficacy and safety of simvastatin 80 mg/day in hypercholesterolemic patients. The Expanded Dose Simvastatin U.S. Study Group. **Am J Cardiol**, v.82, p.311-316, 1998.

SUTTON, A. et al. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. **Pharmacogenetics**, v.13, n.3, p.145-157, 2003.

SUTTON, A. et al. The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. **Pharmacogenet Genomics**, v.15, n.5, p.311-319, 2005.

TAUFER, M. et al. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v.60, p.432-438, 2005.

THOMPSON, J. F. et al. Comprehensive whole-genome and candidate gene analysis for response to statin therapy in the Treating To New Targets (TNT) Cohort. **Circ Cardiovasc Genet**, v.2, n.2, p.173-181, 2009.

THORISSON, G. A.; STEIN, L. D. The SNP Consortium website: past, present and future. **Nucleic Acids Res**, v.31, n.1, p.124-127, 2003.

TIAN, C. et al. Association of the C47T polymorphism in SOD2 with diabetes mellitus and diabetic microvascular complications: a meta-analysis. **Diabetologia**, v.54, n.4, p.803-811, 2011.

TOUSOULIS, D. et al. Inflammatory and thrombotic mechanisms in coronary atherosclerosis. **Heart**, v.89, p.993–997, 2003.

TOUSOULIS, D. et al. Pathophysiology of atherosclerosis: the role of inflammation. **Curr Pharm Des**, v.17, n.37, p.4089-4110, 2011.

UCHIYAMA, R. et al. Role of regulatory T cells in atheroprotective effects of granulocyte colony-stimulating factor. **J Mol Cell Cardiol**, v.52, n.5, p.1038-1047, 2012.

WANG, J.C.; BENNETT, M. Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. **Circ Res**, v.111, n.2, p.245-259, 2012.

WARNICK, G.R.; BENDERSON, J.; ALBERS, J.J. Dextran Sulfate-Mg²⁺ Precipitation Procedure for Quantitation of High-Density Lipoprotein Cholesterol. **Clin Chem**, v.10, p. 91-99, 1983.

WEINSHILBOUM, R. Inheritance and drug response. **N Engl J Med**, v.348, n.6, p.529-537, 2003.

WISPE, J. R. et al. Synthesis and processing of the precursor for human mangano-superoxide dismutase. **Biochem Biophys Acta**, v.994, p.30-36, 1989.

WOLBERG, A.S.; MACKMAN, N. Venous thromboembolism: risk factors, biomarkers, and treatment. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.29, p.296-297, 2009.

XU, Y.L. et al. Increased plasma C-reactive protein level predicts rapid progression of non-target atherosclerotic lesions in patients with stable angina after stenting. **Chin Med J**, v.124, n.19, p.3022-3029, 2011.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radic Biol Med**, v.33, n.3, p.337-349, 2002.

ZIAKAS, A.G, et al. Serial measurements of acute phase proteins in patients with acute coronary syndrome. **Hellenic J Cardiol**, v.52, n.4, p. 293-298, 2011.

7 PESPECTIVAS

1. Avaliar o efeito *in vitro* da rosuvastatina na modulação gênica e proteica da sirtuína 1 e marcadores do metabolismo oxidativo e inflamatório em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) oriundas de indivíduos saudáveis;
2. Avaliar em pacientes hipercolesterômicos o efeito *in vivo* da rosuvastatina na modulação gênica e proteica da sirtuína 1;
3. Em pacientes hipercolesterolêmicos ainda não tratados e após o tratamento com rosuvastatina analisar a potencial correlação entre os níveis proteicos da sirtuína 1 e os níveis: do perfil lipídico, glicemia, marcadores de coagulação, inflamação e oxidativos.

ANEXO

Anexo 01 - Demais trabalhos realizados durante o curso de mestrado:

ARTIGOS

BALDISSERA, M. D. et al. Effect of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on the longevity and immune response of rats infected by *Trypanosoma evansi*. **Res Vet Sci**, v.96, n.3 , p.501-506, 2014.

BARBOSA, C. F. Diphenyl diselenide and sodium selenite associated with chemotherapy in experimental toxoplasmosis: influence on oxidant/antioxidant biomarkers and cytokine modulation. **Parasitology (London. Print)** v. 141, n.13, p.1761-1768, 2014.

BOTTARI, N. B. et al. Effect of zinc supplementation on E-ADA activity, seric zinc, and cytokines levels of *Trypanosoma evansi* infected wistar rats. **Microb Pathog**, v.74, n. , p.15-19, 2014.

DA SILVA PEREIRA, R. Assessment of Oxidative, Inflammatory, and Fibrinolytic Biomarkers and DNA Strand Breakage in Hypercholesterolemia. **Inflammation** v.36, n.4, p.869-877, 2013.

DE CARVALHO, J. A. et al. Evaluation of the diagnostic characteristics of urinary kidney injury molecule 1 (uKIM-1) and uKIM-1/creatinine ratio in the assessment of incipient diabetic kidney disease. **Clin Chem Lab Med**, v.53, n.2, p.1, 2015.

HANSEL, G. Guanosine Protects Against Cortical Focal Ischemia. Involvement of Inflammatory Response. **Mol Neurobiol**. 2014 [Epub ahead of print].

RESUMOS

BARBISAN, F. et al. Synergic effect of Brazilian Nut ingestion and superoxide dismutase (MnSOD) polymorphism on blood oxidative stress biomarkers.. In: 45° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2013, Ribeirão Preto - SP. 45° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2013.

DUARTE, T. et al. Association of ALA16VAL Superoxide Dismutase Gene Polymorphism with Fibrinolytic Markers in Hypercholesterolemic Patients Treated with Rosuvastatin. In: III Simpósio Internacional de Estresse Oxidativo e Doenças Cardiovasculares, 2014, Porto Alegre, RS. Anais do III Simpósio Internacional de Estresse Oxidativo e Doenças Cardiovasculares, 2014.

TATSCH, E. ; BOCHI, G. V. ; De Carvalho, José A.M. ; TORBITZ, V. D. ; MONTAGNER, G. F. F. S. ; DUARTE, T. ; CRUZ, I. B. M. ; MORESCO, R. N. . Avaliação da genotoxicidade em pacientes com diabetes tipo 2 e sua associação com os níveis de hemoglobina glicada. In: XIX Congresso da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2013, Florianópolis - SC. XIX Congresso da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2013.

Anexo 2 – Envio de Submissão do Artigo

Date: Thu, 29 Jan 2015 10:12:32 -0500
To: ibmcruz@hotmail.com
Subject: TPJ201500012 Section Editor Assigned
From: ThePharmacogenomicsJournal@us.nature.com

Dear Prof da Cruz,

On 29th Jan 2015, I received your manuscript entitled "Rosuvastatin effects on lipid-lowering, inflammatory, antioxidant and fibrinolytic blood biomarkers are influenced by Ala16Val superoxide dismutase manganese dependent gene polymorphism" by authors Ivana Beatrice da Cruz, Thiago Duarte, Ivana Beatrice da Cruz, Fernanda Barbisan, Dianni Capelleto, Rafael Moresco, and Marta Maria Duarte.

Your manuscript has been assigned the Paper #: TPJ201500012.

I have asked Stefan Bornstein to assist me with the peer review of your manuscript.

I will contact you as soon as this process is complete.

In the interim, you may check on the status of this manuscript by selecting the "Check Manuscript Status" link under the following URL:

<http://mts-tpj.nature.com/cgi-bin/main.plex?el=A4Bi7BTM5A2IvQ7F4A9ftdvaseIzcRcXJF9E6MhIvuxQZ>

(Press/Click on the above link to be automatically sent to the web page.)

Thank you for submitting your best work to The Pharmacogenomics Journal.

Sincerely,

Julio Licinio, MD, FRANZCP
Editor-in-Chief, The Pharmacogenomics Journal

Head, Mind and Brain Theme
Deputy Director, Translational Medicine
South Australian Health and Medical Research Institute and Strategic Professor of Psychiatry, Flinders University Adelaide, SA, Australia
email: ThePharmacogenomicsJournal@us.nature.com

TPJ - This email has been sent through the NPG Manuscript Tracking System NY-610A-NPG&MTS

Confidentiality Statement:

This e-mail is confidential and subject to copyright. Any unauthorised use or disclosure of its contents is prohibited. If you have received this email in error please notify our Manuscript Tracking System Helpdesk team at <http://platformsupport.nature.com>. Details of the confidentiality and pre-publicity policy may be found here <http://www.nature.com/authors/policies/confidentiality.html>
[Privacy Policy](#) | [Update Profile](#)