

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE – UFCSPA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Lisiane Smiderle**

**Estudo da Variabilidade nos Genes  
*ESR1* e *ESR2* e do Dimorfismo Sexual  
Sobre a Eficácia e Segurança na  
Utilização da Terapia Hipolipemiante**

**UFCSPA**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre**

**Porto Alegre  
2015**

**Lisiane Smiderle**

**Estudo da Variabilidade nos Genes  
*ESR1* e *ESR2* e do Dimorfismo Sexual  
Sobre a Eficácia e Segurança na  
Utilização da Terapia Hipolipemiante**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutora.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvana Almeida  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marilu Fiegenbaum

**Porto Alegre  
2015**

#### Catálogo na Publicação

Smiderle, Lisiane

Estudo da variabilidade nos genes ESR1 e ESR2 e do dimorfismo sexual sobre a eficácia e segurança da terapia hipolipemiante / Lisiane Smiderle. -- 2015.

102 p. : graf., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2015.

Orientador(a): Silvana Almeida ; coorientador(a): Marilu Fiegenbaum.

1. Farmacogenética. 2. Dimorfismo sexual. 3. Doenças cardiovasculares. 4. Receptores estrogênicos. 5. Hipolipemiantes. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedico este trabalho aos meus  
Nonos, Maria e Olindo.

Dedico este trabalho à minha  
Dinda, Ignês.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela luz e presença constantes na minha caminhada;

Aos meus pais que sempre primaram pela minha educação, agradeço pelo apoio incondicional que foi fundamental para a realização dos meus estudos e para que eu chegasse até aqui.

Aos meus familiares, agradeço pelas palavras de apoio e incentivo quando precisei me ausentar para me dedicar aos estudos. E, sobretudo, agradeço pelo exemplo de humildade e perseverança.

Ao meu irmão Samoel, agradeço pela alegria que me proporciona quando estamos juntos.

Ao meu namorado Douglas, agradeço por aceitar viver o meu sonho junto comigo. Mesmo estando longe, o apoio, incentivo e o companheirismo sempre estiveram presentes.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvana de Almeida, um exemplo de profissional e orientadora. Ela sentou ao meu lado e me mostrou como escrever um parágrafo de um projeto de pesquisa. Sou grata pelos oito anos de orientação e acima de tudo, pela sua amizade e incentivo na realização deste trabalho e também na minha formação profissional e humana. Agradeço ainda, pela paciência e orientação no desenvolvimento das atividades referentes à Bolsa REUNI;

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marilu Fiegenbaum sou grata pela afetuosa recepção em seu grupo de pesquisa, pela sua disponibilidade em trabalharmos juntas e por ter me guiado na longa jornada de coleta de pacientes, inclusão no banco de dados, reuniões e revisões.

À UFCSPA e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, meu agradecimento por me proporcionar formação profissional e científica que um dia, enquanto passava em frente à Universidade, eu sonhei;

Ao programa de Bolsas REUNI de assistência à docência, agradeço pela oportunidade ímpar que me proporcionou o primeiro contato com a sala de aula e pela qual eu me apaixonei; e também pelo auxílio financeiro;

Às professoras Dr<sup>a</sup> Ana Beatriz Gorini da Veiga e Dr<sup>a</sup> Vanessa Suñé Mattevi, agradeço pela dedicação na orientação durante o desenvolvimento das atividades da Bolsa REUNI e pelos conselhos;

Às “gurias” do Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA – Marília, Tati Jacobsen, Ananda, Nati, Lila, Grasi, Virgínia, Magda e Vanessa - por compartilharem momentos maravilhosos, de companheirismo, aprendizagem, alegria, descontração, enfim, simplesmente pela nossa amizade.

Agradeço à amiga Luciana Otero Lima, por me apresentar a pesquisa dos hipolipemiantes pela qual me apaixonei.

Agradeço também às bolsistas Jéssica, Liara e Renata pelo auxílio na extração de DNA dos pacientes.

Aos meus amigos, agradeço por tornarem os meus dias mais alegres;

Sou eternamente grata a Deus pela presença de cada um de vocês na minha vida.

Obrigada por tudo!

*“A sabedoria não nos é dada; é preciso descobri-la por nós mesmos depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer por nós.”  
(Marcel Proust).*

## Lista de tabelas

---

## Lista de abreviaturas

---

## Resumo

---

## Abstract

---

## Índice

---

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| Lista de tabelas .....                                   | 10 |
| 1. Introdução.....                                       | 17 |
| 1.1 Doença cardiovascular .....                          | 18 |
| 1.2 Perfil lipídico .....                                | 18 |
| 1.2.1 Metabolismo dos lipídeos e das lipoproteínas ..... | 19 |
| 1.2.2 Classificação das dislipidemias .....              | 21 |
| 1.2.3 Genética das dislipidemias .....                   | 22 |
| 1.3 Hipolipemiantes .....                                | 23 |
| 1.3.1 Estatinas .....                                    | 23 |
| 1.4 Dimorfismo sexual.....                               | 26 |
| 1.4.1 Dimorfismo sexual e estatinas .....                | 27 |
| 1.5 Farmacogenética.....                                 | 28 |
| 1.5.1 Farmacogenética das estatinas .....                | 29 |
| 1.6 Estrógeno .....                                      | 30 |
| 2. Referências bibliográficas.....                       | 33 |
| 3. Justificativa .....                                   | 47 |
| 4. Delineamento do estudo.....                           | 49 |
| 5. Objetivos .....                                       | 51 |
| 5.1 Objetivo geral .....                                 | 52 |
| 5.2 Objetivos específicos .....                          | 52 |
| 6. Artigos científicos elaborados.....                   | 53 |

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.1 Artigo 1 .....                                                                                       | 55 |
| 6.2 Artigo 2 .....                                                                                       | 64 |
| 6.3 Artigo 3 .....                                                                                       | 72 |
| 7. Conclusão .....                                                                                       | 91 |
| 8. Anexos .....                                                                                          | 95 |
| 8.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA .....                                             | 96 |
| 8.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) .....                                              | 97 |
| 8.3 Guia para autores para a submissão de artigo no periódico Annals of Nutrition<br>and Metabolism..... | 98 |

## **Lista de tabelas**

**Tabela 1.** Valores de referência para cada parâmetro lipídico em adultos maiores de 20 anos.

## Lista de abreviaturas

|              |                                                                   |
|--------------|-------------------------------------------------------------------|
| <i>ABCA1</i> | Gene que codifica o transportador ATP <i>binding</i> cassete A1   |
| <i>ABCA8</i> | Gene que codifica o transportador ATP <i>binding</i> cassete A8   |
| <i>ABCB1</i> | Gene que codifica o transportador ATP <i>binding</i> cassete B1   |
| <i>ABCG1</i> | Gene que codifica o transportador ATP <i>binding</i> cassete G1   |
| ANVISA       | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                          |
| <i>APOC1</i> | Gene que codifica a apolipoproteína C 1                           |
| APOE         | Apolipoproteína E                                                 |
| <i>APOE</i>  | Gene que codifica a apolipoproteína E                             |
| APOs         | Apolipoproteínas                                                  |
| AVC          | Acidente vascular cerebral                                        |
| CETP         | Proteína transferidora de éster de colesterol                     |
| <i>CETP</i>  | Gene que codifica a proteína transferidora de éster de colesterol |
| <i>CLMN</i>  | Gene que codifica a proteína calmina                              |
| CT           | Colesterol total                                                  |
| CTT          | <i>Cholesterol Treatment Trialists' Collaboration</i>             |
| CPK          | Creatinofosfoquinase                                              |
| DCV          | Doença cardiovascular                                             |
| <i>ESR1</i>  | Gene que codifica o receptor de estrógeno $\alpha$                |
| <i>ESR2</i>  | Gene que codifica o receptor de estrógeno $\beta$                 |
| ER $\alpha$  | Receptor de estrógeno $\alpha$                                    |
| ER $\beta$   | Receptor de estrógeno $\beta$                                     |
| GWAS         | Estudos de associação do genoma                                   |
| HDL-C        | Lipoproteínas de alta densidade                                   |
| HF           | Hipercolesterolemia familiar                                      |
| HIV          | Vírus da imunodeficiência humana                                  |
| HMG CoA      | 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase                     |
| HMGCR        | Receptor da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase  |
| IDL          | Lipoproteínas de densidade intermediária                          |
| KLF14        | <i>Kruppel-like factor</i>                                        |
| LDL-C        | Lipoproteínas de baixa densidade                                  |
| LDL-R        | Receptor de LDL-C                                                 |

|                |                                                                    |
|----------------|--------------------------------------------------------------------|
| RAM            | Reação adversa a medicamentos                                      |
| <i>SLCO1B1</i> | Gene que codifica o transportador de solutos orgânicos, membro 1B1 |
| SNP            | Polimorfismo de base única                                         |
| SUS            | Sistema Único de Saúde                                             |
| TG             | Triglicerídeos                                                     |
| VLDL           | Lipoproteínas de muito baixa densidade                             |

## Resumo

A doença cardiovascular (DCV) é uma importante causa de mortalidade, e a hipercolesterolemia está diretamente relacionada ao seu surgimento e desenvolvimento. Os níveis de lipídeos séricos apresentam variabilidade interindividual e polimorfismos presentes no genoma já foram associados com esta variabilidade. O manejo da hipercolesterolemia é realizado através do uso de fármacos com potencial hipolipemiante, dentre eles as estatinas. Clinicamente, a eficácia das estatinas apresenta um elevado grau de variabilidade e pode ser influenciada pela genética de cada indivíduo e pelo dimorfismo sexual, dentre outros fatores. Homens e mulheres apresentam diferentes mecanismos de regulação gênica, que podem estar relacionados a diferenças na resposta farmacológica. Tais mecanismos podem ser estrógeno-dependentes, visto que o estrógeno, quando ligado aos seus receptores, atua como um fator de transcrição. Foram avaliadas as características clínicas da coorte em estudo composta por 495 indivíduos provenientes da região metropolitana de Porto Alegre, de ascendência europeia. Neste estudo foram analisados 13 polimorfismos de base única (SNPs) no gene que codifica o receptor de estrógeno 1 (*ESR1*) e 10 SNPs no gene que codifica o receptor de estrógeno 2 (*ESR2*) e a sua possível associação na determinação de níveis lipídicos basais e na resposta da terapia com sinvastatina ou atorvastatina. As mulheres desta coorte apresentaram maiores níveis basais de colesterol total (CT), lipoproteínas de baixa densidade (LDL-C) e lipoproteínas de alta densidade (HDL-C) quando comparadas aos homens ( $p < 0,0001$ ). Após o tratamento, mulheres tiveram uma maior redução dos níveis de colesterol total e de LDL-C que homens. O ajuste para covariáveis mostrou que os níveis basais de CT e de LDL-C são responsáveis por cerca de 30% da eficácia das estatinas ( $p < 0,001$ ), independentemente do sexo. Mialgia (com ou sem alteração de creatinofosfoquinase - CPK) ocorreu mais frequentemente em mulheres (25,9%) ( $p = 0,002$ ), enquanto o aumento isolado de CPK e alterações de função hepática foram mais frequentemente observados em homens (17,9%) ( $p = 0,017$ ). Considerando o gene *ESR1*, foram observadas associações significativas entre o SNP rs1801132 e os níveis basais de TG (triglicerídeos) ( $p = 0,002$ , valor de  $p$  corrigido para múltiplos testes [pC] = 0,022). Para algumas das associações observadas, quando aplicada a correção para múltiplos testes, observou-se um valor de  $p > 0,05$ : *ESR1* rs3020314 com os níveis

de TG basais ( $p = 0,013$ ,  $pC = 0,143$ ); *ESR1* rs4870061 e níveis basais de HDL-C ( $p = 0,045$ ,  $pC = 0,495$ ) e níveis basais de TG ( $p = 0,040$ ,  $pC = 0,440$ ). No que diz respeito à eficácia do tratamento, o genótipo C/C do *ESR1* rs2234693 foi associado com maior aumento de HDL-C ( $p = 0,037$ ,  $pC = 0,407$ ) e o alelo T do rs3798577 foi associado com maior redução de CT ( $p = 0,019$ ,  $pC = 0,209$ ) e TG ( $p = 0,026$ ,  $pC = 0,286$ ). A análise dos polimorfismos no gene *ESR2* aponta para uma associação entre portadoras dos genótipos G/A e A/A e menores níveis de LDL-C ( $p = 0,023$ ,  $pC = 0,115$ ). As associações dos polimorfismos dos genes *ESR1* e *ESR2* com níveis basais e eficácia foram observadas apenas em mulheres. Os resultados obtidos demonstram que os níveis basais de CT e LDL-C são os principais preditores da eficácia do tratamento, independentemente do sexo. Adicionalmente, sugerimos que existe dimorfismo sexual na segurança do tratamento com sinvastatina/atorvastatina. Polimorfismos nos genes *ESR1* e *ESR2* são em parte responsáveis pela variação nos níveis de LDL-C, HDL-C e TG e esse efeito, nesta coorte, parece ser específico do gênero feminino.

**Palavras-chave:** Doença cardiovascular, farmacogenética, estatinas, lipídeos, gene *ESR1*, gene *ESR2*.

## Abstract

Cardiovascular disease (CVD) is a major cause of mortality, and hypercholesterolemia is directly related to its emergence and development. Serum lipid levels have interindividual variability and genome polymorphisms have been associated with this variability. The hypercholesterolemia treatment is accomplished through lipid-lowering drugs use, including statins. Clinically, the statins efficacy has a high degree of variability and can be influenced by genetics and sexual dimorphism, among other factors. Men and women have different gene regulation mechanisms, which may be related to differences in the pharmacological response. These mechanisms may be estrogen-dependent, since estrogen, when bound to their receptors, acts as a transcription factor. We evaluated clinical characteristics of a cohort with 495 individuals from the Porto Alegre metropolitan area, of European descent. This study analyzed 13 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *ESR1* gene and 10 SNPs in *ESR2* gene and their possible association on determining baseline lipid levels and simvastatin or atorvastatin therapy response. Women showed higher baseline levels of total cholesterol (TC), low density lipoproteins (LDL-C) and high density lipoproteins (HDL-C) compared to males ( $p < 0.0001$ ). After treatment, women had a greater TC and LDL-C reduction than men. The covariates adjustment showed that TC and LDL-C baseline levels are responsible for about 30% of the statins efficacy variation ( $p < 0.001$ ), regardless of sex. Muscle pain (with or without change in creatinephosphokinase - CPK) occurred more often in women (25.9%) ( $p = 0.002$ ), while the isolate increased CPK and liver function abnormalities were observed more frequently in men (17.9%) ( $p = 0.017$ ). Considering *ESR1* gene, significant associations were observed between rs1801132 with baseline TG (triglycerides) ( $p = 0.002$ ,  $p$ -value corrected for multiple testing ( $pC$ ) = 0.022). For some of the observed associations, when applied correction for multiple tests, there was a  $p$ -value  $> 0.05$ : *ESR1* rs3020314 with baseline TG levels ( $p = 0.013$ ,  $pC = 0.143$ ); *ESR1* rs4870061 and baseline HDL-C levels ( $p = 0.045$ ,  $pC = 0.495$ ) and baseline TG levels ( $p = 0.040$ ,  $pC = 0.440$ ). With respect to efficacy, *ESR1* rs2234693 C / C genotype was associated with greater increases in HDL-C ( $p = 0.037$ ;  $pC = 0.407$ ) and T allele of rs3798577 was associated with greater reduction of TC ( $p = 0.019$ ;  $pC = 0.209$ ) and TG ( $p = 0.026$ ;  $pC = 0.286$ ). The polymorphisms analysis in the *ESR2* gene indicates an association between the G/A + A/A

genotypes and lower levels of LDL-C ( $p = 0.023$ ,  $pC = 0.115$ ). The association of polymorphisms of *ESR1* and *ESR2* genes with baseline and efficacy were observed only in women. The results show that of TC and LDL-C baseline levels are major predictors of treatment efficacy, regardless of sex. Additionally, we suggest that there is sexual dimorphism in the safety of simvastatin/atorvastatin treatment. *ESR1* and *ESR2* SNPs are partly responsible for LDL-C, HDL-C and TG variation and this effect, in this cohort, it seems be sex-specific.

**Keywords:** Cardiovascular disease, pharmacogenetics, statins, lipids, *ESR1* gene, *ESR2* gene.

## 1. Introdução

---

## **1.1 Doença cardiovascular**

A doença cardiovascular (DCV) – o que inclui doenças cardíacas e acidente vascular cerebral (AVC) – representa a principal causa de morte no Brasil e em todo o mundo. A DCV afeta indivíduos de todas as idades e grupos populacionais, incluindo mulheres e crianças. Dados da Organização Mundial da Saúde (2011) mostram que 394,6 em cada 1.000 mortes no Brasil são decorrentes de DCV, sendo a doença cardíaca isquêmica a mais frequente (WHO 2015). O elevado índice de mortalidade por DCV pode ser relacionado ao aumento da expectativa de vida associado a hábitos de vida que predispõem ao risco cardiovascular. Além disso, o tratamento para esta patologia representa custos elevados com medicamentos e assistência médica (NCEP 2002). Diante desse contexto, estudos que estejam focados na prevenção e manejo da DCV apresentam grande relevância dentro da comunidade científica.

A DCV pode surgir ou sofrer agravos através da ação de diferentes fatores de risco, dentre os quais podemos citar: idade, sexo, história familiar de DCV precoce, obesidade, sedentarismo, dieta aterogênica, hipertensão arterial sistêmica, tabagismo, diabetes melito e hipercolesterolemia (NCEP 2002). Além destes, a síndrome metabólica somada ao tabagismo tem contribuído para o desenvolvimento de DCV precoce. A síndrome metabólica é uma condição originada pela união de vários fatores de risco em um indivíduo. São eles: obesidade, dislipidemia, pressão arterial elevada, aumento da resistência insulínica, perfil pró-trombótico e pró-inflamatório (NCEP 2002). Existe um elevado grau de desenvolvimento de DCV em indivíduos com síndrome metabólica, fato este que torna difícil separar a contribuição de cada fator individualmente.

## **1.2 Perfil lipídico**

Dentre todos os fatores de risco para DCV acima listados, a hipercolesterolemia é uma condição que apresenta destaque. Ela se manifesta através de altos níveis de colesterol sérico encontrado nas lipoproteínas de baixa-densidade (LDL-C) e altos níveis de triglicerídeos (TG), assim como baixos níveis das lipoproteínas de alta densidade (HDL-C) (NCEP 2002).

O *National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III (NCEP–ATP III)* (NCEP 2002) aborda os cuidados a serem observados no manejo da prevenção primária de DCV em pacientes com múltiplos fatores de risco. Segundo tal, os níveis de lipídeos e lipoproteínas adequados são: CT <200 mg/dL, LDL-C <100 mg/dL, HDL-C >60 mg/dL e TG <150 mg/dL. Adicionalmente, a diretriz americana sobre aterosclerose elaborada pelo Colégio Americano de Cardiologia (2011) reforça a indicação de que os níveis de LDL-C sejam mantidos em uma concentração <100 mg/dL também para uma efetiva prevenção secundária de DCV (SMITH et al. 2011). A tabela 1 apresenta os valores de referência para cada parâmetro lipídico em adultos maiores de 20 anos, de acordo com a Sociedade Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (2013) (XAVIER 2013).

A DCV é classificada como uma doença multifatorial, ou seja, fatores ambientais e fatores genéticos atuam conjuntamente levando ao desfecho da doença. Os conhecimentos atuais indicam que os níveis de HDL-C apresentam uma relação inversa com o risco de desenvolvimento de DCV e eles apresentam uma forte herdabilidade (estimada em cerca de 40-70%) (WEISSGLAS-VOLKOV et al. 2007). A alta herdabilidade genética também é observada em relação aos níveis de LDL-C e de TG. Nos últimos anos, estudos de associação genética demonstraram ser uma ferramenta importante na identificação de variantes genéticas que estariam influenciando essas características. No entanto, o papel funcional de muitas dessas variantes genéticas ainda permanece desconhecido (WEISSGLAS-VOLKOV & Pajukanta ).

### **1.2.1 Metabolismo dos lipídeos e das lipoproteínas**

Considerando a função biológica, os lipídeos apresentam um importante papel no organismo humano. Os fosfolipídeos constituem as membranas celulares. Os triglicerídeos representam uma das formas mais importantes de armazenamento de energia depositada nos tecidos adiposo e muscular. A importância do colesterol se dá pela sua capacidade de atuar como um precursor de hormônios esteróides, dos ácidos biliares e da vitamina D. O colesterol também participa da formação e fluidez das membranas celulares e ativação de enzimas nelas presentes. A sua síntese pode ocorrer em qualquer célula nucleada, entretanto, a sua metabolização

ou excreção ocorre apenas nos hepatócitos e nos enterócitos (BROWN & GOLDSTEIN 1983).

**Tabela 1.** Valores de referência para cada parâmetro lipídico em adultos maiores de 20 anos.

| <b>Lipídeos</b> | <b>Valores (mg/dl)</b> | <b>Categoria</b> |
|-----------------|------------------------|------------------|
| CT              | <200                   | Desejável        |
|                 | 200 - 239              | Limítrofe        |
|                 | ≥ 240                  | Alto             |
| LDL-C           | <100                   | Ótimo            |
|                 | 100 - 129              | Desejável        |
|                 | 130 – 159              | Limítrofe        |
|                 | 160 – 189              | Alto             |
|                 | ≥ 190                  | Muito alto       |
| HDL-C           | >60                    | Desejável        |
|                 | <40                    | Baixo            |
| TG              | 130 - 159              | Desejável        |
|                 | 160 – 189              | Alto             |
|                 | ≥ 190                  | Muito alto       |

Fonte: V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (2013).

A síntese de lipídeos e lipoproteínas ocorre através de duas vias distintas: a via intestinal e a via hepática.

- a) **Via intestinal:** ocorre a síntese de lipídeos através dos triglicerídeos provindos da dieta. No estado pós-prandial, as lipases pancreáticas hidrolisam os TG em ácidos graxos livres. Estes, por sua vez, são emulsificados pelos sais biliares na luz intestinal formando estruturas chamadas micelas, facilitando a movimentação através das microvilosidades intestinais. A membrana apical dos enterócitos apresenta receptores específicos que promovem a absorção das partículas lipídicas. Os ácidos graxos absorvidos formarão os quilomícrons, que

posteriormente serão lançados no sistema linfático e chegam até a corrente sanguínea. Na circulação, os quilomícrons sofrem ação da lipase lipoproteica liberando ácidos graxos, glicerol e colesterol não-esterificado. Os ácidos graxos são capturados por células musculares e adipócitos onde são armazenados. Os remanescentes de quilomícrons são capturados pelo fígado para formação de VLDL.

- b) **Via hepática:** no fígado, observa-se o envolvimento das lipoproteínas VLDL, IDL e LDL no transporte dos lipídeos. As VLDL são ricas em TG e contêm apo B100 como principal constituinte. As VLDL formadas no fígado são liberadas na corrente sanguínea onde serão hidrolisadas pela lipase lipoproteica. Os ácidos graxos liberados são redistribuídos para os tecidos, onde podem ser armazenados na forma de tecido adiposo ou utilizados pelo músculo esquelético. As VLDL quando têm as partículas de TG removidas transformam-se em remanescentes: uma parte é transformada em IDL que são rapidamente removidas do plasma; através da ação da lipase hepática, outra porção origina LDL.

As lipoproteínas HDL e LDL apresentam importante contribuição no transporte de colesterol. Quando em excesso, o colesterol é transportado dos tecidos periféricos até o fígado. As lipoproteínas HDL fazem o transporte do colesterol dos tecidos para o fígado com a finalidade de que este seja eliminado do organismo. A porção de colesterol que está ligado à molécula de HDL é chamada HDL colesterol (HDL-C). As lipoproteínas LDL fazem o transporte inverso: distribuem o colesterol hepático para os tecidos. As LDL quando ligadas ao colesterol são denominadas LDL-C. HDL e LDL são moléculas muito ricas em colesterol e estão envolvidas na formação e na progressão de placas ateroscleróticas levando ao desenvolvimento de DCV. A quantidade de LDL-C (popularmente chamado de “colesterol ruim”) presente na circulação está diretamente relacionada com o desenvolvimento de aterosclerose, enquanto que a HDL-C (o chamado “colesterol bom”) apresenta um papel protetor ao sistema cardiovascular (KANE 2005).

### 1.2.2 Classificação das dislipidemias

As dislipidemias primárias podem ser classificadas considerando as características genéticas ou fenotípicas. Genotipicamente, as dislipidemias podem ser divididas em monogênicas (causadas por mutações em um só gene) e poligênicas (quando ocorrem associações de múltiplas mutações consideradas de pequeno efeito quando isoladas). Para a classificação fenotípica, são observados os valores séricos de CT, LDL-C, TG e HDL-C para uma classificação que envolve quatro tipos bem definidos:

- a) hipercolesterolemia isolada: elevação isolada de LDL-C ( $\geq 160$  mg/dl);
- b) hipertrigliceridemia isolada: elevação isolada dos TGs ( $\geq 150$  mg/dl) que reflete o aumento do número e/ou do volume de partículas ricas em TG, como VLDL, IDL e quilomícrons;
- c) hiperlipidemia mista: valores aumentados de LDL-C ( $\geq 160$  mg/dl) e TG ( $\geq 150$  mg/dl).
- d) HDL-C baixo: redução do HDL-C (homens  $< 40$  mg/dl e mulheres  $< 50$  mg/dl) isolada ou em associação o aumento de LDL-C ou de TG (HEGELE 2001, SPOSITO et al. 2007).

### 1.2.3 Genética das dislipidemias

Estudos de associação de variantes genéticas demonstram que os níveis de lipídeos séricos apresentam elevadas taxas de herdabilidade. A taxa de herdabilidade aproximada para LDL-C, HDL-C e TG está entre 60-70% (SUNG et al. 2009). Dessa maneira, os 30% restantes estão relacionados com fatores externos ou ambientais. Vários estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de apontar quais seriam as modificações presentes na molécula de DNA responsáveis pelas variações nos níveis lipídicos. Grande parte destes estudos estão focados em polimorfismos de base única (*single nucleotide polymorphism* - *SNP*) que podem alterar a funcionalidade de genes.

Teslovich et al. (2010) realizaram um grande estudo de associação do genoma (GWAS), no qual realizaram um *screening* de mais de 100.000 indivíduos de ascendência europeia. Os resultados obtidos demonstraram o envolvimento de 95 loci gênicos associados com a determinação dos níveis de lipídeos e lipoproteínas, dentre eles, dois loci mostraram associação sexo-específica: o loci

*KLF14* (*Kruppel-like factor*) foi associado com TG e o locus *ABCA8* (gene que codifica o transportador *ATP binding cassette A8*) foi associado com LDL-C.

### 1.3 Hipolipemiantes

Os hipolipemiantes são fármacos amplamente utilizados na prática clínica cujo objetivo é a redução dos níveis de lipídeos séricos. Existem diversas classes de fármacos com potencial hipolipemiante. São elas: resinas sequestrantes de ácidos biliares, fibratos, ácido nicotínico, inibidores seletivos da absorção de colesterol, ezetimiba e inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A (HMG-CoA) redutase (estatinas ou vastatinas). A escolha da classe de estatina mais indicada para cada paciente leva em consideração o tipo de dislipidemia que o paciente apresenta. As estatinas são indicadas para pacientes que apresentam hipercolesterolemia com níveis de LDL-C elevados (XAVIER 2013).

#### 1.3.1 Estatinas

A ação das estatinas no organismo ocorre através da inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA), uma enzima indispensável pela síntese intracelular do colesterol. Quando esta enzima está inibida, observa-se uma redução do colesterol intracelular e, como consequência, há o aumento do número de receptores de LDL-C nos hepatócitos que então removem mais VLDL, IDL e LDL da circulação com o intuito de repor o colesterol intracelular. Esta classe de fármacos é responsável por uma redução de 15% a 55% dos níveis de LDL-C e 7% a 28% nos níveis de triglicerídeos em adultos. Além disso, atuam elevando os níveis de HDL-C de 2% a 10%, reduzindo, dessa forma, a mortalidade cardiovascular (SPOSITO et al. 2007). Dentro da classe das estatinas encontramos os seguintes fármacos: sinvastatina, atorvastatina, rosuvastatina, pitavastatina, fluvastatina, pravastatina, lovastatina e cerivastatina (NEUVONEN et al. 2006). A primeira estatina a ser comercializada foi a lovastatina no final da década de 1980. Posteriormente foram lançadas, no Brasil, a sinvastatina (1990), pravastatina (1991),

fluvastatina (1995), atorvastatina (1998), cerivastatina (1998) e rosuvastatina (2004). No Brasil, as estatinas que estão registradas na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são: sinvastatina, atorvastatina, pravastatina, fluvastatina, rosuvastatina e lovastatina. Todas estão em comercialização, sendo que apenas a atorvastatina e a rosuvastatina ainda estão sob proteção patentária (SAÚDE 2009). No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS), através da dispensação do Ministério da Saúde fornece gratuitamente à população as seguintes estatinas: lovastatina, sinvastatina, pravastatina, fluvastatina e atorvastatina, dentre as quais, as mais amplamente utilizadas são atorvastatina e sinvastatina (DATASUS 2015). Entretanto, nas clínicas médicas observa-se um aumento na prescrição de rosuvastatina, embora seu acesso não esteja disponível no SUS. A cerivastatina foi retirada do mercado em 2001 devido à miotoxicidade seguida de morte de 31 indivíduos nos Estados Unidos. Cabe ressaltar que destes, 13 faziam uso concomitante de genfibrozil (STAFFA et al. 2002). Dessa maneira, o uso concomitante de outros fármacos pode aumentar o risco de efeitos adversos severos (POGSON et al. 1999). Uma metanálise realizada por Weng et al. (2010) analisou 25 estudos e os resultados demonstram que em doses comparáveis, as seis estatinas disponíveis no mercado (lovastatina, sinvastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina) apresentam efeitos terapêuticos equivalentes: atorvastatina 10 mg, fluvastatina 80 mg, lovastatina 40/80 mg e sinvastatina 20 mg são capazes de reduzir os níveis de LDL-C em 30 a 40%. A elevação do HDL-C e a redução dos TG também se mostraram similares entre as diferentes estatinas em doses equivalentes (WENG et al. 2010).

Três importantes metanálises demonstram que as estatinas apresentam um grande potencial na redução do risco cardiovascular (BAIGENT et al. 2005, BAIGENT et al. 2010, MIHAYLOVA et al. 2012). O CTT (*Cholesterol Treatment Trialists' Collaboration*) foi criado em 1994 com o intuito de agrupar dados de estudos menores e de reanalisar estes dados de forma a aumentar o poder estatístico em relação aos efeitos da terapia hipolipemiante. Dessa maneira, periodicamente, são realizadas metanálises de dados de morbi-mortalidade de ensaios clínicos randomizados de grande escala que utilizam a terapia hipolipemiante. Baigent et al. (2005) ao analisarem dados de 90.056 indivíduos em 14 *trials* com estatinas com duração de 5 anos concluíram que as estatinas apresentam efeitos favoráveis no organismo. Esta terapia pode reduzir a incidência

de eventos coronarianos em 5 anos, melhora a revascularização das coronárias e reduz a ocorrência de acidentes vasculares cerebrais na taxa de aproximadamente 20% a cada 1 mmol/L (38,7 mg/dL) de redução nos níveis de LDL-C. Em um segundo momento, este mesmo grupo avaliou os efeitos de reduções adicionais no LDL-C em indivíduos com regime de estatinas padrão e sem diagnóstico de DCV. Os resultados observados foram uma redução de 28% dos principais eventos vasculares quando utilizada uma dose maior de estatinas. Uma redução de 2-3 mmol/L (77,4 – 116,1 mg/dL) de LDL-C reduziria em 40 – 50% o risco de eventos cardiovasculares (BAIGENT et al. 2010). Indivíduos com baixo risco de desenvolvimento de DCV também foram analisados. Os participantes foram divididos em cinco categorias considerando o maior risco de eventos vasculares em 5 anos. Para os indivíduos com risco de ocorrência de eventos cardiovasculares menor do que 10% em 5 anos, a redução de 1 mmol/L (38,7 mg/dL) de LDL-C levaria a uma redução de 11 em cada 1.000 eventos em 5 anos (MIHAYLOVA et al. 2012).

Adicionalmente, estudos demonstram que as estatinas apresentam outros benefícios além da melhora do perfil lipídico, os chamados efeitos pleiotrópicos. Ray et al. (2006) realizaram um estudo de revisão sobre os ensaios clínicos realizados com uso de estatinas e observaram que as estatinas não só agem sobre o perfil lipídico, mas também promovem melhoras sobre os marcadores de inflamação, oxidação e trombose.

Em contrapartida, reações adversas a medicamentos (RAM) são observadas em um pequeno número de indivíduos que fazem uso de estatinas, tais como: toxicidade hepática (1-3%), mialgia (6,2-9,1%) e rabdomiólise (lise do tecido muscular esquelético devido à lesão no tecido muscular) (0,1%) (Hamilton-Craig 2001). Dentre eles, o efeito adverso mais comum é a mialgia, com ou sem aumento da creatinafosfoquinase (CPK), a qual pode surgir semanas ou anos após o início do tratamento. De maneira geral, cerca de 10% dos pacientes que usam estatinas relatam queixas musculares (THOMPSON et al. 2006), o que pode ser devido ao uso de co-medicações. Interações farmacocinéticas e farmacodinâmicas entre diferentes fármacos administrados concomitantemente, mais especificamente, fármacos que propiciam concentrações elevadas de estatinas na corrente sanguínea e no tecido muscular, podem aumentar a toxicidade muscular (KESKITALO et al. 2008). O mecanismo através do qual os efeitos adversos a esta terapia ocorrem não

estão bem determinados, entretanto alguns fatores de risco são observados: idade avançada, sexo feminino, coadministração de outros fármacos, doenças multi-sistêmicas e variabilidade genética (SEWRIGHT et al. 2007).

Conforme mencionado anteriormente, o uso de estatinas no manejo do perfil lipídico é uma prática bem estabelecida na clínica médica. Quando a resposta farmacológica das estatinas é avaliada observa-se que a maioria dos usuários responde positivamente ao tratamento, normalizando os níveis de lipídeos e lipoproteínas. Entretanto, um pequeno número de usuários não apresenta a eficácia farmacológica desejada ou desenvolve reações adversas. A resposta de cada paciente à terapia pode ser influenciada pela variabilidade genética de cada indivíduo, fator este que pode limitar o benefício desejado.

#### **1.4 Dimorfismo sexual**

As diferentes características anatômicas, fisiológicas e comportamentais observadas entre homens e mulheres são definidas como dimorfismo sexual. O dimorfismo sexual, em humanos, está relacionado com a prevalência, desenvolvimento e severidade de inúmeras doenças comuns, dentre elas encontram-se as doenças autoimunes (LOCKSHIN 2006), asma (POSTMA 2007) e doenças cardiovasculares (MENDELSON & KARAS 1999). Entre homens e mulheres observa-se uma diferença significativa sobre o risco de desenvolvimento de DCV (MENDELSON AND KARAS 1999, PILOTE et al. 2007, TOUZE AND ROTHWELL 2007). A incidência de DCV é menor em mulheres durante o período reprodutivo do que em homens da mesma idade (TUNSTALL-PEDOE et al. 1999). O hormônio sexual estrogênio ( $17\beta$ -estradiol) pode contribuir para a diminuição da incidência de DCV em mulheres (MAHMOODZADEH et al. 2012) devido ao seu efeito favorável sobre o perfil lipídico. No entanto, as mulheres após a menopausa são mais suscetíveis ao desenvolvimento de DCV do que os homens. Fatores hormonais endógenos diferem entre homens e mulheres, e os efeitos e quantidade dos hormônios sofrem variações relacionadas à faixa etária (COTREAU et al. 2005, SCARABIN-CARRE et al. 2012). Variações na farmacocinética e farmacodinâmica entre os sexos também podem estar relacionadas com a eficácia e toxicidade farmacológicas (WAXMAN & HOLLOWAY 2009), as quais podem ser o resultado de

diferentes mecanismos de regulação gênica em homens e mulheres (RINN & SNYDER 2005, RIGBY & KULATHINAL 2015), principalmente no que diz respeito à resposta de genes dependentes de hormônios sexuais (ELLENGREN & PARACH 2007, OBER et al. 2008). Pilote e cols. (2007) sugerem que a evolução das diferenças observadas entre os sexos em relação aos perfis de risco pode ser resultado da ação de hormônios sexuais e seus receptores. Gasparotto e cols. (2012) demonstraram a presença de associação entre SNPs nos genes *ESR1* e *ESR2* e a prevalência de lipodistrofia e síndrome metabólica em indivíduos soropositivos para HIV (vírus da imunodeficiência humana) em uso de terapia antirretroviral, sugerindo uma forte influência do dimorfismo sexual na redistribuição do tecido adiposo e nos padrões de lipodistrofia observados.

#### **1.4.1 Dimorfismo sexual e estatinas**

Os dados presentes na literatura demonstram controvérsias em relação à eficácia das estatinas em homens e mulheres (JOCHMANN et al. 2005, KROBOT et al. 2005, XHYHERI & BUGIARDINI 2010, KOSTIS et al. 2012, MOSCA 2012, DESAI et al. 2015). Kostis e cols. (2012) realizaram uma metanálise cujo objetivo foi avaliar o efeito das estatinas na redução de eventos cardiovasculares em homens e mulheres. Foram analisados 18 ensaios clínicos randomizados contemplando um total de 141.235 participantes em uso de estatinas e estratificados por sexo. Os resultados mostraram que os benefícios das estatinas não diferiam entre os sexos. Mosca (2012) avaliou o estudo e pontuou que o estudo de Kostis (2012) não forneceu os dados de eficácia no uso de estatinas, relativas às diferenças sexuais e segurança.

Estudos anteriores demonstram que a porcentagem de homens que atingiu níveis normais de CT e LDL-C após o tratamento com estatinas é significativamente maior em comparação com as mulheres (MOSCA et al. 2005, SPINAROVA et al. 2012). Adicionalmente, o risco de efeitos adversos parece ser maior em mulheres quando comparado aos homens durante o tratamento com estatinas e ainda se observa que as concentrações plasmáticas de estatinas são maiores nas mulheres (JOCHMANN et al. 2005).

## 1.5 Farmacogenética

A farmacogenética abrange o estudo da variabilidade genética na variação individual da resposta aos fármacos (TRIBUT et al. 2002). Os estudos farmacogenéticos estão focados na variação de genes que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo dos medicamentos (WEINSHILBOUM & WANG 2006). Ou seja, indivíduos diferentes, pela sua constituição genética única, podem apresentar diferentes respostas diante de uma dose-padrão de fármaco. Uma dose de fármaco considerada como sendo ideal no manejo de uma condição patológica pode não apresentar o efeito desejado ou ainda causar um efeito indesejado em diferentes indivíduos (SHIN et al. 2009, MYBURGH et al. 2012). Existem diversos fatores que estão relacionados com a eficácia farmacológica tais como a idade, o sexo, a funcionalidade dos órgãos, a história da doença, interações medicamentosas (FRANCONI & CAMPESI 2014), entretanto, sabe-se que as diferenças interindividuais também são influenciadas pela variação genética de cada indivíduo (POSTMUS et al. 2012).

Determinantes importantes da resposta farmacológica são as rotas de metabolização enzimática e transporte de fármacos. Variações na expressão e atividade destas enzimas e proteínas transportadoras determinam diferenças na exposição sistêmica e tecidual aos fármacos (URQUHART et al. 2007) podendo, às vezes, influenciar na resposta aos fármacos aumentando a variabilidade na eficácia terapêutica. A variabilidade interindividual pode ser influenciada pela presença de regiões variáveis no genoma de cada indivíduo. Os polimorfismos de base única (SNPs) são definidos como um local na sequência de DNA que difere por apenas um nucleotídeo entre os diferentes indivíduos. O genoma humano é composto por aproximadamente 3 bilhões de pares de bases (VENTER et al. 2001) e estima-se que exista 1 SNP a cada 300 bases no genoma humano (MANOLIO et al. 2008). A identificação e o estudo da funcionalidade de SNPs são de grande relevância para o entendimento de rotas de metabolismo de fármacos e também de doenças genéticas humanas. Nos últimos anos, houve um grande avanço nas pesquisas genéticas, permitindo uma abordagem estratégica dentro dos estudos de associação.

A farmacogenética tem muitas aplicações na farmacoterapia cardiovascular, incluindo o rastreio de polimorfismos para escolher agentes com o maior potencial de eficácia e menor risco de toxicidade além de possibilitar o ajuste de doses de

medicamentos específicos em pacientes com alterações genéticas já identificadas (VERSCHUREN et al. 2012).

### 1.5.1 Farmacogenética das estatinas

Os genes que codificam proteínas relacionadas com as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas das estatinas são alvos promissores para estudos de associação com resposta terapêutica. Nos últimos anos, variações em genes relacionados com a farmacocinética e farmacodinâmica foram extensivamente estudadas (FIEGENBAUM et al. 2005a, FIEGENBAUM et al. 2005b, FIEGENBAUM et al. 2005c, KAJINAMI et al. 2005, KESKITALO et al. 2008, NIEMINEN et al. 2008, ZINTZARAS et al. 2009, ROMAINE et al. 2010, SORTICA et al. 2012, LIMA et al. 2013). No entanto, os resultados obtidos explicaram apenas uma pequena porção da variação observada em resposta às estatinas.

Mais de 40 genes foram descritos como candidatos a estarem relacionados com a variabilidade do perfil lipídico em resposta às estatinas, bem como, de efeitos sobre o sistema cardiovascular, incluindo infarto e morte cardiovascular (VERSCHUREN et al. 2012). Em relação à resposta às estatinas, alguns genes com forte associação são os genes *CETP* (BOEKHOLDT et al. 2005), *APOE* (apolipoproteína E) (ZINTZARAS et al. 2009), *CLMN* (calmina) (BARBER et al. 2010) e *APOC1* (BARBER et al. 2010).

O gene *CETP* codifica a proteína transferidora de éster de colesterol envolvida no metabolismo do colesterol. Pacientes que apresentam a variante B1B1 do polimorfismo rs708272 (TaqlB) apresentam uma melhor resposta às estatinas (BOEKHOLDT et al. 2005). Em relação ao *APOE*, existem alguns estudos na literatura com resultados contraditórios, com relação à associação dos polimorfismos rs429358 e rs7412 e resposta às estatinas. Alguns estudos relatam a associação entre a variante E2 da *APOE* e uma melhor resposta às estatinas e diminuição dos desfechos cardiovasculares (NIEMINEN et al. 2008). O primeiro GWAS mostrou associação significativa entre polimorfismos na *APOE* e resposta de LDL-C (THOMPSON et al. 2009), enquanto que uma recente metanálise refutou esta associação (ZINTZARAS et al. 2009). Da mesma forma, ainda não está bem definida a função da proteína calmina, codificada pelo gene *CLMN*, sobre o perfil

lipídico, mas um GWAS mostrou que usuários de estatina que apresentavam o polimorfismo rs8014194 tiveram maior redução nos níveis de CT. Além disso, um polimorfismo próximo ao gene da *APOE*, o rs4420638 no gene *APOC1* mostrou associação com os níveis de LDL-C em resposta a estatinas (BARBER et al. 2010).

O mecanismo de ação das estatinas ocorre através da sua ligação ao receptor da HMG-CoA redutase, bloqueando a síntese do colesterol. O receptor da HMG-CoA redutase é codificado pelo gene *HMGCR* e tem sido amplamente estudado em indivíduos usuários de estatinas. Um estudo envolvendo 1.536 participantes avaliou 148 SNPs em 10 genes candidatos envolvidos na síntese de colesterol e no metabolismo das estatinas. Dois SNPs no gene *HMGCR* foram associados com redução da eficácia de pravastatina sobre o CT em 22% e sobre o LDL-C em 19% (CHASMAN et al. 2004).

Polimorfismos relacionados ao metabolismo lipídico, à farmacocinética e à farmacodinâmica das estatinas também são relatados na literatura, como por exemplo, os genes *LDL-R* (SANTOS et al. 2014), *ABCB1* (KESKITALO et al. 2008) e *SLCO1B1* (ROMAINE et al. 2010). Sabe-se que, em características com padrão de herança multifatorial, cada locus gênico apresenta um pequeno efeito sobre uma determinada característica, e quando somados, esses efeitos podem levar a respostas terapêuticas mais favoráveis ou, em alguns casos, à falha terapêutica.

## 1.6 Estrógeno

O estrógeno (17 $\beta$ -estradiol) é um hormônio sexual considerado um dos mais importantes na fisiologia e reprodução feminina. Nas mulheres, durante o período reprodutivo, o estrógeno é sintetizado principalmente nas células granulosas do ovário (DUBEY & JACKSON 2001) e nos homens a produção ocorre em menores quantidades nos testículos (SHARPE 1998). Além disso, também atua na proteção de vários estados patofisiológicos, dentre eles, obesidade, DCV, hiperlipidemia, diabetes, osteoporose e câncer em homens e mulheres (NILSSON et al. 2001, PARAZZINI 2003, DEROO & KORACH 2006). Os estrógenos podem reduzir o risco de DCV através de vários mecanismos e dentre eles observa-se a promoção de um perfil lipídico mais favorável, dilatação vascular e reparo eficiente de lesões

endoteliais (OUYANG et al. 2006). O estrógeno ainda pode estar relacionado com a farmacodinâmica e a farmacocinética e modificar vias de sinalização hormonais (SPOLETINI et al. 2012, FRANCONI & CAMPESI 2014) e, dessa forma, contribuir com as diferenças observadas entre os sexos (MAHMOODZADEH et al. 2012).

Os estrógenos exercem sua ação pela ligação aos seus receptores específicos. O complexo hormônio-receptor reconhece sequências específicas em genes que possuem elementos de resposta ao estrógeno, liga-se a estas sequências e recruta os demais fatores de transcrição ativando a transcrição destes genes (FORYST-LUDWIG & KINTSCHER 2010). Até o momento foram identificadas três isoformas de receptores estrogênicos: receptor alfa ou 1 (ER $\alpha$  ou ESR1), receptor beta ou 2 (ER $\beta$  ou ESR2) e o receptor delta (ESR $\Delta$ ) (KUIPER & GUSTAFSSON 1997, ALI et al. 2000). O gene que codifica o receptor de estrógeno  $\alpha$  (ESR $\alpha$ ) é o *ESR1* e o gene que codifica o receptor de estrógeno  $\beta$  (ESR $\beta$ ) é o *ESR2*. Tais genes são expressos no útero, próstata, ovários, testículos, ossos, mamas, fígado, rins, glândulas salivares, endotélio vascular, tecido adiposo e certas regiões do cérebro (ANGHEL et al. 2010, NILSSON & GUSTAFSSON 2001, ZHAO et al. 2010). Os três receptores são codificados por genes distintos e diversos SNPs ocorrem nestes genes (NCBI dbSNP 2011).

Estudos genéticos de associação demonstram que polimorfismos no gene *ESR1* podem estar relacionados com o risco de doença cardiovascular (ROSZKOWSKA-GANCARZ et al. 2010, SHEARMAN et al. 2003, DEMISSIE et al. 2006, EMRE et al. 2006, SOWERS et al. 2006, ALEVIZAKI et al. 2007, MOLVAREC et al. 2007, KLOS et al. 2008, NOGUEIRA-DE-SOUZA et al. 2009, LAMON-FAVA et al. 2010, ZHAO et al. 2010), enquanto que polimorfismos no gene *ESR2* têm sido pouco estudados e a sua relação com fatores de risco de DCV ainda permanece pouco entendida. Alguns estudos demonstram a associação de polimorfismos neste gene com níveis lipídicos (ALMEIDA et al. 2005, SILVESTRI et al. 2006, SALTIKI et al. 2009).

Uma revisão de Yoon et al. (2010) sugere que o dimorfismo sexual e os receptores de estrógeno  $\alpha$  e  $\beta$  podem estar envolvidos na resposta da terapia hipolipemiante. Ao melhor do nosso conhecimento, apenas um estudo presente na literatura avaliou polimorfismos no gene *ESR1* em resposta à terapia com estatinas. Kajinami e cols (2005) testaram dois SNPs (rs2234693 e rs9340799) em resposta à terapia com atorvastatina 10 mg em pacientes hipercolesterolêmicos e observaram

uma associação com níveis de HDL-C. Mulheres portadoras do haplótipo rs2234693\*C – rs9340799\*G apresentaram um aumento significativamente maior nos níveis de HDL-C. Essa mesma associação não foi observada em homens.

Dessa maneira, o estudo de polimorfismos em genes de receptores de estrógeno pode ajudar a determinar o papel da variabilidade genética na resposta à terapia hipolipemiante. Além disso, esta abordagem pode identificar características potenciais específicas de gênero envolvidas na eficácia farmacológica.

## 2. Referências bibliográficas

---

Alevizaki, M., K. Saltiki, A. Cimponeriu, I. Kanakakis, N. Xita, C. C. Alevizaki, I. Georgiou and H. L. Sarika (2007). "Severity of cardiovascular disease in postmenopausal women: associations with common estrogen receptor alpha polymorphic variants." Eur J Endocrinol **156**(4): 489-496.

Ali, A. F., S. El Shayb and A. El Attar (2000). "Identification of a novel human oestrogen receptor (Delta receptor) and its chromosomal localisation." Eur J Cancer **36 Suppl 4**: 118.

Almeida, S., N. Franken, M. R. Zandona, M. C. Osorio-Wender and M. H. Hutz (2005). "Estrogen receptor 2 and progesterone receptor gene polymorphisms and lipid levels in women with different hormonal status." Pharmacogenomics J **5**(1): 30-34.

Anghel, A., D. Narita, E. Seclaman, E. Popovici, M. Anghel and L. Tamas (2010). "Estrogen receptor alpha polymorphisms and the risk of malignancies." Pathol Oncol Res **16**(4): 485-496.

Baigent, C., A. Keech, P. M. Kearney, L. Blackwell, G. Buck, C. Pollicino, A. Kirby, T. Sourjina, R. Peto, R. Collins, R. Simes and C. Cholesterol Treatment Trialists (2005). "Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins." Lancet **366**(9493): 1267-1278.

Barber, M. J., L. M. Mangravite, C. L. Hyde, D. I. Chasman, J. D. Smith, C. A. McCarty, X. Li, R. A. Wilke, M. J. Rieder, P. T. Williams, P. M. Ridker, A. Chatterjee, J. I. Rotter, D. A. Nickerson, M. Stephens and R. M. Krauss (2010). "Genome-wide association of lipid-lowering response to statins in combined study populations." PLoS One **5**(3): e9763.

Boekholdt, S. M., F. M. Sacks, J. W. Jukema, J. Shepherd, D. J. Freeman, A. D. McMahon, F. Cambien, V. Nicaud, G. J. de Grooth, P. J. Talmud, S. E. Humphries, G. J. Miller, G. Eiriksdottir, V. Gudnason, H. Kauma, S. Kakko, M. J. Savolainen, M. Arca, A. Montali, S. Liu, H. J. Lanz, A. H. Zwinderman, J. A. Kuivenhoven and J. J. Kastelein (2005). "Cholesteryl ester transfer protein TaqIB variant, high-density lipoprotein cholesterol levels, cardiovascular risk, and efficacy of pravastatin treatment: individual patient meta-analysis of 13,677 subjects." Circulation **111**(3): 278-287.

Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1983). "Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic." J Clin Invest **72**(3): 743-747.

Chasman, D. I., D. Posada, L. Subrahmanyam, N. R. Cook, V. P. Stanton, Jr. and P. M. Ridker (2004). "Pharmacogenetic study of statin therapy and cholesterol reduction." JAMA **291**(23): 2821-2827.

Cholesterol Treatment Trialists, C., C. Baigent, L. Blackwell, J. Emberson, L. E. Holland, C. Reith, N. Bhala, R. Peto, E. H. Barnes, A. Keech, J. Simes and R. Collins (2010). "Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials." Lancet **376**(9753): 1670-1681.

Cholesterol Treatment Trialists, C., B. Mihaylova, J. Emberson, L. Blackwell, A. Keech, J. Simes, E. H. Barnes, M. Voysey, A. Gray, R. Collins and C. Baigent (2012). "The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials." Lancet **380**(9841): 581-590.

Cotureau, M. M., L. L. von Moltke and D. J. Greenblatt (2005). "The influence of age and sex on the clearance of cytochrome P450 3A substrates." Clin Pharmacokinet **44**(1): 33-60.

DATASUS. (2015). "Produção Ambulatorial do SUS.", from <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sia/cnv/gauf.def>.

Demissie, S., L. A. Cupples, A. M. Shearman, K. M. Gruenthal, I. Peter, C. H. Schmid, R. H. Karas, D. E. Housman, M. E. Mendelsohn and J. M. Ordovas (2006). "Estrogen receptor- $\alpha$  variants are associated with lipoprotein size distribution and particle levels in women: the Framingham Heart Study." Atherosclerosis **185**(1): 210-218.

Deroo, B. J. and K. S. Korach (2006). "Estrogen receptors and human disease." J Clin Invest **116**(3): 561-570.

Desai, H., P. W. Hollingsworth and A. R. Chugh (2015). "Statins and aspirin: Do they really work in women?" Am J Cardiovasc Drugs **15**(3): 151-162.

Dubey, R. K. and E. K. Jackson (2001). "Cardiovascular protective effects of 17 $\beta$ -estradiol metabolites." J Appl Physiol **91**(4): 1868-1883.

Ellegren, H. and J. Parsch (2007). "The evolution of sex-biased genes and sex-biased gene expression." Nat Rev Genet **8**(9): 689-698.

Emre, A., S. Sahin, C. Erzik, Z. Nurkalem, D. Oz, B. Cirakoglu, K. Yesilcimen and B. Ersek (2006). "Effect of hormone replacement therapy on plasma lipoproteins and apolipoproteins, endothelial function and myocardial perfusion in postmenopausal women with estrogen receptor-alpha IVS1-397 C/C genotype and established coronary artery disease." Cardiology **106**(1): 44-50.

Fiegenbaum, M., F. R. da Silveira, C. R. Van der Sand, L. C. Van der Sand, M. E. Ferreira, R. C. Pires and M. H. Hutz (2005a). "Pharmacogenetic study of apolipoprotein E, cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase genes and simvastatin therapy in Brazilian subjects." Clin Chim Acta **362**(1-2): 182-188.

Fiegenbaum, M., F. R. da Silveira, C. R. Van der Sand, L. C. Van der Sand, M. E. Ferreira, R. C. Pires and M. H. Hutz (2005b). "The role of common variants of ABCB1, CYP3A4, and CYP3A5 genes in lipid-lowering efficacy and safety of simvastatin treatment." Clin Pharmacol Ther **78**(5): 551-558.

Fiegenbaum, M., F. R. Silveira, C. R. Van der Sand, L. C. Van der Sand, M. E. Ferreira, R. C. Pires and M. H. Hutz (2005c). "Determinants of variable response to simvastatin treatment: the role of common variants of SCAP, SREBF-1a and SREBF-2 genes." Pharmacogenomics J **5**(6): 359-364.

Foryst-Ludwig, A. and U. Kintscher (2010) "Metabolic impact of estrogen signalling through ERalpha and ERbeta." J Steroid Biochem Mol Biol **122**(1-3): 74-81.

Franconi, F. and I. Campesi (2014). "Pharmacogenomics, pharmacokinetics and pharmacodynamics: interaction with biological differences between men and women." Br J Pharmacol **171**(3): 580-594.

Gasparotto, A. S., E. Sprinz, R. K. Lazzaretti, R. Kuhmmer, J. M. Silveira, R. P. Basso, C. A. Pinheiro, M. F. Silveira, J. P. Ribeiro and V. S. Mattevi (2012). "Genetic polymorphisms in estrogen receptors and sexual dimorphism in fat redistribution in HIV-infected patients on HAART." AIDS **26**(1): 19-26.

Hamilton-Craig, I. (2001). "Statin-associated myopathy." Med J Aust **175**(9): 486-489.

Hegele, R. A. (2001). "Monogenic dyslipidemias: window on determinants of plasma lipoprotein metabolism." Am J Hum Genet **69**(6): 1161-1177.

Jochmann, N., K. Stangl, E. Garbe, G. Baumann and V. Stangl (2005). "Female-specific aspects in the pharmacotherapy of chronic cardiovascular diseases." Eur Heart J **26**(16): 1585-1595.

Kajinami, K., M. E. Brousseau, S. Lamon-Fava, J. M. Ordovas and E. J. Schaefer (2005). "Gender-specific effects of estrogen receptor alpha gene haplotype on high-density lipoprotein cholesterol response to atorvastatin: interaction with apolipoprotein AI gene polymorphism." Atherosclerosis **178**(2): 331-338.

Kane, J. P. (2005). Structure and function of the plasma lipoproteins and their receptors. Atherothrombosis and coronary artery disease. L.-W. Wilkins. Philadelphia. **2**.

Kathiresan, S., A. K. Manning, S. Demissie, R. B. D'Agostino, A. Surti, C. Guiducci, L. Gianniny, N. P. Burt, O. Melander, M. Orho-Melander, D. K. Arnett, G. M. Peloso, J. M. Ordovas and L. A. Cupples (2007). "A genome-wide association study for blood lipid phenotypes in the Framingham Heart Study." BMC Med Genet **8 Suppl 1**: S17.

Keskitalo, J. E., K. J. Kurkinen, P. J. Neuvonen and M. Niemi (2008). "ABCB1 haplotypes differentially affect the pharmacokinetics of the acid and lactone forms of simvastatin and atorvastatin." Clin Pharmacol Ther **84**(4): 457-461.

Klos, K. L., E. Boerwinkle, R. E. Ferrell, S. T. Turner and A. C. Morrison (2008). "ESR1 polymorphism is associated with plasma lipid and apolipoprotein levels in Caucasians of the Rochester Family Heart Study." J Lipid Res **49**(8): 1701-1706.

Kostis, W. J., J. Q. Cheng, J. M. Dobrzynski, J. Cabrera and J. B. Kostis (2012). "Meta-analysis of statin effects in women versus men." J Am Coll Cardiol **59**(6): 572-582.

Krobot, K. J., D. D. Yin, E. Alemao and E. Steinhagen-Thiessen (2005). "Real-world effectiveness of lipid-lowering therapy in male and female outpatients with coronary heart disease: relation to pre-treatment low-density lipoprotein-cholesterol, pre-treatment coronary heart disease risk, and other factors." Eur J Cardiovasc Prev Rehabil **12**(1): 37-45.

Kuiper, G. G. and J. A. Gustafsson (1997). "The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens." FEBS Lett **410**(1): 87-90.

Lamon-Fava, S., B. F. Asztalos, T. D. Howard, D. M. Reboussin, K. V. Horvath, E. J. Schaefer and D. M. Herrington (2010). "Association of polymorphisms in genes involved in lipoprotein metabolism with plasma concentrations of remnant

lipoproteins and HDL subpopulations before and after hormone therapy in postmenopausal women." Clin Endocrinol (Oxf) **72**(2): 169-175.

Lima, L. O., S. Almeida, M. H. Hutz and M. Fiegenbaum (2013). "PPARA, RXRA, NR1I2 and NR1I3 gene polymorphisms and lipid and lipoprotein levels in a Southern Brazilian population." Mol Biol Rep **40**(2): 1241-1247.

Lockshin, M. D. (2006). "Sex differences in autoimmune disease." Lupus **15**(11): 753-756.

Mahmoodzadeh, S., T. H. Pham, A. Kuehne, B. Fielitz, E. Dworatzek, G. Kararigas, G. Petrov, M. M. Davidson and V. Regitz-Zagrosek (2012). "17beta-Estradiol-induced interaction of ERalpha with NPPA regulates gene expression in cardiomyocytes." Cardiovasc Res **96**(3): 411-421.

Manolio, T. A., L. D. Brooks and F. S. Collins (2008). "A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease." J Clin Invest **118**(5): 1590-1605.

Mendelsohn, M. E. and R. H. Karas (1999). "The protective effects of estrogen on the cardiovascular system." N Engl J Med **340**(23): 1801-1811.

Molvarec, A., B. Nagy, M. Kovacs, S. Walentin, E. Imreh, J. Rigo, Jr., J. Szalay, G. Fust, Z. Prohaszka and I. Karadi (2007). "Lipid, haemostatic and inflammatory variables in relation to the estrogen receptor alpha (ESR1) PvuII and XbaI gene polymorphisms." Clin Chim Acta **380**(1-2): 157-164.

Mosca, L. (2012). "Controversy and consensus about statin use: it is not about the sex." J Am Coll Cardiol **59**(6): 583-584.

Mosca, L., N. B. Merz, R. S. Blumenthal, M. J. Cziraky, R. P. Fabunmi, C. Sarawate, K. E. Watson, V. J. Willey and E. J. Stanek (2005). "Opportunity for intervention to achieve American Heart Association guidelines for optimal lipid levels in high-risk women in a managed care setting." Circulation **111**(4): 488-493.

Myburgh, R., W. E. Hochfeld, T. M. Dodgen, J. Ker and M. S. Pepper (2012). "Cardiovascular pharmacogenetics." Pharmacol Ther **133**(3): 280-290.

NCBI dbSNP - Retrieved 25 november, 2010, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.

NCEP (2002). "Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report." Circulation **106**(25): 3143-3421.

Neuvonen, P. J., M. Niemi and J. T. Backman (2006). "Drug interactions with lipid-lowering drugs: mechanisms and clinical relevance." Clin Pharmacol Ther **80**(6): 565-581.

Nieminen, T., M. Kahonen, L. E. Viiri, P. Gronroos and T. Lehtimäki (2008). "Pharmacogenetics of apolipoprotein E gene during lipid-lowering therapy: lipid levels and prevention of coronary heart disease." Pharmacogenomics **9**(10): 1475-1486.

Nilsson, S. and J. A. Gustafsson (2001). "Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes." Clin Pharmacol Ther **89**(1): 44-55.

Nilsson, S., S. Makela, E. Treuter, M. Tujague, J. Thomsen, G. Andersson, E. Enmark, K. Pettersson, M. Warner and J. A. Gustafsson (2001). "Mechanisms of estrogen action." Physiol Rev **81**(4): 1535-1565.

Nogueira-de-Souza, N. C., I. D. Guerreiro da Silva, C. V. Carvalho, A. Pulchinelli, M. A. Haidar, E. C. Baracat and A. M. Massad-Costa (2009). "Effect of estrogen receptor-alpha (ESR1) gene polymorphism on high density lipoprotein levels in response to hormone replacement therapy." Braz J Med Biol Res **42**(12): 1138-1142.

Ober, C., D. A. Loisel and Y. Gilad (2008). "Sex-specific genetic architecture of human disease." Nat Rev Genet **9**(12): 911-922.

Ouyang, P., E. D. Michos and R. H. Karas (2006). "Hormone replacement therapy and the cardiovascular system lessons learned and unanswered questions." J Am Coll Cardiol **47**(9): 1741-1753.

Parazzini, F. and G. Progetto Menopausa Italia Study (2003). "Menopausal status, hormone replacement therapy use and risk of self-reported physician-diagnosed osteoarthritis in women attending menopause clinics in Italy." Maturitas **46**(3): 207-212.

Pilote, L., K. Dasgupta, V. Guru, K. H. Humphries, J. McGrath, C. Norris, D. Rabi, J. Tremblay, A. Alamian, T. Barnett, J. Cox, W. A. Ghali, S. Grace, P. Hamet, T. Ho, S. Kirkland, M. Lambert, D. Libersan, J. O'Loughlin, G. Paradis, M. Petrovich and V. Tagalakakis (2007). "A comprehensive view of sex-specific issues related to cardiovascular disease." CMAJ **176**(6): S1-44.

Pogson, G. W., L. H. Kindred and B. G. Carper (1999). "Rhabdomyolysis and renal failure associated with cerivastatin-gemfibrozil combination therapy." Am J Cardiol **83**(7): 1146.

Postma, D. S. (2007). "Gender differences in asthma development and progression." Gend Med **4 Suppl B**: S133-146.

Postmus, I., J. J. Verschuren, A. J. de Craen, P. E. Slagboom, R. G. Westendorp, J. W. Jukema and S. Trompet (2012). "Pharmacogenetics of statins: achievements, whole-genome analyses and future perspectives." Pharmacogenomics **13**(7): 831-840.

Ray, K. K., C. P. Cannon and P. Ganz (2006). "Beyond lipid lowering: What have we learned about the benefits of statins from the acute coronary syndromes trials?" Am J Cardiol **98**(11A): 18P-25P.

Rigby, N. and R. J. Kulathinal (2015). "Genetic architecture of sexual dimorphism in humans." J Cell Physiol **230**(10): 2304-2310.

Rinn, J. L. and M. Snyder (2005). "Sexual dimorphism in mammalian gene expression." Trends Genet **21**(5): 298-305.

Romaine, S. P., K. M. Bailey, A. S. Hall and A. J. Balmforth (2010). "The influence of SLCO1B1 (OATP1B1) gene polymorphisms on response to statin therapy." Pharmacogenomics J **10**(1): 1-11.

Roszkowska-Gancarz, M., A. Kurylowicz, J. Polosak, M. Ambroziak and M. Puzianowska-Kuznicka (2010). "The -351A/G polymorphism of ESR1 is associated with risk of myocardial infarction but not with extreme longevity." Clin Chim Acta **411**(23-24): 1883-1887.

Saltiki, K., E. Mantzou, C. Doukas, I. Kanakakis, P. Zotos, L. Lazaros, I. Georgiou and M. Alevizaki (2009). "Estrogen receptor beta gene variants may be associated with more favorable metabolic profile in postmenopausal women undergoing coronary angiography." Exp Clin Endocrinol Diabetes **117**(10): 610-615.

Santos, P. C., A. C. Morgan, C. E. Jannes, L. Turolla, J. E. Krieger, R. D. Santos and A. C. Pereira (2014). "Presence and type of low density lipoprotein receptor (LDLR) mutation influences the lipid profile and response to lipid-lowering therapy in Brazilian

patients with heterozygous familial hypercholesterolemia." Atherosclerosis **233**(1): 206-210.

Saúde., R. B. d. A. d. T. e. (2009, Setembro de 2009). "Estatinas na prevenção primária de eventos cardiovasculares." Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde, 9, from <http://200.214.130.94/rebrats/publicacoes/Brats09.pdf>.

Scarabin-Carre, V., M. Canonico, S. Brailly-Tabard, S. Trabado, P. Ducimetiere, M. Giroud, J. Ryan, C. Helmer, G. Plu-Bureau, A. Guiochon-Mantel and P. Y. Scarabin (2012). "High level of plasma estradiol as a new predictor of ischemic arterial disease in older postmenopausal women: the three-city cohort study." J Am Heart Assoc **1**(3): e001388.

Sewright, K. A., P. M. Clarkson and P. D. Thompson (2007). "Statin myopathy: incidence, risk factors, and pathophysiology." Curr Atheroscler Rep **9**(5): 389-396.

Sharpe, R. M. (1998). "The roles of oestrogen in the male." Trends Endocrinol Metab **9**(9): 371-377.

Shearman, A. M., L. A. Cupples, S. Demissie, I. Peter, C. H. Schmid, R. H. Karas, M. E. Mendelsohn, D. E. Housman and D. Levy (2003). "Association between estrogen receptor alpha gene variation and cardiovascular disease." JAMA **290**(17): 2263-2270.

Shin, J., S. R. Kayser and T. Y. Langaee (2009). "Pharmacogenetics: from discovery to patient care." Am J Health Syst Pharm **66**(7): 625-637.

Silvestri, S., A. B. Thomsen, A. Gozzini, Y. Bagger, C. Christiansen and M. L. Brandi (2006). "Estrogen receptor alpha and beta polymorphisms: is there an association with bone mineral density, plasma lipids, and response to postmenopausal hormone therapy?" Menopause **13**(3): 451-461.

Smith, S. C., Jr., E. J. Benjamin, R. O. Bonow, L. T. Braun, M. A. Creager, B. A. Franklin, R. J. Gibbons, S. M. Grundy, L. F. Hiratzka, D. W. Jones, D. M. Lloyd-Jones, M. Minissian, L. Mosca, E. D. Peterson, R. L. Sacco, J. Spertus, J. H. Stein and K. A. Taubert (2011). "AHA/ACCF secondary prevention and risk reduction therapy for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease: 2011 update: a guideline from the American Heart Association and American College of Cardiology Foundation endorsed by the World Heart Federation and the Preventive Cardiovascular Nurses Association." J Am Coll Cardiol **58**(23): 2432-2446.

Sortica, V. A., M. Fiegenbaum, L. O. Lima, C. R. Van der Sand, L. C. Van der Sand, M. E. Ferreira, R. C. Pires and M. H. Hutz (2012). "SLCO1B1 gene variability influences lipid-lowering efficacy on simvastatin therapy in Southern Brazilians." Clin Chem Lab Med **50**(3): 441-448.

Sowers, M. R., A. L. Wilson, C. A. Karvonen-Gutierrez and S. R. Kardia (2006). "Sex steroid hormone pathway genes and health-related measures in women of 4 races/ethnicities: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN)." Am J Med **119**(9 Suppl 1): S103-110.

Spinarova, L., J. Spinar, J. Vitovec, A. Linhart, P. Widimsky, M. Fedorco, F. Malek, C. Cihalik, R. Miklik, L. Dusek, K. Zidova, J. Jarkovsky, S. Littnerova and J. Parenica (2012). "Gender differences in total cholesterol levels in patients with acute heart failure and its importance for short and long time prognosis." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **156**(1): 21-28.

Spoletini, I., C. Vitale, W. Malorni and G. M. Rosano (2012). "Sex differences in drug effects: interaction with sex hormones in adult life." Handb Exp Pharmacol (214): 91-105.

Sposito, A. C., B. Caramelli, F. A. Fonseca, M. C. Bertolami, A. Afiune Neto, A. D. Souza, A. M. Lottenberg, A. P. Chacra, A. A. Faludi, A. A. Loures-Vale, A. C. Carvalho, B. Duncan, B. Gelonese, C. Polanczyk, C. R. Rodrigues Sobrinho, C. Scherr, C. Karla, D. Armaganijan, E. Moriguchi, F. Saraiva, G. Pichetti, H. T. Xavier, H. Chaves, J. L. Borges, J. Diamant, J. I. Guimaraes, J. C. Nicolau, J. E. dos Santos, J. J. de Lima, J. L. Vieira, J. P. Novazzi, J. R. Faria Neto, K. P. Torres, A. Pinto Lde, L. Bricarello, L. C. Bodanese, L. Introcaso, M. V. Malachias, M. C. Izar, M. E. Magalhaes, M. I. Schmidt, M. Scartezini, M. Nobre, M. Foppa, N. A. Forti, O. Berwanger, O. C. Gebara, O. R. Coelho, R. C. Maranhao, R. D. dos Santos Filho, R. P. Costa, S. Barreto, S. Kaiser, S. Ihara, T. Carvalho, T. L. Martinez, W. G. Relvas, W. Salgado and C. Sociedade Brasileira de (2007). "[IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology]." Arq Bras Cardiol **88 Suppl 1**: 2-19.

Staffa, J. A., J. Chang and L. Green (2002). "Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis." N Engl J Med **346**(7): 539-540.

Sung, J., K. Lee and Y. M. Song (2009). "Heritabilities of the metabolic syndrome phenotypes and related factors in Korean twins." J Clin Endocrinol Metab **94**(12): 4946-4952.

Teslovich, T. M., K. Musunuru, A. V. Smith, A. C. Edmondson, I. M. Stylianou, M. Koseki, J. P. Pirruccello, S. Ripatti, D. I. Chasman, C. J. Willer, C. T. Johansen, S.

W. Fouchier, A. Isaacs, G. M. Peloso, M. Barbalic, S. L. Ricketts, J. C. Bis, Y. S. Aulchenko, G. Thorleifsson, M. F. Feitosa, J. Chambers, M. Orho-Melander, O. Melander, T. Johnson, X. Li, X. Guo, M. Li, Y. Shin Cho, M. Jin Go, Y. Jin Kim, J. Y. Lee, T. Park, K. Kim, X. Sim, R. Twee-Hee Ong, D. C. Croteau-Chonka, L. A. Lange, J. D. Smith, K. Song, J. Hua Zhao, X. Yuan, J. Luan, C. Lamina, A. Ziegler, W. Zhang, R. Y. Zee, A. F. Wright, J. C. Witteman, J. F. Wilson, G. Willemsen, H. E. Wichmann, J. B. Whitfield, D. M. Waterworth, N. J. Wareham, G. Waeber, P. Vollenweider, B. F. Voight, V. Vitart, A. G. Uitterlinden, M. Uda, J. Tuomilehto, J. R. Thompson, T. Tanaka, I. Surakka, H. M. Stringham, T. D. Spector, N. Soranzo, J. H. Smit, J. Sinisalo, K. Silander, E. J. Sijbrands, A. Scuteri, J. Scott, D. Schlessinger, S. Sanna, V. Salomaa, J. Saharinen, C. Sabatti, A. Ruukonen, I. Rudan, L. M. Rose, R. Roberts, M. Rieder, B. M. Psaty, P. P. Pramstaller, I. Pichler, M. Perola, B. W. Penninx, N. L. Pedersen, C. Pattaro, A. N. Parker, G. Pare, B. A. Oostra, C. J. O'Donnell, M. S. Nieminen, D. A. Nickerson, G. W. Montgomery, T. Meitinger, R. McPherson, M. I. McCarthy, W. McArdle, D. Masson, N. G. Martin, F. Marroni, M. Mangino, P. K. Magnusson, G. Lucas, R. Luben, R. J. Loos, M. L. Lokki, G. Lettre, C. Langenberg, L. J. Launer, E. G. Lakatta, R. Laaksonen, K. O. Kyvik, F. Kronenberg, I. R. Konig, K. T. Khaw, J. Kaprio, L. M. Kaplan, A. Johansson, M. R. Jarvelin, A. C. Janssens, E. Ingelsson, W. Igl, G. Kees Hovingh, J. J. Hottenga, A. Hofman, A. A. Hicks, C. Hengstenberg, I. M. Heid, C. Hayward, A. S. Havulinna, N. D. Hastie, T. B. Harris, T. Haritunians, A. S. Hall, U. Gyllenstein, C. Guiducci, L. C. Groop, E. Gonzalez, C. Gieger, N. B. Freimer, L. Ferrucci, J. Erdmann, P. Elliott, K. G. Ejebe, A. Doring, A. F. Dominiczak, S. Demissie, P. Deloukas, E. J. de Geus, U. de Faire, G. Crawford, F. S. Collins, Y. D. Chen, M. J. Caulfield, H. Campbell, N. P. Burt, L. L. Bonnycastle, D. I. Boomsma, S. M. Boekholdt, R. N. Bergman, I. Barroso, S. Bandinelli, C. M. Ballantyne, T. L. Assimes, T. Quertermous, D. Altshuler, M. Seielstad, T. Y. Wong, E. S. Tai, A. B. Feranil, C. W. Kuzawa, L. S. Adair, H. A. Taylor, Jr., I. B. Borecki, S. B. Gabriel, J. G. Wilson, H. Holm, U. Thorsteinsdottir, V. Gudnason, R. M. Krauss, K. L. Mohlke, J. M. Ordovas, P. B. Munroe, J. S. Kooner, A. R. Tall, R. A. Hegele, J. J. Kastelein, E. E. Schadt, J. I. Rotter, E. Boerwinkle, D. P. Strachan, V. Mooser, K. Stefansson, M. P. Reilly, N. J. Samani, H. Schunkert, L. A. Cupples, M. S. Sandhu, P. M. Ridker, D. J. Rader, C. M. van Duijn, L. Peltonen, G. R. Abecasis, M. Boehnke and S. Kathiresan (2010). "Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids." *Nature* **466**(7307): 707-713.

Thompson, J. F., C. L. Hyde, L. S. Wood, S. A. Paciga, D. A. Hinds, D. R. Cox, G. K. Hovingh and J. J. Kastelein (2009). "Comprehensive whole-genome and candidate gene analysis for response to statin therapy in the Treating to New Targets (TNT) cohort." *Circ Cardiovasc Genet* **2**(2): 173-181.

Thompson, P. D., P. M. Clarkson, R. S. Rosenson and P. National Lipid Association Statin Safety Task Force Muscle Safety Expert (2006). "An assessment of statin safety by muscle experts." *Am J Cardiol* **97**(8A): 69C-76C.

Touze, E. and P. M. Rothwell (2007). "Heritability of ischaemic stroke in women compared with men: a genetic epidemiological study." *Lancet Neurol* **6**(2): 125-133.

Tribut, O., Y. Lessard, J. M. Reymann, H. Allain and D. Bentue-Ferrer (2002). "Pharmacogenomics." Med Sci Monit **8**(7): RA152-163.

Tunstall-Pedoe, H., K. Kuulasmaa, M. Mahonen, H. Tolonen, E. Ruokokoski and P. Amouyel (1999). "Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease." Lancet **353**(9164): 1547-1557.

Urquhart, B. L., R. G. Tirona and R. B. Kim (2007). "Nuclear receptors and the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters: implications for interindividual variability in response to drugs." J Clin Pharmacol **47**(5): 566-578.

Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. Ke, K. A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, A. Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Zhang, H. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, S. Zhu, S. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, A. Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. An, A. Awe, D. Baldwin, H. Baden, M. Barnstead, I. Barrow, K. Beeson, D. Busam, A. Carver, A. Center, M. L. Cheng, L. Curry, S. Danaher, L. Davenport, R. Desilets, S. Dietz, K. Dodson, L. Doup, S. Ferreira, N. Garg, A. Gluecksmann, B. Hart, J. Haynes, C. Haynes, C. Heiner, S. Hladun, D. Hostin, J. Houck, T. Howland, C. Ibegwam, J. Johnson, F. Kalush, L. Kline, S. Koduru, A. Love, F. Mann, D. May, S. McCawley, T. McIntosh, I. McMullen, M. Moy, L. Moy, B. Murphy, K. Nelson, C. Pfannkoch, E. Pratts, V. Puri, H. Qureshi, M. Reardon, R. Rodriguez, Y. H. Rogers, D. Romblad, B. Ruhfel, R. Scott, C. Sitter, M. Smallwood, E. Stewart, R. Strong, E. Suh, R. Thomas, N. N. Tint, S. Tse, C. Vech, G. Wang, J. Wetter, S. Williams, M. Williams, S. Windsor, E. Winn-Deen, K. Wolfe, J. Zaveri, K. Zaveri, J. F. Abril, R. Guigo, M. J. Campbell, K. V. Sjolander, B. Karlak, A. Kejariwal, H. Mi, B. Lazareva, T. Hatton, A. Narechania, K. Diemer, A. Muruganujan, N. Guo, S. Sato, V. Bafna, S. Istrail, R. Lippert, R. Schwartz, B. Walenz, S. Yooseph, D. Allen, A. Basu, J. Baxendale, L. Blick, M. Caminha, J. Carnes-Stine, P. Caulk, Y. H. Chiang, M. Coyne, C. Dahlke, A. Mays, M. Dombroski, M. Donnelly, D. Ely, S. Esparham, C. Fosler, H. Gire, S. Glanowski, K. Glasser, A. Glodek, M. Gorokhov, K. Graham, B. Gropman, M. Harris, J. Heil, S.

Henderson, J. Hoover, D. Jennings, C. Jordan, J. Jordan, J. Kasha, L. Kagan, C. Kraft, A. Levitsky, M. Lewis, X. Liu, J. Lopez, D. Ma, W. Majoros, J. McDaniel, S. Murphy, M. Newman, T. Nguyen, N. Nguyen, M. Nodell, S. Pan, J. Peck, M. Peterson, W. Rowe, R. Sanders, J. Scott, M. Simpson, T. Smith, A. Sprague, T. Stockwell, R. Turner, E. Venter, M. Wang, M. Wen, D. Wu, M. Wu, A. Xia, A. Zandieh and X. Zhu (2001). "The sequence of the human genome." Science **291**(5507): 1304-1351.

Verschuren, J. J., S. Trompet, J. A. Wessels, H. J. Guchelaar, M. P. de Maat, M. L. Simoons and J. W. Jukema (2012). "A systematic review on pharmacogenetics in cardiovascular disease: is it ready for clinical application?" Eur Heart J **33**(2): 165-175.

Waxman, D. J. and M. G. Holloway (2009). "Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes." Mol Pharmacol **76**(2): 215-228.

Weinshilboum, R. M. and L. Wang (2006). "Pharmacogenetics and pharmacogenomics: development, science, and translation." Annu Rev Genomics Hum Genet **7**: 223-245.

Weissglas-Volkov, D. and P. Pajukanta (2010) "Genetic causes of high and low serum HDL-cholesterol." J Lipid Res **51**(8): 2032-2057.

Weng, T. C., Y. H. Yang, S. J. Lin and S. H. Tai (2010). "A systematic review and meta-analysis on the therapeutic equivalence of statins." J Clin Pharm Ther **35**(2): 139-151.

WHO, W. H. O. (2015). "Disease and Injury Country Estimates." from [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/estimates\\_country/en/](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates_country/en/).

Xavier H. T., I. M. C., Faria Neto J. R., Assad M. H., Rocha V. Z., Sposito A. C., Fonseca F. A., dos Santos J. E., Santos R. D., Bertolami M. C., Faludi A. A., Martinez T. L. R., Diamant J., Guimarães A., Forti N. A., Moriguchi E., Chagas A. C. P., Coelho O. R., Ramires J. A. F. (2013). "Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose." Arq Bras Cardiol **101**(4): 22.

Xhyheri, B. and R. Bugiardini (2010). "Diagnosis and treatment of heart disease: are women different from men?" Prog Cardiovasc Dis **53**(3): 227-236.

Yoon, M. (2010). "PPARalpha in obesity: sex difference and estrogen Involvement." PPAR Res.

Zhao, T., D. Zhang, Y. Liu, D. Zhou, Z. Chen, Y. Yang, S. Li, L. Yu, Z. Zhang, G. Feng, L. He and H. Xu (2010). "Association between ESR1 and ESR2 gene polymorphisms and hyperlipidemia in Chinese Han postmenopausal women." J Hum Genet **55**(1): 50-54.

Zintzaras, E., G. D. Kitsios, F. Triposkiadis, J. Lau and G. Raman (2009). "APOE gene polymorphisms and response to statin therapy." Pharmacogenomics J **9**(4): 248-257.



A dislipidemia constitui-se como o principal fator de risco para o desenvolvimento de DCV, a principal causa de morte no mundo. A literatura mostra que existe diferença sobre o risco de desenvolvimento de DCV entre homens e mulheres de mesma idade. A hipercolesterolemia é uma condição que apresenta destaque dentre os fatores de risco para o desenvolvimento de DCV e é determinada por fatores genéticos e ambientais. Muitos esforços têm sido realizados na tentativa de elucidar o tamanho do efeito que o componente genético apresenta em relação ao risco de DCV e também quais são as variantes envolvidas, entretanto, ainda existe uma lacuna dentro desse campo.

O controle da dislipidemia através da utilização de fármacos hipolipemiantes tem crescido em todo o mundo e, por isso, a investigação da influência da variabilidade genética na resposta deste tipo de terapia (eficácia e desenvolvimento de efeitos adversos) ganha enorme relevância. Somado a isso, as diferenças observadas entre os sexos, como a maior concentração de estrógeno nas mulheres, também podem contribuir para a heterogeneidade dos níveis lipídicos em resposta à terapia hipolipemiante. Yoon (2010) em um estudo de revisão sugere que o dimorfismo sexual e os receptores estrogênicos apresentam um envolvimento com a resposta a terapias hipolipemiantes. Ao melhor de nosso conhecimento existe apenas um estudo presente na literatura avaliando dois polimorfismos no gene *ESR1* (rs2234693 e rs9340799) com a resposta à terapia com atorvastatina (Kajinami et al., 2005). Os resultados deste estudo demonstram que os dois polimorfismos analisados foram associados com diferentes níveis de HDL-C em resposta à terapia com atorvastatina (10 mg). Essa associação foi detectada apenas em mulheres e não em homens. Em relação ao gene *ESR2* não localizamos na literatura estudos de associação com a eficácia e com a segurança da terapia com estatinas. Nesse contexto, o estudo de polimorfismos nos receptores de estrógeno pode nos auxiliar na determinação do efeito da variabilidade genética desses genes na magnitude da resposta hipolipemiante e no desenvolvimento de efeitos adversos em pacientes usuários de estatinas. Assim como, determinar se existe dimorfismo sexual na eficácia farmacológica do tratamento e se este dimorfismo pode ser explicado parcialmente ou ser influenciado por estes polimorfismos. Por isso, enfatizamos a importância da realização de estudos de coorte com acompanhamento dos casos para avaliar a eficácia de tratamentos com estas estatinas.

#### 4. Delineamento do estudo

---

Este estudo de coorte prospectivo foi realizado com 495 indivíduos hipercolesterolêmicos em uso de terapia hipolipemiante com sinvastatina ou atorvastatina. Os participantes do estudo eram descendentes de europeus, classificados pela cor da pele e por características morfológicas, residentes na região metropolitana de Porto Alegre, Brasil, e foram selecionados por conveniência em uma clínica de cardiologia em Porto Alegre.



## 5.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil lipídico basal e a resposta da terapia com hipolipemiantes (sinvastatina ou atorvastatina), separadamente entre homens e mulheres e a possível associação de variantes genéticas em genes relacionados ao mecanismo de ação dos estrogênios.

## 5.2 Objetivos específicos

5.2.1 Descrever as características gerais da coorte estudada;

5.2.2 Investigar a associação de polimorfismos nos genes *ESR1* e *ESR2* com o perfil lipídico basal em pacientes usuários de terapia hipolipemiante;

5.2.3 Investigar a associação de polimorfismos nos genes *ESR1* e *ESR2* com a resposta da terapia hipolipemiante;

5.2.4 Investigar se os polimorfismos genéticos estudados podem influenciar diferentemente na resposta terapêutica hipolipemiante em homens e mulheres.



Os resultados obtidos a partir deste trabalho permitiram a elaboração de três artigos científicos.

### **Artigo 1**

---

*Evaluation of Sexual Dimorphism in the Efficacy and Safety of Simvastatin/Atorvastatin Therapy in a Southern Brazilian Cohort*

Publicado na revista Arquivos Brasileiros de Cardiologia em julho de 2014.

### **Artigo 2**

---

*ESR1 polymorphisms and statin therapy response: a gender-specific approach.*

Publicado na revista The Pharmacogenomics Journal em 25 de agosto de 2015.

### **Artigo 3**

---

*ESR2 rs1256049: a potential role on LDL-C baseline levels in elderly women.*

Submetido à revista Annals of Nutrition & Metabolism em 24 de abril de 2015.



## Artigo Original



# Papel do Dimorfismo Sexual na Eficácia e Segurança da Terapia com Sinvastatina ou Atorvastatina em uma Coorte no Sul do Brasil

*Evaluation of Sexual Dimorphism in the Efficacy and Safety of Simvastatin/Atorvastatin Therapy in a Southern Brazilian Cohort*

Lisiane Smiderle<sup>1</sup>, Luciana O. Lima<sup>2</sup>, Mara Helena Hutz<sup>2</sup>, César Roberto Van der Sand<sup>3</sup>, Luiz Carlos Van der Sand<sup>3</sup>, Maria Elvira Wagner Ferreira<sup>3</sup>, Renan Canibal Pires<sup>3</sup>, Silvana Almeida<sup>1</sup>, Marilu Fiegenbaum<sup>1</sup>

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre<sup>1</sup>; Universidade Federal do Rio Grande do Sul<sup>2</sup>; Centro de Diagnóstico Cardiológico<sup>3</sup>, Porto Alegre, RS - Brasil

## Resumo

**Fundamento:** A dislipidemia é o principal fator de risco para doenças cardiovasculares e as estatinas são efetivas no controle do perfil lipídico. Diferenças sexuais na farmacocinética e farmacodinâmica contribuem para a variação interindividual na eficácia e toxicidade de fármacos.

**Objetivo:** Avaliar a existência de dimorfismo sexual na eficácia e segurança do tratamento com sinvastatina/atorvastatina.

**Métodos:** 495 sujeitos (331 mulheres e 164 homens) tiveram seus níveis lipídicos mensurados antes e após 6±3 meses de tratamento com sinvastatina/atorvastatina para avaliação dos perfis de eficácia e segurança.

**Resultados:** As mulheres apresentaram maiores níveis basais de colesterol total, LDL-C e HDL-C quando comparadas aos homens ( $p < 0,0001$ ). Após o tratamento, mulheres tiveram uma maior redução dos níveis de colesterol total e de LDL-C que homens. Após ajuste para covariáveis, foi observado que os níveis basais de colesterol total e de LDL-C são responsáveis por cerca de 30% da eficácia ( $p < 0,001$ ), independentemente do sexo. Mialgia (com ou sem alteração de creatina fosfoquinase - CPK) ocorreu mais frequentemente em mulheres (25,9%) ( $p = 0,002$ ), enquanto o aumento isolado de CPK e alterações de função hepática foram mais frequentemente observados em homens (17,9%) ( $p = 0,017$ ).

**Conclusões:** Nossos resultados demonstram que os níveis basais de colesterol total e LDL-C são os maiores preditores da eficácia do tratamento, independente do sexo. Adicionalmente, sugerimos que existe dimorfismo sexual na segurança do tratamento com sinvastatina/atorvastatina. O efeito das diferenças sexuais em receptores, proteínas transportadoras e rotas de expressão gênica devem ser avaliados e caracterizados para confirmar estas observações. (Arq Bras Cardiol. 2014; [online].ahead print, PP.0-0)

**Palavras-chave:** Sinvastatina; Atorvastatina; Dimorfismo sexual; Lipídeos.

## Abstract

**Background:** Dyslipidemia is the primary risk factor for cardiovascular disease, and statins have been effective in controlling lipid levels. Sex differences in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of statins contribute to interindividual variations in drug efficacy and toxicity.

**Objective:** To evaluate the presence of sexual dimorphism in the efficacy and safety of simvastatin/atorvastatin treatment.

**Methods:** Lipid levels of 495 patients (331 women and 164 men) were measured at baseline and after 6 ± 3 months of simvastatin/atorvastatin treatment to assess the efficacy and safety profiles of both drugs.

**Results:** Women had higher baseline levels of total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) compared with men ( $p < 0,0001$ ). After treatment, women exhibited a greater decrease in plasma TC and LDL-C levels compared with men. After adjustment for covariates, baseline levels of TC and LDL-C influenced more than 30% of the efficacy of lipid-lowering therapy ( $p < 0,001$ ), regardless of sex. Myalgia [with or without changes in creatine phosphokinase (CPK) levels] occurred more frequently in women (25.9%;  $p = 0,002$ ), whereas an increase in CPK and/or abnormal liver function was more frequent in men (17.9%;  $p = 0,017$ ).

**Conclusions:** Our results show that baseline TC and LDL-C levels are the main predictors of simvastatin/atorvastatin therapy efficacy, regardless of sex. In addition, they suggest the presence of sexual dimorphism in the safety of simvastatin/atorvastatin. The effect of sex differences on receptors, transporter proteins, and gene expression pathways needs to be better evaluated and characterized to confirm these observations. (Arq Bras Cardiol. 2014; [online].ahead print, PP.0-0)

**Keywords:** Simvastatin; Atorvastatin; Sexual dimorphism; Lipids.

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

Correspondência: Marilu Fiegenbaum •

Rua Sarmento Leite 245/403, Centro Histórico. CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS - Brasil

Email: mariluf@ufcspa.edu.br; marilu\_fiegenbaum@yahoo.com.br

Artigo recebido em 09/12/13; revisado em 02/04/14; aceito em 17/04/14.

DOI: xxx/abc.2013xxxx

## Introdução

A dislipidemia é o principal fator de risco para doenças cardiovasculares (DCV)<sup>1</sup>. As estatinas são uma classe de medicamentos hipolipemiantes que inibem a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, uma enzima chave na síntese intracelular de colesterol. As estatinas promovem ainda aumento no número de receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) em hepatócitos, aumento na remoção de partículas de LDL-C do sangue e redução dos níveis de colesterol total e LDL-C<sup>2</sup>.

Além de seus efeitos cardioprotetores, as estatinas também apresentam efeitos pleiotrópicos, incluindo propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes<sup>3</sup>. Embora as estatinas sejam bem toleradas no organismo e sejam seguras, alguns indivíduos desenvolvem reações adversas a medicamentos (RAM) ou os medicamentos não tem a eficácia farmacológica desejada<sup>4</sup>. O uso de outros fármacos juntamente com as estatinas pode aumentar o risco de RAM devido à ocorrência de interações medicamentosas<sup>5</sup>.

A resposta aos medicamentos pode variar em decorrência do dimorfismo sexual<sup>6</sup>. Variações na farmacocinética e farmacodinâmica entre os sexos contribuem para diferenças interindividuais na eficácia e toxicidade das drogas<sup>7</sup>. Fatores hormonais endógenos diferem entre homens e mulheres, e os efeitos e quantidade dos hormônios mudam com a idade<sup>6,8</sup>. A incidência de DCV é menor em mulheres durante o período reprodutivo do que em homens da mesma idade<sup>9</sup>. O hormônio sexual estrogênio (17 $\beta$ -estradiol) pode contribuir para a diminuição da incidência de DCVs em mulheres<sup>10</sup>. No entanto, as mulheres após a menopausa são mais suscetíveis ao desenvolvimento de DCVs do que os homens<sup>8</sup>.

Uma meta-análise publicada recentemente mostrou que os benefícios das estatinas na prevenção primária e secundária de DCV não diferiram entre os sexos<sup>11</sup>. No entanto, dos 18 estudos analisados, apenas 7 estavam relacionados à terapia com sinvastatina ou atorvastatina. Além disso, este estudo não forneceu dados da eficácia e segurança de estatinas em relação aos sexos<sup>12</sup>. Assim, destacamos a importância dos estudos que forneçam dados de eficácia e segurança de terapias hipolipemiantes, e que estudem o papel do dimorfismo sexual e de interações medicamentosas.

O objetivo do presente estudo foi determinar o papel do dimorfismo sexual e de interações medicamentosas sobre a eficácia e segurança da terapia com sinvastatina ou atorvastatina em uma coorte do sul do Brasil, de descendentes de europeus.

## Métodos

### Grupo de estudo

Este estudo de coorte aberto e prospectivo foi realizado com indivíduos hipercolesterolêmicos submetidos à terapia hipolipemiante com sinvastatina ou atorvastatina. Os participantes do estudo eram descendentes de europeus, classificados pela cor da pele e por características morfológicas, residentes de Porto Alegre, Brasil, e coletados por conveniência. O tamanho da amostra foi estimado

pelo desvio padrão de LDL-C e pela diferença esperada entre homens e mulheres, considerando-se os seguintes valores: poder de 80%, nível de significância de 5%, diferença entre homens e mulheres de 5 pontos percentuais e um desvio padrão de 18 mg/dL. Considerando esses parâmetros, o tamanho da amostra estimado inicialmente foi de 205 homens e 205 mulheres. A triagem inicial incluiu 658 indivíduos. Após a aplicação dos critérios de exclusão (idade inferior a 20 anos, concentração de triglicérides  $\geq 400$  mg/dL, níveis alterados de hormônio estimulante da tireoide, comprometimento de funções hepáticas ou renais, doença instável ou descontrolada que pudesse exercer influência sobre o metabolismo lipídico, e indivíduos anteriormente submetidos a tratamentos utilizando medicamentos hipolipemiantes), 495 pacientes preencheram os critérios de inclusão para a realização do tratamento com sinvastatina ou atorvastatina, e foram incluídos no estudo. O exame físico, os dados clínicos e os dados da avaliação laboratorial foram coletados pelo médico. Determinações bioquímicas foram realizadas antes do início do tratamento com estatinas, e após 6 meses de tratamento, para avaliação da eficácia terapêutica. A terapia com estatinas e a dose administrada foram determinadas pelo médico de acordo com as características clínicas de cada paciente. Os participantes receberam outros medicamentos, incluindo bloqueadores dos canais de cálcio, diuréticos, antitrombóticos e não mudaram os seus regimes de medicação durante o período do estudo.

Para avaliar a eficácia do efeito hipolipemiante, as concentrações lipídicas foram quantificadas no início do estudo e após  $6 \pm 3$  meses de tratamento. Cento e sessenta e dois indivíduos que permaneceram em tratamento por pelo menos um ano ( $35 \pm 22$  meses) e não apresentaram RAM foram designados como o grupo controle. Os indivíduos que apresentaram RAM, independentemente da duração do tratamento com estatinas, foram designados como o grupo caso. RAM foi considerada pelo médico quando os participantes apresentaram um ou mais casos de mialgia, com ou sem aumento de creatina fosfoquinase (CPK) e concomitante comprometimento de funções hepáticas durante o tratamento com estatinas. Mialgia foi definida como dor muscular com níveis séricos de CPK normais ou aumentados, e alterações nos níveis séricos das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) ou aspartato aminotransferase (AST). A avaliação da presença de RAM foi realizada a cada 3 meses, em média. Os participantes não foram incluídos no grupo RAM quando outras condições não relacionadas pudessem ter causado dor muscular, tais como mialgia induzida pelo exercício físico, artrite e mialgia viral.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Todos os indivíduos que concordaram em participar deste estudo forneceram o seu consentimento informado. Estudos anteriores haviam avaliado parte desta amostra<sup>13-17</sup>. O apoio financeiro foi fornecido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Brasil), e pelo programa de bolsas REUNI/UFCSPA, PROAP-CAPES, PRONEX-FAPERGS/CNPq e PRONEN-FAPERGS/CNPq.

## Artigo Original

## Análises bioquímicas

Os níveis séricos de colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL-C) e triglicérides (TG) foram determinados a partir do sangue periférico obtido após 12 horas de jejum por métodos padrão, utilizando kits comerciais. Os níveis de LDL-C foram calculados de acordo com o método proposto por Friedewald e cols.<sup>18</sup>. A percentagem de indivíduos que apresentaram níveis lipídicos normais após o tratamento foi avaliada de acordo com as seguintes normas estabelecidas pelo *National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III)<sup>19</sup> para a prevenção primária de doenças cardiovasculares: CT <200 mg/dL, LDL-C <100 mg/dL, HDL-C >60 mg/dL, e TG <150 mg/dL.

## Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS® versão 18.0 (Chicago, IL, EUA). Os níveis de TG foram transformados em logaritmo natural para remover a assimetria dos dados, e os valores não transformados são mostrados. As análises foram realizadas utilizando a amostra total e estratificada por sexo. Nós padronizamos a variável relacionada à dose de estatina para evitar diferenças na eficácia dos agentes hipolipemiantes. Com base no método proposto por Kivistö e cols.<sup>20</sup>, as doses diárias de simvastatina foram transformadas em doses equivalentes de atorvastatina numa proporção de 2:1. A percentagem média de alteração nos níveis lipídicos plasmáticos foi obtida a partir da diferença dos níveis lipídicos pré- e pós-tratamento, multiplicado por 100 e dividido pelo nível do pré-tratamento para cada parâmetro. Para analisar a associação entre o dimorfismo sexual e o efeito hipolipemiante, a percentagem média de alteração nos níveis lipídicos plasmáticos foi comparada pela soma dos quadrados do Modelo Linear Geral tipo III. Os modelos foram ajustados para idade, tabagismo, níveis lipídicos basais, DCV prévia, hipotireoidismo controlado e uso de antitrombóticos. A análise de regressão linear foi realizada para avaliar o efeito das variáveis sobre a eficácia do efeito hipolipemiante. As variáveis contínuas são apresentadas como a média  $\pm$  desvio padrão. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. O teste-t de Student foi realizado para avaliar as diferenças entre variáveis contínuas. As variáveis categóricas foram comparadas por meio do teste de qui-quadrado [um valor de  $p < 0,05$  com duas caudas de distribuição foi considerado significativo] com correção de Yates. Os valores residuais ajustados [análises realizadas célula por célula] e o poder dos testes foram avaliadas utilizando WINPEPI<sup>21</sup>, quando apropriado.

## Resultados

## Perfil clínico da coorte

Nós investigamos 495 descendentes de europeus residentes no sul do Brasil que realizaram tratamento hipolipemiante com simvastatina ou atorvastatina. Este estudo de base populacional incluiu 331 (66,9%) mulheres e 164 (33,1%) homens, dos quais 85,1 % eram usuários de simvastatina e 14,9 % dos participantes eram usuários de atorvastatina. O tempo médio de tratamento

não diferiu entre os sexos, e foi de  $6,4 \pm 3,4$  e  $6,1 \pm 2,9$  meses ( $p = 0,357$ ) para mulheres e homens, respectivamente. A dose padrão de estatinas não diferiu entre as mulheres ( $10,3 \pm 4,7$  mg) e os homens ( $10,2 \pm 4,3$  mg) ( $p = 0,840$ ). A idade dos participantes variou entre 25 e 82 anos ( $61 \pm 11$  anos). A idade média dos participantes do sexo feminino ( $62,3 \pm 10,7$  anos) foi superior à idade dos indivíduos do sexo masculino ( $59,9 \pm 11,1$  anos) ( $p = 0,021$ ). Observou-se um maior número de fumantes entre os homens ( $p = 0,008$ ), enquanto o hipotireoidismo foi mais comum em mulheres ( $p < 0,0001$ ). As características clínicas e demográficas da amostra estão descritas na Tabela 1. No presente estudo, as mulheres apresentaram níveis médios basais de CT, LDL-C e HDL-C maiores que os níveis obtidos em homens ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 2).

## Eficácia e segurança da terapia hipolipemiante e papel do dimorfismo sexual

Durante o tratamento, 96,5% dos indivíduos atingiram níveis normais de LDL-C e 73,8% e 72,6% deles atingiram os níveis lipídicos desejados de CT e TG, respectivamente. A análise dos níveis de HDL-C revelou que 85,5% dos homens e 51,9% das mulheres alcançaram os níveis recomendados. A percentagem de homens e mulheres que apresentou níveis normalizados de CT e LDL-C foi muito semelhante: 88,9% para CT e 86,8% para LDL-C em mulheres, e 88,5% para CT e 87,2% para LDL-C em homens. A Tabela 3 mostra a percentagem média de alteração nos níveis lipídicos em relação ao sexo. As mulheres apresentaram uma maior redução nos níveis plasmáticos de CT ( $-27,32 \pm 12,51$  versus  $-24,57 \pm 12,08$ ,  $p = 0,028$ ) e de LDL-C ( $-37,61 \pm 18,34$  versus  $-33,49 \pm 7,38$ ,  $p = 0,014$ ) comparado com indivíduos do sexo masculino, respectivamente, após seis meses de acompanhamento. Depois do ajuste para covariáveis, observou-se que os níveis basais de CT e LDL-C foram o principal fator preditor da eficácia da simvastatina e atorvastatina. O modelo de regressão linear indica que os níveis basais de CT influenciam em 35,8% ( $p < 0,001$ ) e LDL-C em 36,3% ( $p < 0,001$ ) na redução desses parâmetros em resposta à terapia hipolipemiante nesta coorte (Tabela 4).

Ao avaliar a segurança dos tratamentos com simvastatina ou atorvastatina, observou-se que 74 (14,9%) participantes relataram RAM. Mialgia (com ou sem alterações da CPK) ocorreu mais frequentemente em mulheres (25,9%) ( $p = 0,002$ ) do que nos homens, ao passo que o aumento da CPK e/ou alteração de funções hepáticas ocorreram mais frequentemente em homens (17,9%) ( $p = 0,017$ ) do que em mulheres (Tabela 5).

## Interações medicamentosas

Os efeitos da terapia hipolipemiante também foram avaliados com co-medicações, incluindo: beta-bloqueadores, antitrombóticos, levotiroxinas, diuréticos, inibidores da enzima conversora de angiotensina, bloqueadores dos canais de cálcio, vasodilatadores, nitratos, benzodiazepínicos, bem como inibidores, substratos e indutores do citocromo P450 (CYP). Mulheres que usavam bloqueadores dos canais de cálcio, diuréticos e antitrombóticos apresentaram uma maior frequência de RAM ( $p = 0,014$ ,  $p = 0,014$  e  $p = 0,002$ , respectivamente).

Tabela 1 – Características da coorte

| Características                 | Ambos os sexos | Mulheres    | Homens       | p <sup>a</sup> |
|---------------------------------|----------------|-------------|--------------|----------------|
| Número de indivíduos            | 495            | 331 (66,9%) | 164 (33,1%)  |                |
| Idade (anos)                    | 61,5 ± 10,9    | 62,3 ± 10,7 | 59,9 ± 11,1  | 0,021          |
| Uso de estatinas (%)            |                |             |              | 0,229          |
| Simvastatina                    | 85,1           | 86,8        | 81,8         |                |
| Atorvastatina                   | 14,9           | 13,2        | 18,2         |                |
| Tempo de tratamento (meses)     | 6,3 ± 3,2      | 6,4 ± 3,4   | 6,1 ± 2,9    | 0,357          |
| Dose padronizada (mg)           | 10,2 ± 4,6     | 10,3 ± 4,7  | 10,2 ± 4,3   | 0,840          |
| Mulheres pós-menopausa (%)      |                | 76,0        |              |                |
| Uso de terapia hormonal (%)     |                | 14,1        |              |                |
| Tabagismo (%)                   |                |             |              | 0,020          |
| Passado                         | 12,1           | 8,9         | 18,2         |                |
| Presente                        | 8,7            | 8,1         | 9,8          |                |
| Não fumantes                    | 78,5           | 82,8        | 71,2         |                |
| DCV anterior (%)                | 32,5           | 28,8        | 40,0         | 0,014          |
| Histórico familiar de DCV (%)   | 17,7           | 16,7        | 19,7         | 0,578          |
| Glicose (mg/dL)                 | 100,2 ± 23,9   | 99,8 ± 26,1 | 100,9 ± 19,3 | 0,658          |
| Diabetes (%)                    | 18,7           | 17,4        | 21,2         | 0,465          |
| Hipertensão (%)                 | 71,3           | 71,3        | 71,2         | 1,000          |
| Hipotireoidismo controlado (%)  | 15,1           | 20,5        | 4,5          | <0,001         |
| Uso de co-medicações (%)        |                |             |              |                |
| Bloqueadores de canal de cálcio | 17,9           | 16,3        | 21,3         | 0,165          |
| Diuréticos                      | 39,5           | 42,0        | 34,7         | 0,126          |
| Antitrombóticos                 | 26,6           | 23,8        | 32,3         | 0,039          |
| Substratos do CYP3A4            | 17,6           | 16,6        | 19,5         | 0,362          |
| Indutores do CYP3A4             | 1,6            | 1,5         | 1,8          | 0,719          |
| Inibidores do CYP3A4            | 21,6           | 20,2        | 24,4         | 0,228          |

Idade, tempo de tratamento, dose padronizada e níveis de glicose foram expressos como média ± desvio-padrão; <sup>a</sup>p indica comparações entre homens e mulheres; DCV: Doenças cardiovasculares.

Tabela 2 – Níveis lipídicos basais antes do tratamento de acordo com o sexo

|                         | Ambos os sexos (n = 495) | Mulheres (n = 331) | Homens (n = 164) | p <sup>a</sup> |
|-------------------------|--------------------------|--------------------|------------------|----------------|
| CT (mg/dL)              | 247,3 ± 39,9             | 254,1 ± 39,5       | 234,2 ± 37,5     | < 0,0001       |
| LDL-C (mg/dL)           | 164,4 ± 35,6             | 169,1 ± 34,9       | 154,9 ± 36,3     | < 0,0001       |
| HDL-C (mg/dL)           | 51,1 ± 12,8              | 54,0 ± 13,0        | 46,2 ± 11,0      | < 0,0001       |
| TG (mg/dL) <sup>b</sup> | 157,7 ± 78,6             | 154,2 ± 68,3       | 164,8 ± 96,3     | 0,384          |

Os valores representam média ± desvio padrão; CT: colesterol total; LDL-C: lipoproteína de baixa densidade; HDL-C: lipoproteína de alta densidade; TG: triglicérides;

<sup>a</sup> Comparações entre homens e mulheres usando o test t de Student; <sup>b</sup> Os valores de TG foram transformados em logaritmo natural para a realização de comparações.

## Artigo Original

Tabela 3 – Porcentagem média de mudança nos níveis lipídicos de acordo com o sexo

|           | Ambos os sexos (n = 495) | Mulheres (n = 331) | Homens (n = 164) | p <sup>a</sup> | p <sup>b</sup> |
|-----------|--------------------------|--------------------|------------------|----------------|----------------|
| CT (%)    | -26,40 ± 12,42           | -27,32 ± 12,51     | -24,57 ± 12,08   | 0,028          | 0,406          |
| LDL-C (%) | -36,41 ± 17,93           | -37,90 ± 17,82     | -33,41 ± 17,84   | 0,014          | 0,179          |
| HDL-C (%) | 3,68 ± 21,95             | 2,90 ± 21,11       | 5,25 ± 23,55     | 0,291          | 0,713          |
| TG (%)    | -11,95 ± 32,14           | -12,56 ± 31,56     | -10,72 ± 33,36   | 0,572          | 0,328          |

Os valores representam média ± desvio padrão; CT: colesterol total; LDL-C: lipoproteína de baixa densidade; HDL-C: lipoproteína de alta densidade; TG: triglicérides;  
<sup>a</sup> Comparações entre homens e mulheres usando o test t de Student; <sup>b</sup> covariáveis incluídas no modelo: idade, tabagismo, níveis lipídicos basais, DCV anterior, hipotireoidismo controlado e uso de antitrombóticos.

Table 4 – Análise de regressão linear: fatores associados a alterações na porcentagem dos níveis de CT e LDL-C

| Covariáveis                | Coefficiente de regressão ± erro padrão | R <sup>2</sup> parcial x 100 | p       |
|----------------------------|-----------------------------------------|------------------------------|---------|
| CT                         |                                         |                              |         |
| Constante                  | 1,742 ± 5,594                           |                              | 0,756   |
| Idade                      | 0,009 ± 0,057                           | 0,8                          | 0,868   |
| Sexo                       | 1,073 ± 1,290                           | 3,8                          | 0,406   |
| Tabagismo                  | 0,697 ± 0,817                           | 3,9                          | 0,394   |
| DCV anterior               | -0,276 ± 1,318                          | -0,9                         | 0,834   |
| CT basal                   | -0,117 ± 0,015                          | -35,8                        | < 0,001 |
| Hipotireoidismo controlado | 1,324 ± 1,648                           | 3,6                          | 0,422   |
| Uso de antitrombóticos     | -1,305 ± 1,393                          | -4,2                         | 0,350   |
| LDL-C                      |                                         |                              |         |
| Constante                  | 0,988 ± 7,164                           |                              | 0,890   |
| Idade                      | -0,100 ± 0,083                          | -5,5                         | 0,228   |
| Sexo                       | 2,521 ± 1,872                           | 6,2                          | 0,179   |
| Tabagismo                  | 0,833 ± 1,209                           | 3,2                          | 0,491   |
| DCV anterior               | -1,729 ± 1,930                          | -4,1                         | 0,371   |
| LDL-C basal                | -0,192 ± 0,024                          | -36,3                        | < 0,001 |
| Hipotireoidismo controlado | 1,380 ± 2,411                           | 2,6                          | 0,567   |
| Uso de antitrombóticos     | -1,433 ± 2,029                          | -3,2                         | 0,481   |

CT: colesterol total; LDL-C: lipoproteína de baixa densidade; DCV: doenças cardiovasculares.

Tabela 5 – Reações adversas a medicamentos (RAM) de acordo com o sexo

|                                                                 | Ambos os sexos (n = 236) | Mulheres (n = 158) | Homens (n = 78)         | p     |
|-----------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------|-------------------------|-------|
| Controle                                                        | 162 (68,6%)              | 105 (66,5%)        | 57 <sup>a</sup> (73,1%) |       |
| Mialgia (independente de alterações na CPK)                     | 48 (20,3%)               | 41 (25,9%)         | 7 <sup>b</sup> (9,0%)   | 0,002 |
| Aumento nos níveis de CPK e/ou alterações nas funções hepáticas | 26 (11,1%)               | 12 (7,6%)          | 14 <sup>c</sup> (17,9%) |       |

<sup>a</sup>Residual ajustado = 1,03, p = 0,302; <sup>b</sup>Residual ajustado = -3,05, p = 0,002; <sup>c</sup>Residual ajustado = 2,39, p = 0,017; CPK: Creatina fosfoquinase.

## Artigo Original

O uso concomitante de fármacos que afetam as vias metabólicas associadas ao efeito hipolipemiante, tais como indutores, substratos e inibidores do CYP3A4, foi avaliado, e não mostrou nenhuma influência sobre a segurança e eficácia do tratamento com sinvastatina ou atorvastatina. Da mesma forma, a análise de outras interações medicamentosas não indicou qualquer influência sobre o efeito deste tratamento nesta coorte.

## Discussão

O objetivo deste estudo foi determinar o papel do dimorfismo sexual e o envolvimento de interações medicamentosas na eficácia e segurança do tratamento com sinvastatina e atorvastatina. Altos níveis de CT, LDL-C e TG e baixos níveis de HDL-C são preditores significativos de aterosclerose e DCV em todos os grupos populacionais previamente investigados<sup>22</sup>.

A análise do perfil lipídico basal revelou que as mulheres apresentam níveis médios mais elevados de CT e LDL-C do que os homens. Além disso, as mulheres foram, em média, mais velhas do que os indivíduos do sexo masculino. A maioria das mulheres estudadas encontrava-se no período de pós-menopausa e apresentaram deficiência hormonal. Esta condição pode levar ao agravamento do perfil lipídico, devido à diminuição da produção de estrógeno, o que resulta em uma diminuição nos níveis de expressão dos receptores de LDL no fígado e, subsequentemente, uma diminuição da depuração de LDL-C sérico<sup>23</sup>.

Durante o tratamento com estatinas, há uma redução do LDL-C devido à inibição da síntese hepática de colesterol, o que leva ao aumento nos níveis de expressão de receptores de LDL e uma depuração do colesterol circulante<sup>2</sup>. Estudos anteriores demonstraram que a porcentagem de homens que atingiu níveis normais de CT e LDL-C após o tratamento com estatinas é significativamente maior em comparação com as mulheres<sup>24,25</sup>. No entanto, observou-se que a porcentagem de homens e mulheres que exibiu níveis normais de CT e LDL-C foi muito semelhante.

HMG-CoA redutase é expressa principalmente nos hepatócitos e a eficácia das estatinas é dependente da concentração local desta enzima no fígado. Além disso, as diferenças individuais na farmacocinética e farmacodinâmica contribuem para variações interindividuais na resposta aos fármacos<sup>7</sup>. A análise da eficácia do tratamento com estatinas revelou uma maior redução dos níveis plasmáticos de CT e LDL-C em mulheres do que em homens. Após o ajuste para as covariáveis, observou-se que o nível basal de CT e LDL-C constituiu uma covariável estatisticamente significativa. Apesar de outros estudos na literatura mostrarem a existência de diferenças entre homens e mulheres em resposta aos fármacos, nesta coorte, cerca de 35-40% da eficácia do tratamento com sinvastatina e atorvastatina está relacionada aos níveis individuais basais de lipídios, independentemente do sexo. Indivíduos que apresentam níveis mais altos de CT e LDL-C exibem uma maior eficácia terapêutica com estatinas. As diferentes características observadas entre homens e mulheres podem ser definidas com base no dimorfismo sexual. Em humanos, o dimorfismo sexual também está associado à prevalência, gravidade e desenvolvimento de muitas doenças

comuns, tais como doenças auto-imunes<sup>26</sup>, asma<sup>27</sup>, e doenças cardiovasculares<sup>28</sup>, talvez devido à diferenças na regulação gênica entre homens e mulheres. Estudos anteriores demonstraram que o dimorfismo sexual influencia na expressão de mRNA<sup>29,30</sup>. Pilote e cols.<sup>22</sup> indicaram a possibilidade de que a evolução das diferenças sexuais considerando diferentes perfis de risco é parcialmente atribuída aos hormônios sexuais ou seus receptores. Estudos anteriores indicaram controvérsias nos dados a respeito da resposta à estatinas entre homens e mulheres<sup>6,11,12,31,32</sup>. Kostis e cols.<sup>11</sup> realizaram uma meta-análise para avaliar o efeito das estatinas na redução de eventos cardiovasculares em homens e mulheres. Este estudo avaliou 18 ensaios clínicos randomizados com estatinas, envolvendo 141.235 participantes, para analisar as diferenças específicas de cada sexo. Os autores observaram que os benefícios das estatinas foram semelhantes entre os sexos, independentemente do tipo de controle, risco basal ou resultados da prevenção primária e secundária. Mosca<sup>12</sup> avaliou este estudo e afirmou que Kostis e cols.<sup>11</sup> não forneceram resultados de eficácia do uso de estatinas em relação ao dimorfismo sexual e à segurança. Além disso, dos 18 estudos avaliados por Kostis e cols.<sup>11</sup>, apenas 7 estavam relacionados com o uso de sinvastatina ou atorvastatina. Por isso, enfatizamos a importância da realização de estudos de coorte com acompanhamento dos casos para avaliar a eficácia de tratamentos com estas estatinas.

O uso de estatinas pode estar associado à RAM. No presente estudo, observou-se que mialgia (com ou sem alterações na CPK) ocorreu mais frequentemente em mulheres (25,9%) ( $p = 0,002$ ), enquanto que o aumento da CPK e/ou alterações nas funções hepáticas foram mais comumente observadas em homens (17,9%) ( $p = 0,017$ ). Estudos anteriores indicaram uma diferença de até 40% na farmacocinética entre homens e mulheres, com respeito à resposta farmacológica, e que o sexo feminino constitui um fator de risco para reações adversas clinicamente relevantes<sup>33</sup>. Mulheres têm uma porcentagem maior de gordura no corpo em relação aos homens, o que pode afetar o volume de distribuição de drogas. Um maior volume de distribuição de fármacos irá diminuir a concentração máxima, aumentar a meia-vida e aumentar o tempo do efeito do fármaco<sup>33</sup>. Além disso, fatores genéticos, fisiológicos e ambientais podem afetar as atividades enzimáticas. Estudos anteriores demonstraram que polimorfismos genéticos são capazes de promover variações na expressão de genes que codificam enzimas metabolizadoras, tais como os genes da família CYP450, e estão relacionados com a eficácia e toxicidade do tratamento com estatinas<sup>34</sup>.

Também foi observado que as mulheres que receberam co-medicações com bloqueadores de canais de cálcio, diuréticos e antitrombóticos apresentaram maior prevalência de RAM do que os homens. Embora a patogênese da toxicidade de estatinas tenha sido explicada por várias hipóteses, não há consenso e teorias claras que possam explicar esses efeitos<sup>35</sup>.

Sinvastatina e atorvastatina são metabolizadas pelo citocromo P450 (CYP) 3A4 (o ácido de sinvastatina é também metabolizado pela CYP2C8). A exposição à drogas inibidoras de CYP3A4 concomitantemente com estatinas pode levar ao desenvolvimento de RAM. Bloqueadores dos canais de cálcio são inibidores potentes do CYP3A4 em doses clinicamente relevantes<sup>36</sup>. Além disso, Kornstein e cols.<sup>37</sup> observaram

## Artigo Original

que a tolerabilidade do tratamento com antidepressivos é dependente do sexo. Outras co-medicações analisadas mostraram que não houve nenhuma influência sobre os resultados do tratamento com sinvastatina e atorvastatina nesta coorte. No entanto, a interação entre a idade e o sexo também foi demonstrada para uma variedade de substratos do CYP3A4<sup>33</sup>. Mulheres têm um risco 1,5 a 1,7 vezes maior de desenvolver RAM do que indivíduos do sexo masculino<sup>38</sup>. Sexo feminino, idade avançada, existência de outras doenças, e co-medicações foram descritos como fatores de risco para reações adversas às estatinas<sup>39</sup>. Os colaboradores do *Cholesterol Treatment Trialists* (CTT)<sup>40</sup> publicaram uma revisão sistemática de ensaios com estatinas, e indicaram uma forte evidência de que os benefícios de estatinas superam eventuais reações adversas graves. No entanto, observou-se que RAM ocorreu em 14,9% da amostra. Sendo assim, a determinação das causas de RAM é importante para otimizar o tratamento hipolipemiante e o acompanhamento destes indivíduos.

O principal ponto positivo do presente estudo é que ele focou nas características da coorte submetida ao tratamento com sinvastatina ou atorvastatina, bem como no perfil de eficácia e segurança destas estatinas.

Como uma das limitações do presente estudo, indicamos que foi realizado um estudo observacional, não randomizado e não controlado com placebo. A amostra diferiu em parte no que diz respeito ao perfil lipídico basal, porcentagem e idade entre homens e mulheres, e os grupos não foram pareados por idade e sexo. Alguns indivíduos apresentaram dados incompletos, tais como o status hormonal (nas mulheres), o uso

de terapia hormonal e dislipidemia genética. Além disso, os dados sobre estilo de vida (dieta e exercício físico) não foram considerados. Todos os indivíduos receberam orientação médica para iniciar atividades físicas e controle da dieta, mas tais atividades não foram monitoradas. RAM a sinvastatina e atorvastatina foi determinada de acordo com critérios médicos e não representou a incidência de RAM nesta população. A fim de aumentar o poder da análise, em um momento do estudo, apenas indivíduos que apresentaram RAM foram convidados a participar do estudo. Embora a amostra final tenha um tamanho diferente da amostra inicialmente calculada, nossa investigação apresentou um poder de 82% para detectar diferenças de cinco pontos percentuais nos níveis de LDL-C entre homens e mulheres. Nós minimizamos a possibilidade de erros do tipo II, que poderiam influenciar a resposta final, utilizando ajuste com covariáveis.

## Conclusões

Observamos que o tratamento com sinvastatina e atorvastatina foi mais eficaz em indivíduos que apresentam níveis mais altos de CT e LDL-C, independentemente do sexo, conforme previamente descrito, e RAM é mais frequente nas mulheres. Na literatura, encontramos uma grande variedade de estudos de farmacogenética, farmacocinética e farmacodinâmica relacionados às estatinas, no entanto, o papel do dimorfismo sexual nos receptores, proteínas transportadoras, e vias de expressão gênica precisa ser melhor explorado.

## FALTAM AS DECLARAÇÕES DE CONFLITO DE INTERESSES E DIREITOS AUTORAIS.

## Referências

- Redberg RF, Benjamin EJ, Bittner V, Braun LT, Goff DC Jr, Havas S, et al. ACCF/AHA 2009 performance measures for primary prevention of cardiovascular disease in adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Performance Measures (Writing Committee to Develop Performance Measures for Primary Prevention of Cardiovascular Disease) developed in collaboration with the American Academy of Family Physicians; American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; and Preventive Cardiovascular Nurses Association: endorsed by the American College of Preventive Medicine, American College of Sports Medicine, and Society for Women's Health Research. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(14):1364-405.
- Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990;343(6257):425-30.
- Ray KK, Cannon CP, Ganz P. Beyond lipid lowering: what have we learned about the benefits of statins from the acute coronary syndromes trials? *Am J Cardiol*. 2006;98(11A):18P-25P.
- Elis A, Lishner M. Non-every day statin administration -- a literature review. *Eur J Intern Med*. 2012;23(5):474-8.
- Staffa JA, Chang J, Green L. Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis. *N Engl J Med*. 2002;346(7):539-40.
- Cotreau MM, von Moltke LL, Greenblatt DJ. The influence of age and sex on the clearance of cytochrome P450 3A substrates. *Clin Pharmacokinet*. 2005;44(1):33-60.
- Waxman DJ, Holloway MG. Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Mol Pharmacol*. 2009;76(2):215-28.
- Scarabin-Carre V, Canonico M, Brailly-Tabard S, Trabado S, Ducimetiere P, Giroud M, et al. High level of plasma estradiol as a new predictor of ischemic arterial disease in older postmenopausal women: the three-city cohort study. *J Am Heart Assoc*. 2012;1(3):e001388.
- Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, Tolonen H, Ruokoski E, Amouyel P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations: monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet*. 1999;353(9164):1547-57.
- Mahmoodzadeh S, Pham TH, Kuehne A, Fielitz B, Dworatzek E, Kararigas G, et al. 17beta-Estradiol-induced interaction of ERalpha with NPPA regulates gene expression in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2012;96(3):411-21.
- Kostis WJ, Cheng JQ, Dobrzynski JM, Cabrera J, Kostis JB. Meta-analysis of statin effects in women versus men. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(6):572-82.

12. Mosca L. Controversy and consensus about statin use: it is not about the sex. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(6):583-4.
13. Fiegenbaum M, Silveira FR, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira ME, Pires RC, et al. Determinants of variable response to simvastatin treatment: the role of common variants of SCAP, SREBF-1a and SREBF-2 genes. *Pharmacogenomics J*. 2005;5(6):359-64.
14. Fiegenbaum M, da Silveira FR, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira ME, Pires RC, et al. Pharmacogenetic study of apolipoprotein E, cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase genes and simvastatin therapy in Brazilian subjects. *Clin Chim Acta*. 2005;362(1-2):182-8.
15. Fiegenbaum M, da Silveira FR, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira ME, Pires RC, et al. The role of common variants of ABCB1, CYP3A4, and CYP3A5 genes in lipid-lowering efficacy and safety of simvastatin treatment. *Clin Pharmacol Ther*. 2005;78(5):551-8.
16. Sortica VA, Fiegenbaum M, Lima LO, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira ME, et al. SLCO1B1 gene variability influences lipid-lowering efficacy on simvastatin therapy in Southern Brazilians. *Clin Chem Lab Med*. 2012;50(3):441-8.
17. Lima LO, Almeida S, Hutz MH, Fiegenbaum M, PPARA, RXRA, NR112 and NR113 gene polymorphisms and lipid and lipoprotein levels in a Southern Brazilian population. *Mol Biol Rep*. 2013;40(2):1241-7.
18. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18(6):499-502.
19. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002;106(25):3143-421.
20. Kivisto KT, Niemi M, Schaeffeler E, Pitkala K, Tilvis R, Fromm MF, et al. Lipid-lowering response to statins is affected by CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics*. 2004;14(8):523-5.
21. Abramson JH. WINPEPI updated: computer programs for epidemiologists, and their teaching potential. *Epidemiol Perspect Innov*. 2011;8(1):1.
22. Pilote L, Dasgupta K, Guru V, Humphries KH, McGrath J, Norris C, et al. A comprehensive view of sex-specific issues related to cardiovascular disease. *CMAJ*. 2007;176(6):S1-44.
23. Mendelsohn ME, Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science*. 2005;308(5728):1583-7.
24. Mosca L, Merz NB, Blumenthal RS, Cziraky MJ, Fabunmi RP, Sarawate C, et al. Opportunity for intervention to achieve American Heart Association guidelines for optimal lipid levels in high-risk women in a managed care setting. *Circulation*. 2005;111(4):488-93.
25. Spinarova L, Spinar J, Vitovec J, Linhart A, Widimsky P, Fedorco M, et al. Gender differences in total cholesterol levels in patients with acute heart failure and its importance for short and long time prognosis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2012;156(1):21-8.
26. Lockshin MD. Sex differences in autoimmune disease. *Lupus*. 2006;15(11):753-6.
27. Postma DS. Gender differences in asthma development and progression. *Genet Med*. 2007;4 Suppl B:S133-46.
28. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med*. 1999;340(23):1801-11.
29. Ellegren H, Parsch J. The evolution of sex-biased genes and sex-biased gene expression. *Nat Rev Genet*. 2007;8(9):689-98.
30. Ober C, Loisel DA, Gilad Y. Sex-specific genetic architecture of human disease. *Nat Rev Genet*. 2008;9(12):911-22.
31. Jochmann N, Stangl K, Garbe E, Baumann G, Stangl V. Female-specific aspects in the pharmacotherapy of chronic cardiovascular diseases. *Eur Heart J*. 2005;26(16):1585-95.
32. Xhyheri B, Bugiardi R. Diagnosis and treatment of heart disease: are women different from men? *Prog Cardiovasc Dis*. 2010;53(3):227-36.
33. Anderson GD. Sex and racial differences in pharmacological response: where is the evidence? *Pharmacogenetics, pharmacokinetics, and pharmacodynamics*. *J Womens Health (Larchmt)*. 2005;14(1):19-29.
34. Wolbold R, Klein K, Burk O, Nussler AK, Neuhaus P, Eichelbaum M, et al. Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology*. 2003;38(4):978-88.
35. Smogorzewski M. The myopathy of statins. *J Ren Nutr*. 2005;15(1):87-93.
36. Neuvonen PJ, Niemi M, Backman JT. Drug interactions with lipid-lowering drugs: mechanisms and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;80(6):565-81.
37. Kornstein SG, Schatzberg AF, Thase ME, Yonkers KA, McCullough JP, Keitner GI, et al. Gender differences in treatment response to sertraline versus imipramine in chronic depression. *Am J Psychiatry*. 2000;157(9):1445-52.
38. Kando JC, Yonkers KA, Cole JO. Gender as a risk factor for adverse events to medications. *Drugs*. 1995;50(1):1-6.
39. Sewright KA, Clarkson PM, Thompson PD. Statin myopathy: incidence, risk factors, and pathophysiology. *Curr Atheroscler Rep*. 2007;9(5):389-96.
40. Mihaylova B, Emberson J, Blackwell L, Keech A, Simes J, Barnes EH, et al. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *Lancet*. 2012;380(9841):581-90.



## ORIGINAL ARTICLE

# *ESR1* polymorphisms and statin therapy: a sex-specific approach

L Smiderle<sup>1</sup>, M Fiegenbaum<sup>1,2</sup>, MH Hutz<sup>3</sup>, CR Van Der Sand<sup>4</sup>, LC Van Der Sand<sup>4</sup>, MEW Ferreira<sup>4</sup>, RC Pires<sup>4</sup> and S Almeida<sup>1,2</sup>

Lipid-lowering therapy has shown a high degree of variability in clinical response and there is evidence that the variability in drug response between individuals is due to genetic factors. Thirteen single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the *ESR1* gene were evaluated with basal lipid and lipoprotein levels, as well as response to lipid-lowering therapy, in 495 hypercholesterolemic individuals of European descent receiving simvastatin or atorvastatin. Significant associations were detected between rs4870061 ( $P=0.040$ , corrected  $P$ -value ( $PC$ )=0.440), rs1801132 ( $P=0.002$ ,  $PC=0.022$ ) and the SNP rs3020314 ( $P=0.013$ ,  $PC=0.143$ ) with triglyceride (TG) baseline levels. The rs4870061 was also associated with high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) baseline levels ( $P=0.045$ ,  $PC=0.495$ ). Regarding statin efficacy, rs2234693 C/C was associated with greater HDL-C increase ( $P=0.037$ ;  $PC=0.407$ ) and rs3798577 T allele was associated with greater total cholesterol (TC) reduction ( $P=0.019$ ;  $PC=0.209$ ) and greater TG reduction ( $P=0.026$ ;  $PC=0.286$ ). These associations suggest that *ESR1* polymorphisms are in part responsible for the TC, HDL-C and TG variation levels and this effect may be sex-specific.

The Pharmacogenomics Journal advance online publication, 25 August 2015; doi:10.1038/tpj.2015.60

## INTRODUCTION

Statin therapy shows high efficacy in reducing total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and triglycerides (TG).<sup>1</sup> However, there is a high degree of variability in the clinical response to statins,<sup>2</sup> and many studies have indicated that this variability is due to genetic factors.<sup>2–4</sup> It is estimated that the variability in drug disposition and effect is 20–95% dependent on genetic background<sup>5</sup> and that a significant proportion of basal high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) variability is due to genetic factors.<sup>6</sup> Candidate genes that regulate the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins are promising targets. The pharmacokinetic and pharmacodynamic pathways that regulate statin have been extensively studied;<sup>3,7–16</sup> however, this only explains a small part of the observed variation in statin response.

Estrogens are important regulators of metabolic homeostasis and lipid metabolism that act through cognate nuclear hormone receptors. The estrogen receptors (ER $\alpha$  and  $\beta$ ) are ligand-activated transcription factors that regulate many genomic events.<sup>17</sup> When ER $\alpha$  is activated, transcription complexes are recruited to estrogen-responsive genes, where they act to initiate transcription or modify the local chromatin structure,<sup>18</sup> ultimately leading to activation of the estrogen response. ER $\alpha$  has been demonstrated to influence the expression of proteins involved in the regulation of plasma lipid metabolism such as apolipoprotein E<sup>19</sup> and LDL receptor.<sup>20</sup> ER $\alpha$  is encoded by *ESR1*,<sup>21</sup> and several single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been involved in mediating the effects of estrogen on LDL-C, HDL-C and TG metabolism.<sup>22–24</sup>

Men and women show significant differences with regard to the risk of cardiovascular disease (CVD) development,<sup>25</sup> which may be the result of sex-specific differences in gene regulatory

mechanisms, particularly those governed by the response to sex hormones.<sup>26,27</sup> A review from Yoon<sup>28</sup> suggests that sexual dimorphism and the ERs ( $\alpha$  and  $\beta$ ) are involved in the response to lipid-lowering therapy. To our knowledge, there is only one study in the literature evaluating *ESR1* polymorphisms and response to statin therapy. Kajinami *et al.*<sup>7</sup> tested two *ESR1* polymorphisms (rs2234693 and rs9340799) in the context of atorvastatin (10 mg) response in hypercholesterolemic patients and observed a sex-specific association with HDL-C levels. Thus, the study of polymorphisms in ER genes may help determine the role of genetic variability in the response to lipid-lowering therapy. Additionally, this approach might identify potential sex-specific characteristics involved in pharmacological efficacy.

The present work evaluates the association of *ESR1* polymorphisms with baseline lipid and lipoprotein levels and with the efficacy of atorvastatin/simvastatin lipid-lowering therapy in a patient cohort of European descent from Porto Alegre, the southernmost city of Brazil.

## METHODS

### Patients

This prospective cohort study was conducted with 495 hypercholesterolemic patients (331 women and 164 men) receiving simvastatin or atorvastatin. The inclusion criteria were the use of simvastatin or atorvastatin and European ascendancy (ascertained by skin color and morphological characteristics). The exclusion criteria were: age lower than 20 years, TG concentration of 4.52 mmol l<sup>-1</sup> or higher, altered thyroid-stimulating hormone levels, impaired hepatic or renal function, an unstable or uncontrolled clinically significant disease and had previously undergone therapy with other lipid-lowering drugs within less than 6 months. Physical examinations, clinical

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA, Porto Alegre, Brazil; <sup>2</sup>Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA, Porto Alegre, Brazil; <sup>3</sup>Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, Brazil and <sup>4</sup>Centro de Diagnóstico Cardiológico, Porto Alegre, Brazil. Correspondence: Professor S Almeida, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA, Rua: Sarmento Leite 245 – sala 309, Porto Alegre 90050-170, Brazil. E-mail: silvana.almeida@pq.cnpq.br

Received 23 April 2015; revised 28 June 2015; accepted 1 July 2015



2

**Table 1.** Characteristics of the sample

| Characteristics               | All         | Women       | Men         | P <sup>a</sup> |
|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
| Number                        | 495         | 331 (66.9%) | 164 (33.1%) |                |
| Age (years)                   | 61.5 ± 10.9 | 62.3 ± 10.7 | 59.9 ± 11.1 | 0.021          |
| Statin use (%)                |             |             |             | 0.229          |
| Simvastatin                   | 85.1        | 86.8        | 81.8        |                |
| Atorvastatin                  | 14.9        | 13.2        | 18.2        |                |
| Treatment time (months)       | 6.3 ± 3.2   | 6.4 ± 3.4   | 6.1 ± 2.9   | 0.357          |
| Standard dose (mg)            | 10.2 ± 4.6  | 10.3 ± 4.7  | 10. ± 4.3   | 0.840          |
| Post-menopausal (%)           |             | 76.0        |             |                |
| Hormone therapy use (%)       |             | 14.1        |             |                |
| Smoking (%)                   |             |             |             | 0.020          |
| Past                          | 12.1        | 8.9         | 18.2        |                |
| Current                       | 8.7         | 8.1         | 9.8         |                |
| Never                         | 78.5        | 82.8        | 71.2        |                |
| Prior CVD (%)                 | 32.5        | 28.8        | 40.0        | 0.014          |
| Hypertension (%)              | 71.7        | 71.2        | 73.1        | 0.649          |
| Controlled                    | 15.1        | 20.5        | 4.5         | < 0.001        |
| hypothyroidism (%)            |             |             |             |                |
| Concomitant therapies use (%) |             |             |             |                |
| Calcium channel blockers      | 17.9        | 16.3        | 21.3        | 0.16           |
| Diuretics                     | 39.5        | 42.0        | 34.7        | 0.126          |
| Antithrombotic                | 26.6        | 23.8        | 32.3        | 0.039          |
| CYP3A4 substrates             | 17.6        | 16.6        | 19.5        | 0.362          |
| CYP3A4 inducers               | 1.6         | 1.5         | 1.8         | 0.719          |
| CYP3A4 inhibitors             | 21.6        | 20.2        | 24.4        | 0.228          |

Abbreviation: CVD, cardiovascular disease. Values of age, treatment time and standard dose are expressed as mean ± standard deviation. <sup>a</sup>P-values are women × men comparisons.

data and clinical laboratory evaluations were obtained by the physician. Biochemical evaluation of therapeutic efficacy was performed before the initiation of statin therapy and after 6 months of treatment.

The statin therapy regimen and dose administered were determined by the physician according to the subjects' clinical characteristics. The subjects included in the study were taking other medications concomitantly with the statin use. The dose and use frequency of all drugs used by each subject were not changed because of its inclusion in the study. A standardized statin dosage variable was created to avoid bias in evaluating the efficacy of lipid-lowering therapy. The daily doses of simvastatin were converted to equivalent doses of atorvastatin at a ratio of 2:1.<sup>29</sup> The standardized mean dose of statins used for this cohort was 10.2 ± 4.6 mg. Subjects were maintained on other medication schemes throughout the study without change. The main characteristics of the sample are shown in the Table 1. Wide sample descriptions may be assessed in Smiderle et al., 2014.<sup>30</sup>

All subjects who agreed to participate in this study provided informed consent. This study was approved by the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre Ethics Committee. Parts of this sample have already been analyzed in previous studies.<sup>8–10,15,16</sup>

#### Biochemical analysis

Serum levels of TC, HDL-C and TGs were determined from peripheral blood obtained after 12 h of fasting by standard methods using commercial kits. The LDL-C levels were assessed as previously described by Friedewald.<sup>31</sup>

#### SNP selection and genotyping

Genotype information for *ESR1* was downloaded from the HapMap database in February 2011 (NCBI International HapMap Project). Haploview software was used to visualize the European ancestry population data and to select the tag-SNPs.<sup>32</sup> A set of 13 tag-SNPs with minor allele frequency > 0.15 were selected: rs2077647, rs2234693, rs9340799, rs1643821, rs9340835, rs4870061, rs1801132, rs3020314, rs3020396, rs3020432, rs2207396, rs3798577 and rs2813544. Certain SNPs were prioritized in the selection: (i) SNPs associated with human disorders in previous studies and (ii) SNPs identified with the tagger tool from the HapMap database. In addition to the HapMap SNPs, we genotyped the *ESR1* SNPs rs9340799 and rs2813544, which have been previously associated with lipid and lipoprotein levels.<sup>33,34</sup> Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using procedures described by Lahiri and Nurnberger,<sup>35</sup> or from buccal mucosa cells by in-house proteinase

K digestion. Genotyping of tag SNPs in *ESR1* was performed using validated TaqMan<sup>®</sup> genotyping assays (Applied Biosystems, CA, USA).

#### Statistical analysis

The analyses were conducted using SPSS software (version 18.0, Chicago, IL, USA). Owing to the skewed distribution of TG levels, these values were log-transformed before analysis. Allele frequencies, Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium (LD) were estimated using Haploview algorithm.<sup>32</sup> LD was considered to be strong when D' (the relative magnitude of D compared with its theoretical maximum calculated as D/Dmax) ≥ 0.9, and the haplotypes were built based on this parameter. Haplotype frequencies were estimated with the Multiple Locus Haplotype Analysis program (version 2.0).<sup>36</sup> The statistical analysis was performed separately from the group of women and men to access sex-specific traits. The mean percentage of change in plasma lipid levels was obtained from the difference in post and pre-treatment lipid levels, multiplied by 100 and divided by the pre-treatment level for each parameter. To determine genotype and haplotype associations with baseline lipid levels, we performed General Linear Model with type III sum of squares and Tukey post hoc tests when appropriate.

The baseline lipid levels were adjusted for age, smoking, prior CVD and hypertension. Models to access changes in the mean percentage of plasma lipid levels between *ESR1* genotypes and haplotypes were adjusted for age, smoking status, baseline lipid level, standard dose, treatment time, prior CVD, hypertension, controlled hypothyroidism and antithrombotic use because there were differences in gender frequency. A P-value < 0.05 was considered statistically significant. The false discovery rate procedure proposed by Benjamini and Hochberg<sup>37</sup> was performed for multiple testing corrections and corrected P-values (PC) are also shown.

## RESULTS

### Sample characteristics

This population-based study comprised 331 (66.9%) women and 164 (33.1%) men, and 85.1% of the participants used simvastatin and 14.9% used atorvastatin lipid-lowering therapy. The average treatment time did not differ between genders: treatment for women and men was approximately 6.4 ± 3.4 and 6.1 ± 2.9 months (P = 0.357), respectively. The standard dose of statins did not differ between women (10.3 ± 4.7 mg) and men (10.2 ± 4.3 mg) (P = 0.840). The mean age of women was higher than that of the men (P = 0.021) (Table 1).

### Allele, genotype and haplotype frequencies

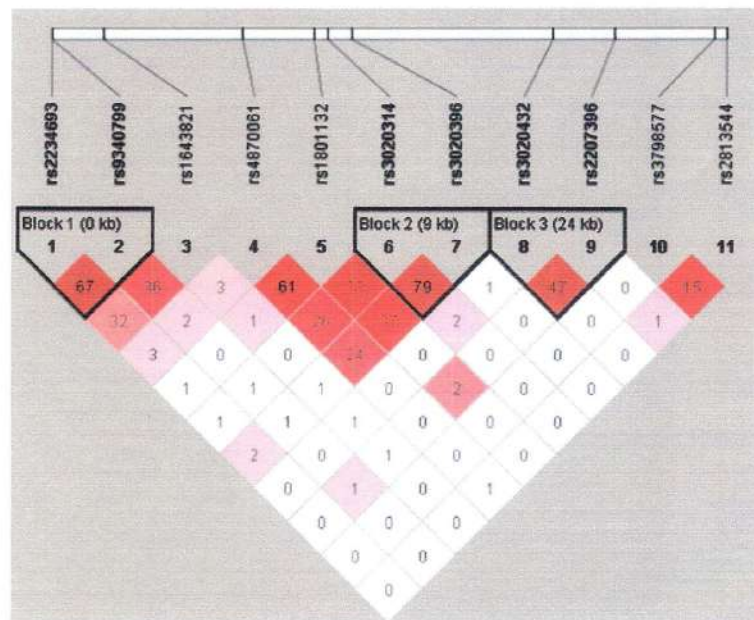
Allele frequencies for the SNP set and the SNPs tagged are shown in Table 2. The tag-SNP with the lowest minor allele frequency was rs2207396 (A = 0.20). The rs2077647 and rs9340835 SNPs genotype frequencies deviate from that expected under Hardy-Weinberg equilibrium and were excluded from analysis. The LD structure, correlation coefficient r<sup>2</sup> and haplotype blocks among the SNP set tested are shown in Figure 1. LD was detected between rs2234693-rs9340799 (D' = 0.97, 95% confidence interval = 0.94–1.0), rs3020314-rs3020396 (D' = 0.92, 95% confidence interval = 0.88–0.95) and rs3020432-rs2207396 (D' = 0.95, 95% confidence interval = 0.91–0.99), and the respective haplotypes were subsequently assessed. The most frequent haplotypes were C-A (57.1%), T-A (63.3%) and A-G (67.5%), respectively.

### *ESR1* and lipid and lipoprotein baseline levels

Statistically significant associations were detected between *ESR1* SNPs and HDL-C and TG baseline levels in women. The *ESR1* polymorphisms rs4870061, rs1801132 and rs3020314 were associated with HDL-C and TG baseline levels, as shown in Table 3. The rs4870061 T/T carriers showed lower TG levels (1.19 ± 0.20 mmol l<sup>-1</sup>) than other genotypes (C/C = 1.75 ± 0.80 mmol l<sup>-1</sup>; C/T = 1.73 ± 0.71 mmol l<sup>-1</sup>) (P = 0.040; PC = 0.440; post hoc test: C/C × C/T P > 0.05, C/C × T/T P < 0.05, C/T × T/T P < 0.05). The rs1801132 G/G carriers showed lower TG (1.12 ± 0.21 mmol l<sup>-1</sup>) than other

**Table 2.** ESR1 SNP set genotyped in the total sample and the tagged SNPs

| Polymorphism | Chromosome position | ESR1 location | Base changed | Minor allele frequency <sup>a</sup> | Tagged SNP |
|--------------|---------------------|---------------|--------------|-------------------------------------|------------|
| rs2077647    | 152129077           | exon 1        | G → A        | 0.44 (G)                            | rs827423   |
| rs2234693    | 152163335           | intron 1      | C → T        | 0.43 (C)                            | rs6902771  |
|              |                     |               |              |                                     | rs9479130  |
|              |                     |               |              |                                     | rs3853252  |
| rs9340799    | 152163381           | intron 1      | A → G        | 0.34 (G)                            | rs1709182  |
| rs1643821    | 152183551           | intron 2      | T → C        | 0.41 (T)                            | rs827419   |
|              |                     |               |              |                                     | rs712221   |
|              |                     |               |              |                                     | rs1514348  |
| rs9340835    | 152199931           | intron 2      | A → G        | 0.34 (A)                            | rs11155819 |
| rs4870061    | 152237468           | intron 3      | C → T        | 0.21 (T)                            | rs6557170  |
|              |                     |               |              |                                     | rs4458702  |
| rs1801132    | 152265522           | exon 4        | C → G        | 0.22 (G)                            | rs2347868  |
|              |                     |               |              |                                     | rs6912184  |
| rs3020314    | 152270672           | intron 4      | C → T        | 0.33 (C)                            | rs3020394  |
| rs3020396    | 152279878           | intron 4      | G → A        | 0.32 (G)                            | rs3020401  |
|              |                     |               |              |                                     | rs1884051  |
| rs3020432    | 152357927           | intron 5      | G → A        | 0.32 (G)                            | rs3020411  |
|              |                     |               |              |                                     | rs3020422  |
|              |                     |               |              |                                     | rs3020433  |
|              |                     |               |              |                                     | rs3020364  |
|              |                     |               |              |                                     | rs3020375  |
|              |                     |               |              |                                     | rs750686   |
|              |                     |               |              |                                     | rs2474148  |
| rs2207396    | 152382382           | intron 6      | G → A        | 0.20 (A)                            |            |
| rs3798577    | 152421130           | 3'UTR         | T → C        | 0.45 (C)                            |            |
| rs2813544    | 152425582           | 3'UTR         | A → G        | 0.23 (G)                            |            |

Abbreviations: SNP, single nucleotide polymorphism; UTR, untranslated region. <sup>a</sup>Allele frequencies observed in our study.**Figure 1.** Linkage disequilibrium (LD) structure and correlation of 11 SNPs in *ESR1*. The plot was built using Haploview with  $D'$  Color Scheme ( $D'=0$  white,  $D' < 1$  shades of pink and  $D'=1$  red). The value within each diamond represents the pairwise  $r^2$  (correlation) between the two SNPs. The blocks 1, 2 and 3 represent SNPs that were in LD and were used in the haplotype analysis. LD was considered when  $D' \geq 0.90$ .

**Table 4.** Lipid and lipoprotein levels before and after simvastatin/atorvastatin therapy in women according to *ESR1* rs2234693 and rs3798577

|                                             | rs2234693               |                          |                         | P                  | PC    | rs3798577                 |                             |                           | P                  | PC    |
|---------------------------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------|-------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------|-------|
|                                             | C/C                     | C/T                      | T/T                     |                    |       | T/T                       | T/C                         | C/C                       |                    |       |
| No. of subjects                             | 65                      | 146                      | 107                     |                    |       | 93                        | 162                         | 64                        |                    |       |
| <b>Baseline (mmol l<sup>-1</sup>)</b>       |                         |                          |                         |                    |       |                           |                             |                           |                    |       |
| TC                                          | 6.52 ± 1.03             | 6.53 ± 1.01              | 6.61 ± 0.99             | 0.640 <sup>a</sup> |       | 6.57 ± 1.01               | 6.57 ± 1.02                 | 6.49 ± 0.96               | 0.799 <sup>a</sup> |       |
| LDL-C                                       | 4.26 ± 0.85             | 4.36 ± 0.88              | 4.41 ± 0.86             | 0.614 <sup>a</sup> |       | 4.31 ± 0.88               | 4.39 ± 0.88                 | 4.35 ± 0.92               | 0.854 <sup>a</sup> |       |
| HDL-C                                       | 1.42 ± 0.37             | 1.41 ± 0.30              | 1.35 ± 0.34             | 0.279 <sup>a</sup> |       | 1.44 ± 0.35               | 1.39 ± 0.31                 | 1.34 ± 0.34               | 0.298 <sup>a</sup> |       |
| TG                                          | 1.74 ± 0.85             | 1.62 ± 0.69              | 1.84 ± 0.79             | 0.069 <sup>a</sup> |       | 1.75 ± 0.71               | 1.72 ± 0.81                 | 1.66 ± 0.70               | 0.604 <sup>a</sup> |       |
| <b>Post-treatment (mmol l<sup>-1</sup>)</b> |                         |                          |                         |                    |       |                           |                             |                           |                    |       |
| TC                                          | 4.64 ± 0.70             | 4.70 ± 0.84              | 4.72 ± 0.81             | 0.736 <sup>b</sup> |       | 4.62 ± 0.85               | 4.64 ± 0.71                 | 4.91 ± 0.85               | 0.011 <sup>b</sup> | 0.121 |
| LDL-C                                       | 2.46 ± 0.62             | 2.69 ± 0.75              | 2.68 ± 0.68             | 0.121 <sup>b</sup> |       | 2.55 ± 0.78               | 2.63 ± 0.63                 | 2.78 ± 0.71               | 0.086 <sup>b</sup> |       |
| HDL-C                                       | 1.51 ± 0.51             | 1.41 ± 0.30              | 1.34 ± 0.33             | 0.045 <sup>b</sup> | 0.495 | 1.45 ± 0.44               | 1.39 ± 0.30                 | 1.38 ± 0.39               | 0.788 <sup>b</sup> |       |
| TG                                          | 1.40 ± 0.67             | 1.30 ± 0.55              | 1.47 ± 0.65             | 0.659 <sup>b</sup> |       | 1.34 ± 0.63               | 1.33 ± 0.56                 | 1.55 ± 0.65               | 0.031 <sup>b</sup> | 0.341 |
| <b>Mean change (%)</b>                      |                         |                          |                         |                    |       |                           |                             |                           |                    |       |
| TC                                          | -27.9 ± 10.9            | -26.8 ± 13.5             | -27.7 ± 12.0            | 0.868 <sup>c</sup> |       | -29.4 ± 12.1 <sup>d</sup> | -27.9 ± 12.8 <sup>d,e</sup> | -23.2 ± 10.8 <sup>e</sup> | 0.019 <sup>c</sup> | 0.209 |
| LDL-C                                       | -40.9 ± 15.5            | -36.7 ± 19.2             | -38.1 ± 17.1            | 0.233 <sup>c</sup> |       | -41.1 ± 18.9              | -38.0 ± 17.6                | -34.3 ± 15.5              | 0.080 <sup>c</sup> |       |
| HDL-C                                       | 7.7 ± 27.5 <sup>f</sup> | 0.12 ± 16.7 <sup>g</sup> | 2.8 ± 21.2 <sup>g</sup> | 0.037 <sup>c</sup> | 0.407 | 2.5 ± 27.5                | 2.4 ± 19.2                  | 3.4 ± 13.0                | 0.872 <sup>c</sup> |       |
| TG                                          | -9.8 ± 32.6             | -12.9 ± 29.4             | -15.2 ± 27.6            | 0.741 <sup>c</sup> |       | -18.2 ± 27.0 <sup>h</sup> | -14.1 ± 27.9 <sup>h</sup>   | -3.27 ± 34.8 <sup>i</sup> | 0.026 <sup>c</sup> | 0.286 |

Abbreviations: HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; TC, total cholesterol; TG, triglycerides. All data are presented as mean ± standard deviation. <sup>a</sup>P-values after adjustment for age, smoking status, prior CVD and hypertension. <sup>b</sup>P-values after adjustment for age, smoking status, prior CVD, hypertension, baseline lipid level, standard dose and treatment time. <sup>c</sup>P-values after adjustment for age, smoking, baseline lipid level, standard dose, treatment time, prior CVD, hypertension, controlled hypothyroidism and antithrombotic use. <sup>d,e</sup>T/T × T/C P > 0.05, T/T × C/C P < 0.05, T/C × C/C P > 0.05; PC, corrected P-value by Benjamini and Hochberg correction procedure. <sup>f,g</sup>C/C × C/T P < 0.05, C/C × T/T P < 0.05, C/T × T/T P > 0.05. <sup>h,i</sup>T/T × T/C P > 0.05, T/T × C/C P < 0.001, T/C × C/C P < 0.05.

generalizations based on results that have not been previously described.

Presence of the rs1801132 G/G genotype leads to lower TG levels, suggesting a protector profile. This observation is consistent with a previously published study by Fox *et al.*,<sup>39</sup> which showed an association between the G allele and lower body mass index in men in a cohort from the Framingham Heart Study, suggesting sexual dimorphism. According to HapMap data, rs1801132 tags other two SNPs (rs2347868 and rs6912184), which have not been previously reported on the literature.

The rs3020314 C/T genotype shows higher TG baseline levels than other genotypes. This SNP is in LD with the rs3020396, and the haplotype analyses show TG means very similar to rs3020314 individually, suggesting that the effect on TG basal levels is due to rs3020314 alone. Lipphardt *et al.*<sup>40</sup> have also reported an association between this genotype and the risk of breast cancer development in the Central European Caucasian populations. Mavaddat *et al.*<sup>41</sup> showed that the *ESR1* rs3020314 C/T genotype has an overall effect on breast cancer, which is potentially explained by induced alterations in alternatively spliced mRNA variants.<sup>42</sup>

Considering the efficacy of simvastatin/atorvastatin therapy, the rs2234693 C-allele was associated with a higher increase in HDL-C levels in women. However, we must be cautious in interpreting this finding, because this result lost significance after we performed Benjamini's false discovery rate correction. To the best of our knowledge, only one previous study has explored the *ESR1* gene and sexual dimorphism in statin response.<sup>7</sup> Kajinami *et al.*<sup>7</sup> observed a greater HDL-C response in women with the rs2234693 C-rs9340799 G haplotype when 338 atorvastatin users (10 mg per day) were analyzed. Reviewing the literature, we found contradictory data regarding the rs2234693 C allele. Herrington *et al.*<sup>43</sup> showed that postmenopausal hormone therapy recipients who carried the C/C genotype had twofold higher HDL-C levels. Other studies have found that C allele is related to CVD severity,<sup>44,45</sup> atherosclerosis severity<sup>46</sup> and higher TC levels in women of European descent.<sup>23</sup> The tagSNP

rs2234693 is located in intron 1 and predicts three other SNPs (rs6902771, rs9479130 and rs3853252). We advise against making generalizations based on this variant, at least until a sufficient number of additional studies have been performed.

In the present study, we observed that women carrying the rs3798577 T allele have greater TC and TG reduction than C/C carriers, suggesting that the T allele functions as a protector. The rs3798577 C allele was previously associated with cancer risk,<sup>47</sup> lower circulating estradiol concentrations in African American women<sup>48</sup> and lower bone mineral density in Japanese women.<sup>49</sup> Sowers *et al.*<sup>50</sup> reported that Japanese women carrying the rs3798577 C/T allele displayed lower apoA-I and HDL-C levels. A potential role for rs3798577 polymorphism in *ESR1* expression might be inferred from its location in the 3'-untranslated region of *ESR1*.<sup>38</sup> Alterations in the 3'-untranslated region noncoding region can influence mRNA production or alter the binding ability of miRNAs, which, can modify the efficacy of clinical drugs.<sup>51</sup>

In addition to the efficacy of simvastatin/atorvastatin lipid-lowering therapy demonstrated in this cohort, it is particularly interesting to note that most observations involved HDL-C and TG levels. It was well known that the statins act mainly on LDL-C reduction, although, in this cohort, the LDL-C reduction seems not to be *ESR1* variation-related. The association with HDL-C and TG has clinical relevance because HDL-C plasma levels are inversely related to the CVD risk and low serum levels are an independent CVD risk factor. Literature data show that HDL-C plasma levels have genetic heritability estimated at 40–60%,<sup>6</sup> and plasma HDL levels are inversely associated with the risk of coronary artery disease.<sup>52</sup> Thus, genetic association studies become of great importance in the attempt to explain the large genetic variability. Additionally, all associations were detected in women and not in men, suggesting a strong role for sexual dimorphism in determining both these parameters. Gender differences may lead to differences in gene regulation and in mRNA expression.<sup>26,27</sup> Additionally, Pilote *et al.*<sup>53</sup> have suggested that the evolution of gender differences in risk



**Table 3.** Baseline lipid and lipoprotein levels according to *ESR1* polymorphisms in women

| SNP                   | No. of subjects | TC (mmol l <sup>-1</sup> ) | LDL-C (mmol l <sup>-1</sup> ) | HDL-C (mmol l <sup>-1</sup> ) | TG (mmol l <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------|-----------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| <i>rs4870061</i>      |                 |                            |                               |                               |                            |
| C/C                   | 198             | 6.55 ± 0.96                | 4.35 ± 0.82                   | 1.38 ± 0.34 <sup>a</sup>      | 1.75 ± 0.80 <sup>c</sup>   |
| C/T                   | 106             | 6.58 ± 1.12                | 4.39 ± 1.01                   | 1.38 ± 0.30 <sup>a</sup>      | 1.73 ± 0.71 <sup>c</sup>   |
| T/T                   | 13              | 6.38 ± 0.74                | 4.20 ± 0.77                   | 1.63 ± 0.30 <sup>b</sup>      | 1.19 ± 0.20 <sup>d</sup>   |
| <i>P</i> <sup>e</sup> |                 | 0.911                      | 0.938                         | 0.045                         | 0.040                      |
| PC                    |                 | 1.000                      | 1.000                         | 0.495                         | 0.440                      |
| <i>rs1801132</i>      |                 |                            |                               |                               |                            |
| C/C                   | 187             | 6.55 ± 0.96                | 4.36 ± 0.86                   | 1.39 ± 0.34                   | 1.72 ± 0.78 <sup>f</sup>   |
| C/G                   | 113             | 6.60 ± 1.11                | 4.38 ± 0.96                   | 1.38 ± 0.31                   | 1.80 ± 0.75 <sup>f</sup>   |
| G/G                   | 14              | 6.39 ± 0.75                | 4.21 ± 0.75                   | 1.55 ± 0.32                   | 1.12 ± 0.21 <sup>g</sup>   |
| <i>P</i> <sup>e</sup> |                 | 0.609                      | 0.886                         | 0.263                         | 0.002                      |
| PC                    |                 | 1.000                      | 1.000                         | 1.000                         | 0.022                      |
| <i>rs3020314</i>      |                 |                            |                               |                               |                            |
| C/C                   | 38              | 6.35 ± 0.88                | 4.28 ± 0.80                   | 1.40 ± 0.32                   | 1.45 ± 0.57 <sup>h</sup>   |
| C/T                   | 146             | 6.68 ± 1.06                | 4.44 ± 0.91                   | 1.38 ± 0.32                   | 1.82 ± 0.79 <sup>i</sup>   |
| T/T                   | 134             | 6.48 ± 0.97                | 4.29 ± 0.88                   | 1.40 ± 0.35                   | 1.68 ± 0.76 <sup>h,j</sup> |
| <i>P</i> <sup>e</sup> |                 | 0.104                      | 0.333                         | 0.976                         | 0.013                      |
| PC                    |                 | 1.000                      | 1.000                         | 1.000                         | 0.143                      |

Abbreviations: HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; SNP, single nucleotide polymorphism; TC, total cholesterol; TG, triglyceride. All data are presented as mean ± standard deviation; TG was *ln*-transformed to remove skewness. <sup>a,b</sup>C/C × C/T *P* > 0.05, C/C × T/T *P* < 0.05, C/T × T/T *P* < 0.05. <sup>c,d</sup>C/C × C/T *P* > 0.05, C/C × T/T *P* < 0.05, C/T × T/T *P* < 0.05. <sup>e</sup>*P*-values after adjustment for age, smoking, prior CVD and hypertension; PC Benjamini and Hochberg correction procedure. <sup>f,g</sup>C/C × C/G *P* > 0.05, C/C × G/G *P* < 0.05, C/G × G/G *P* < 0.05. <sup>h,j</sup>C/C × C/T *P* < 0.05, C/C × T/T *P* > 0.05, C/T × T/T *P* > 0.05.

genotypes (C/C = 1.72 ± 0.78 mmol l<sup>-1</sup>; C/G = 1.80 ± 0.75 mmol l<sup>-1</sup>) (*P* = 0.002; *PC* = 0.022; *post hoc* test: C/C × C/G *P* > 0.05, C/C × G/G *P* < 0.05, C/G × G/G *P* < 0.05). The rs3020314 C/T genotype had a higher TG baseline level (1.82 ± 0.79 mmol l<sup>-1</sup>) (*P* = 0.013, *PC* = 0.143; *post hoc* test: C/C × C/T *P* < 0.05, C/C × T/T *P* > 0.05, C/T × T/T *P* > 0.05).

The SNP rs4870061 was also involved in determining HDL-C baseline levels. Carriers of the T/T genotype had higher HDL-C levels (1.63 ± 0.30 mmol l<sup>-1</sup>) than other genotypes (C/C = 1.38 ± 0.34 mmol l<sup>-1</sup> and C/T = 1.38 ± 0.30 mmol l<sup>-1</sup>) (*P* = 0.045; *PC* = 0.495; *post hoc* test: C/C × C/T *P* > 0.05, C/C × T/T *P* < 0.05, C/T × T/T *P* < 0.05).

Haplotype analysis of rs3020314-rs3020396 showed a statistically significant association with baseline TG levels in women (*P* = 0.012). The diplotypes were built and grouped based on the means of each SNP genotype. The carriers of diplotypes in the group 3 (C-G/T-G, C-G/T-A, C-A/T-A) showed higher baseline TG levels (1.86 ± 0.78 mmol l<sup>-1</sup>) than diplotypes in the group 1 (C-G/C-G, C-G/C-A, T-G/T-G, T-G/T-A; 1.53 ± 0.60 mmol l<sup>-1</sup>) and group 2 (C-A/CA, T-A/T-A; 1.65 ± 0.77 mmol l<sup>-1</sup>) (*post hoc* test: 1 × 2 *P* > 0.05; 1 × 3 *P* < 0.05; 2 × 3 *P* < 0.05) (Supplementary data). The rs2234693-rs9340799 and rs3020432-rs2207396 diplotypes showed no statistically significant association with basal lipid or lipoprotein levels in the total sample or stratified by sex.

#### *ESR1* SNPs and efficacy of lipid-lowering therapy

After adjusting for covariates, we assessed the potential association of the SNP set with efficacy of lipid-lowering therapy. Table 4 shows the baseline, post-treatment and mean percentage changes in lipid and lipoprotein levels after simvastatin/atorvastatin therapy. The rs2234693 C/C genotype was statistically associated with a better lipid-lowering response; C/C carriers had a greater HDL-C increase (7.7 ± 27.5%) than C/T and T/T carriers (0.12 ± 16.7 and 2.8 ± 21.2%, respectively) (*P* = 0.037; *PC* = 0.407). For the rs3798577, statistically significant association was observed between the T allele and a greater TC and TG reduction (TC: T/T = -29.4 ± 12.1%; T/C = -27.9 ± 12.8%; C/C = -23.2 ± 10.8%;

*P* = 0.019; *PC* = 0.209) (TG: T/T = -18.2 ± 27.0%; T/C = -14.1 ± 27.9%; C/C = -3.27 ± 34.8%; *P* = 0.026; *PC* = 0.286). These associations were observed only in female subjects. No statistically significant associations were observed in either the male subjects or in the haplotype analysis.

Concomitant use of drugs affecting the lipid-lowering metabolic pathway, such as CYP3A4 inducers, substrates and inhibitors, were assessed and showed no influence on the efficacy of simvastatin/atorvastatin therapy. Likewise, the analysis of other co-medications showed no influence on the simvastatin/atorvastatin therapy end point in this subject group.

#### DISCUSSION

In this study, we examined the possible associations of *ESR1* SNPs with baseline lipid and lipoprotein levels and with the efficacy of simvastatin/atorvastatin lipid-lowering therapy. The SNPs investigated in this study showed frequencies similar to those reported in the NCBI SNP database.<sup>38</sup> While 13 SNPs were genotyped in our sample, 8 of them tagged an additional 23 SNPs. Therefore, our analyses involved a total of 36 polymorphic sites covering 24.1% of *ESR1* variability, with *r*<sup>2</sup> ≥ 0.8. LD was detected between rs2234693-rs9340799, rs3020314-rs3020396 and rs3020432-rs2207396. This observation is consistent with HapMap data from populations of European descent (NCBI International HapMap Project).

Our major observations were: (i) the *ESR1* SNPs rs4870061, rs1801132 and rs3020314 showed association with baseline HDL-C or TG levels, and (ii) taking into account the efficacy of simvastatin/atorvastatin therapy, two SNPs (rs2234693 and rs3798577) showed association with the mean percentage change of TC, HDL-C and TG. All observations were made in women and not in men.

The rs4870061 T allele seems to be protective because of its association with higher HDL-C and lower TG baseline levels. We found no studies in the literature focused in this *ESR1* variant, which is located in intron 3 and tags two other SNPs (rs6557170 and rs4458702). However, the rs4870061 HDL-C *P*-value did not remain significant after performing the false discovery rate procedure proposed by Benjamini; therefore, we advise caution when making

profiles is partially attributable to sex hormones and their receptors. Our data suggest the presence of sexual dimorphism in the effect of the *ESR1* variants in baseline lipid and lipoprotein levels in this cohort. Moreover, the efficacy of simvastatin/atorvastatin therapy seems also be partially sex-specific. The ER may have an important role in the statin pathway. Data regarding sex-specific statin response in the literature are controversial.<sup>54–58</sup> However, previous studies did not include efficacy data for statin use regarding sex-specific differences,<sup>57</sup> as previously discussed.<sup>30</sup>

It is important to note that the vast majority of women who comprise this cohort are in a period of hormonal deficiency, and we have a lack of information about hormone therapy use. The postmenopausal period in addition to non-hormonal therapy use leads to the worsening of the lipid profile, resulting in the downregulation of LDL receptors in the liver and decreased clearance of LDL-C from serum.<sup>59</sup> Several limitations were present in our study: (i) this was an observational study and not a randomized clinical study; (ii) the sample was collected for convenience and presents differences in proportion of women and men; (iii) subjects were not matched by age between gender sub-samples; (iv) there was a lack of information regarding lifestyle (diet and physical exercise) and hormonal status (for women). However, we minimized the possibility of type 2 errors by using adjustment variables with covariates that could influence the final response.

In conclusion, this work evaluates approximately 25% of the *ESR1* sequence variability and our results suggest *ESR1* may be involved in statin therapy response in a sex-specific manner. Approaches that focus on resolving individual variation in drug response may be important, because they enable physicians to direct treatment toward achieving specific goals. However, further replicative studies, matched by sex, are needed to confirm those observations.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Centro de Diagnóstico Cardiológico staff for their assistance in sample collection. We also thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Brazil), REUNI/UFCSA scholarship program, PROAP-CAPES, PRONEX-FAPERGS/CNPq, DECIT/SCITE-MS/CNPq and FAPERGS for their financial support.

## REFERENCES

- Davidson MH, Toth PP. Comparative effects of lipid-lowering therapies. *Prog Cardiovasc Dis* 2004; **47**: 73–104.
- Postmus I, Verschuren JJ, de Craen AJ, Slagboom PE, Westendorp RG, Jukema JW et al. Pharmacogenetics of statins: achievements, whole-genome analyses and future perspectives. *Pharmacogenomics* 2012; **13**: 831–840.
- Chasman DI, Posada D, Subrahmanyam L, Cook NR, Stanton VP Jr, Ridker PM. Pharmacogenetic study of statin therapy and cholesterol reduction. *JAMA* 2004; **291**: 2821–2827.
- Schmitz G, Langmann T. Pharmacogenomics of cholesterol-lowering therapy. *Vascul Pharmacol* 2006; **44**: 75–89.
- Weinshilboum RM, Wang L. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: development, science, and translation. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2006; **7**: 223–245.
- Mahaney MC, Blangero J, Rainwater DL, Comuzzie AG, VandeBerg JL, Stern MP et al. A major locus influencing plasma high-density lipoprotein cholesterol levels in the San Antonio Family Heart Study. Segregation and linkage analyses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; **15**: 1730–1739.
- Kajinami K, Brousseau ME, Lamon-Fava S, Ordovas JM, Schaefer EJ. Gender-specific effects of estrogen receptor alpha gene haplotype on high-density lipoprotein cholesterol response to atorvastatin: interaction with apolipoprotein A1 gene polymorphism. *Atherosclerosis* 2005; **178**: 331–338.
- Fiegenbaum M, Silveira FR, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira ME, Pires RC et al. Determinants of variable response to simvastatin treatment: the role of common variants of SCAP, SREBF-1a and SREBF-2 genes. *Pharmacogenomics J* 2005; **5**: 359–364.
- Fiegenbaum M, da Silveira FR, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira ME, Pires RC et al. The role of common variants of ABCB1, CYP3A4, and CYP3A5 genes in lipid-lowering efficacy and safety of simvastatin treatment. *Clin Pharmacol Ther* 2005; **78**: 551–558.
- Fiegenbaum M, da Silveira FR, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira ME, Pires RC et al. Pharmacogenetic study of apolipoprotein E, cholesterol ester transfer protein and hepatic lipase genes and simvastatin therapy in Brazilian subjects. *Clin Chim Acta* 2005; **362**: 182–188.
- Nieminen T, Kahonen M, Viiri LE, Gronroos P, Lehtimäki T. Pharmacogenetics of apolipoprotein E gene during lipid-lowering therapy: lipid levels and prevention of coronary heart disease. *Pharmacogenomics* 2008; **9**: 1475–1486.
- Keskitalo JE, Kurkinen KJ, Neuvonen PJ, Niemi M. ABCB1 haplotypes differentially affect the pharmacokinetics of the acid and lactone forms of simvastatin and atorvastatin. *Clin Pharmacol Ther* 2008; **84**: 457–461.
- Zintzaras E, Kitsios GD, Triposkiadis F, Lau J, Raman G. APOE gene polymorphisms and response to statin therapy. *Pharmacogenomics J* 2009; **9**: 248–257.
- Romaine SP, Bailey KM, Hall AS, Balmforth AJ. The influence of SLCO1B1 (OATP1B1) gene polymorphisms on response to statin therapy. *Pharmacogenomics J* 2010; **10**: 1–11.
- Sortica VA, Fiegenbaum M, Lima LO, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira ME et al. SLCO1B1 gene variability influences lipid-lowering efficacy on simvastatin therapy in Southern Brazilians. *Clin Chem Lab Med* 2012; **50**: 441–448.
- Lima LO, Almeida S, Hutz MH, Fiegenbaum M, PPARA, RXRA, NR1H2 Cnd NR1H3 gene polymorphisms and lipid and lipoprotein levels in a Southern Brazilian population. *Mol Biol Rep* 2013; **40**: 1241–1247.
- Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 2006; **116**: 561–570.
- McKenna NJ, Xu J, Nawaz Z, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999; **69**: 3–12.
- Srivastava RA, Srivastava N, Averna M, Lin RC, Korach KS, Lubahn DB et al. Estrogen up-regulates apolipoprotein E (ApoE) gene expression by increasing ApoE mRNA in the translating pool via the estrogen receptor alpha-mediated pathway. *J Biol Chem* 1997; **272**: 33360–33366.
- Lopez D, Sanchez MD, Shea-Eaton W, McLean MP. Estrogen activates the high-density lipoprotein receptor gene via binding to estrogen response elements and interaction with sterol regulatory element binding protein-1A. *Endocrinology* 2002; **143**: 2155–2168.
- The NCBI GENE database. Accessed at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.
- Demissie S, Cupples LA, Shearman AM, Gruenthal KM, Peter I, Schmid CH et al. Estrogen receptor-alpha variants are associated with lipoprotein size distribution and particle levels in women: the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis* 2006; **185**: 210–218.
- Molvarec A, Nagy B, Kovacs M, Walentin S, Imreh E, Rigo J Jr et al. Lipid, haemostatic and inflammatory variables in relation to the estrogen receptor alpha (ESR1) PvuII and XbaI gene polymorphisms. *Clin Chim Acta* 2007; **380**: 157–164.
- Lamon-Fava S, Asztalos BF, Howard TD, Reboussin DM, Horvath KV, Schaefer EJ et al. Association of polymorphisms in genes involved in lipoprotein metabolism with plasma concentrations of remnant lipoproteins and HDL subpopulations before and after hormone therapy in postmenopausal women. *Clin Endocrinol* 2010; **72**: 169–175.
- Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1999; **340**: 1801–1811.
- Ellegren H, Parsch J. The evolution of sex-biased genes and sex-biased gene expression. *Nat Rev Genet* 2007; **8**: 689–698.
- Ober C, Loisel DA, Gilad Y. Sex-specific genetic architecture of human disease. *Nat Rev Genet* 2008; **9**: 911–922.
- Yoon M. PPARalpha in obesity: sex difference and estrogen involvement. *PPAR Res* 2010; pii: 584296; doi: 10.1155/2010/584296 (e-pub ahead of print 17 August 2010).
- Kivits KT, Niemi M, Schaeffeler E, Pitkala K, Tilvis R, Fromm MF et al. Lipid-lowering response to statins is affected by CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 2004; **14**: 523–525.
- Smiderle L, Lima LO, Hutz MH, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira ME et al. Evaluation of sexual dimorphism in the efficacy and safety of simvastatin/atorvastatin therapy in a southern Brazilian cohort. *Arq Bras Cardiol* 2014; **103**: 33–40.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; **18**: 499–502.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; **21**: 263–265.
- Klos KL, Boerwinkle E, Ferrell RE, Turner ST, Morrison AC. ESR1 polymorphism is associated with plasma lipid and apolipoprotein levels in Caucasians of the Rochester Family Heart Study. *J Lipid Res* 2008; **49**: 1701–1706.

- 34 Smiderle L, Mattevi VS, Giovenardi M, Wender MC, Hutz MH, Almeida S. Are polymorphisms in oestrogen receptors genes associated with lipid levels in response to hormone therapy? *Gynecol Endocrinol* 2012; **28**: 644–648.
- 35 Lahiri DK, Bye S, Nurnberger JI Jr, Hodes ME, Crisp M. A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested. *J Biochem Biophys Methods* 1992; **25**: 193–205.
- 36 Long JC, Williams RC, Urbanek M. An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *Am J Hum Genet* 1995; **56**: 799–810.
- 37 Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol* 1995; **57**: 289–300.
- 38 SNP database. Accessed at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>.
- 39 Fox CS, Yang Q, Cupples LA, Guo CY, Atwood LD, Murabito JM et al. Sex-specific association between estrogen receptor- $\alpha$  gene variation and measures of adiposity: the Framingham Heart Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; **90**: 6257–6262.
- 40 Lipphardt MF, Deryal M, Ong MF, Schmidt W, Mahlknecht U. ESR1 single nucleotide polymorphisms predict breast cancer susceptibility in the central European Caucasian population. *Int J Clin Exp Med* 2013; **6**: 282–288.
- 41 Mavaddat N, Dunning AM, Ponder BA, Easton DF, Pharoah PD. Common genetic variation in candidate genes and susceptibility to subtypes of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; **18**: 255–259.
- 42 Dunning AM, Healey CS, Baynes C, Maia AT, Scollen S, Vega A et al. Association of ESR1 gene tagging SNPs with breast cancer risk. *Hum Mol Genet* 2009; **18**: 1131–1139.
- 43 Herrington DM, Howard TD, Hawkins GA, Reboussin DM, Xu J, Zheng SL et al. Estrogen-receptor polymorphisms and effects of estrogen replacement on high-density lipoprotein cholesterol in women with coronary disease. *N Engl J Med* 2002; **346**: 967–974.
- 44 Almeida S, Flegenbaum M, de Andrade FM, Osorio-Wender MC, Hutz MH. ESR1 and APOE gene polymorphisms, serum lipids, and hormonal replacement therapy. *Maturitas* 2006; **54**: 119–126.
- 45 Alevizaki M, Saltiki K, Cimponeriu A, Kanakakis I, Xita N, Alevizaki CC et al. Severity of cardiovascular disease in postmenopausal women: associations with common estrogen receptor  $\alpha$  polymorphic variants. *Eur J Endocrinol* 2007; **156**: 489–496.
- 46 Koivu TA, Fan YM, Mattila KM, Dastidar P, Jokela H, Nikkari ST et al. The effect of hormone replacement therapy on atherosclerotic severity in relation to ESR1 genotype in postmenopausal women. *Maturitas* 2003; **44**: 29–38.
- 47 Anghel A, Narita D, Seclaman E, Popovici E, Anghel M, Tamas L. Estrogen receptor  $\alpha$  polymorphisms and the risk of malignancies. *Pathol Oncol Res* 2010; **16**: 485–496.
- 48 Sowers MR, Wilson AL, Karvonen-Gutierrez CA, Kardia SR. Sex steroid hormone pathway genes and health-related measures in women of 4 races/ethnicities: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). *Am J Med* 2006; **119**: S103–S110.
- 49 Greendale GA, Chu J, Ferrell R, Randolph JF Jr, Johnston JM, Sowers MR. The association of bone mineral density with estrogen receptor gene polymorphisms. *Am J Med* 2006; **119**: S79–S86.
- 50 Sowers MR, Symons JP, Jannausch ML, Chu J, Kardia SR. Sex steroid hormone polymorphisms, high-density lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein A-1 from the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). *Am J Med* 2006; **119**: S61–S68.
- 51 Mishra PJ, Bertino JR. MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. *Pharmacogenomics* 2009; **10**: 399–416.
- 52 Emerging Risk Factors Collaboration, Di Angelantonio E, Sarwar N, Perry P, Kaptoge S, Ray KK et al. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA* 2009; **302**: 1993–2000.
- 53 Pilote L, Dasgupta K, Guru V, Humphries KH, McGrath J, Norris C et al. A comprehensive view of sex-specific issues related to cardiovascular disease. *CMAJ* 2007; **176**: S1–44.
- 54 Cotreau MM, von Moltke LL, Greenblatt DJ. The influence of age and sex on the clearance of cytochrome P450 3A substrates. *Clin Pharmacokinet* 2005; **44**: 33–60.
- 55 Jochmann N, Stangl K, Garbe E, Baumann G, Stangl V. Female-specific aspects in the pharmacotherapy of chronic cardiovascular diseases. *Eur Heart J* 2005; **26**: 1585–1595.
- 56 Xhyheri B, Bugliardini R. Diagnosis and treatment of heart disease: are women different from men? *Prog Cardiovasc Dis* 2010; **53**: 227–236.
- 57 Kostis WJ, Cheng JQ, Dobrzynski JM, Cabrera J, Kostis JB. Meta-analysis of statin effects in women versus men. *J Am Coll Cardiol* 2012; **59**: 572–582.
- 58 Mosca L. Controversy and consensus about statin use: it is not about the sex. *J Am Coll Cardiol* 2012; **59**: 583–584.
- 59 Mendelsohn ME, Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science* 2005; **308**: 1583–1587.

Supplementary Information accompanies the paper on the The Pharmacogenomics Journal website (<http://www.nature.com/tpj>)



**ESR2 rs1256049: a potential role in the LDL-C baseline levels in women.**

Lisiane Smiderle<sup>a</sup>, Marilu Fiegenbaum<sup>a, b</sup>, Mara Helena Hutz<sup>c</sup>, César Roberto Van Der Sand<sup>d</sup>, Luiz Carlos Van Der Sand<sup>d</sup>, Maria Elvira Wagner Ferreira<sup>d</sup>, Renan Canibal Pires<sup>d</sup>, Silvana Almeida<sup>a, b</sup>.

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA, Rio Grande do Sul, Brazil;

<sup>b</sup> Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA, Rio Grande do Sul, Brazil;

<sup>c</sup> Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Brazil.

<sup>d</sup> Centro de Diagnóstico Cardiológico, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Address to which correspondence should be sent:

Prof<sup>a</sup> Silvana Almeida  
Rua: Sarmento Leite, 245 – sala 309  
90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil  
Tel. 55 51 3303-8763  
Fax: 55 51 3303-8718  
e-mail: silvana.almeida@pq.cnpq.br

**Abstract**

*Aims:* A high degree of variability is observed in the baseline lipid level determination and in the statin clinical response between men and women. Sex-specific differences in gene regulatory mechanisms, particularly those governed by response to sex hormones, may be involved.

*Methods:* Ten single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the *ESR2* gene were typed. The basal lipid and lipoprotein levels and the response to lipid-lowering therapy were evaluated in a cohort of 495 hypercholesterolemic patients of European descent receiving simvastatin or atorvastatin, stratified by sex.

*Results:* Significant associations were detected between rs1256049 and LDL-C baseline levels in women. G/A and A/A genotypes showed lower LDL-C levels than G/G homozygotes ( $3.85 \pm 0.92$  versus  $4.39 \pm 0.91$ , respectively) ( $p = 0.023$ ,  $p_C$  (corrected  $p$ -value) = 0.115). The SNP set analyzed showed no association with simvastatin/atorvastatin efficacy in this cohort.

*Conclusion:* We consider rs1256049 a relevant variable in determining baseline LDL-C. It had already been associated with lipids and lipoproteins in previous studies by our research group. We suggest further replicative studies include *ESR2* rs1256049.

**Keywords:** cardiovascular disease, *ESR2*, statin, lipids, pharmacogenetics, rs1256049.

## 1. Introduction

Statin therapy shows high efficacy in controlling lipid levels [1-3]. However, a high degree of differences is observed between men and women in the clinical response to statins [4], especially for primary prevention [5-7]. Few studies have shown significant cardiovascular benefits of statins in women [8, 9], although there is a lack of sex-specific approaches in cardiovascular research [9, 10]. Reiner et al. [7], in a statin and cardiovascular disease (CVD) review, emphasized that a statin therapy trial in women is needed.

Sexual dimorphism is observed with regard to CVD risk [11]. This fact may be the result of sex-specific differences in gene regulatory mechanisms, particularly those governed by the response to sex hormones [12, 13]. A review from Yoon [14] suggests that sexual dimorphism and the estrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) are involved in the lipid-lowering therapy response. Estrogens modulate the lipid profile, vasodilation, inflammation, and the fibrinolysis pathway [15, 16] and act through their receptors: ER $\alpha$ , coded by the *ESR1* gene, and ER $\beta$ , coded by the *ESR2* gene [17]. The estrogen receptors are ligand-activated transcription factors that regulate many genomic events [18]. These receptors are expressed in vascular endothelial, smooth muscle and myocardial cells in women and men [19].

Some associations with *ESR2* polymorphisms have drawn attention. There are two *ESR2* single nucleotide polymorphisms (SNPs) that are the focus of CVD related studies: rs4986938 (*Alu*I 1730G>A) and rs1256049 (*Rsa*I 1082G>A). The rs4986938 effects on the lipid profiles are unclear [20-25]. The *ESR2* rs1256049 studies show an association with CVD protection and myocardial infarction in women but not in men [26] and with atherosclerosis in young adults from Finland [27]. On the other hand, Mansur et al. [28] reported no association between rs1256049 and premature

coronary artery disease (CAD). Zhao et al. [24] did not observe an association with hyperlipidemia in Chinese Han postmenopausal women. Almeida et al. [29] detected an association between the rs1256049 A allele and lower total cholesterol (T-chol) and LDL-C levels in Hormone Therapy users (HT+) postmenopausal women.

Therefore, the link between these SNPs and CVD risk remains inconclusive, as well as with the sexual dimorphism in statin therapy. The aim of this study was to evaluate the association of *ESR2* SNPs with baseline lipid and lipoprotein levels and with the efficacy of atorvastatin/simvastatin lipid-lowering therapy in a European-descent cohort in a sex-specific manner.

## 2. Methods

### 2.1 Subjects

This open prospective study was conducted with 495 hypercholesterolemic patients (331 women and 164 men) who were simvastatin/atorvastatin users and had European descent (Table 1). Expanded sample descriptions are available in Smiderle et al. [30]. This cohort did not include subjects with age lower than 20 years, triglyceride concentration of 4.52 mmol/L or higher, altered thyroid stimulating hormone levels, impaired hepatic or renal function, unstable or uncontrolled clinically significant disease and who had previously undergone therapy with other lipid-lowering drugs within less than six months. Physical examinations, clinical data and clinical laboratory evaluations were obtained by the physician. The biochemical evaluation was performed prior to the initiation of statin therapy and after six months ( $6 \pm 3$  months) of treatment. The statin therapy regimen and dose administered were determined by the physician according to the subjects' clinical characteristics. A standardized statin dosage variable was created (ratio of 2 simvastatin : 1

atorvastatin) [31]. The standardized mean dose of statins used for this cohort was  $10.2 \pm 4.6$  mg. Subjects were maintained on other medication schemes throughout the study without change. The study design is consistent with the principles of the Declaration of Helsinki and was approved by the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre Ethics Committee.

### *2.2 Biochemical and genetic analysis*

Serum levels of T-chol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and triglycerides (TG) were determined from peripheral blood obtained after 12 hours of fasting by standard methods using commercial kits. The low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels were assessed as previously described [32].

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes or from buccal mucosa cells. The SNP selection was performed using the HapMap database [33] and the Haploview software [34] and are shown in Table 2. The SNP genotyping was performed using validated TaqMan<sup>®</sup> genotyping assays with hydrolysis probes (Life Technologies, California, USA). For each genotype, two samples were confirmed by sequencing using a BigDye<sup>®</sup> terminator v3.1 cycle sequencing kit with an ABI3130 Genetic Analyzer (Life Technologies, California, USA). Reactions were performed according to the manufacturer's recommendations.

### *2.4 Statistical analysis*

The analyses were conducted using SPSS<sup>®</sup> software (version 18.0, Chicago, IL, USA). Allele frequencies, Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium (LD) were estimated using the Haploview algorithm [34]. Haplotype frequencies were estimated with the Multiple Locus Haplotype Analysis program (version 2.0) [35]. Due to the skewed distribution of triglyceride levels, these values were log transformed

prior to analysis. To determine genotype and haplotype associations with baseline lipid levels, we performed General Linear Model with the type III sum of squares and Tukey *post hoc* tests when appropriate. The model was adjusted for age, smoking status, prior CVD and hypertension. The statin efficacy was obtained from the difference in pre- and post-treatment lipid levels, multiplied by 100 and divided by the pre-treatment level for each parameter. Changes in the mean percentage of plasma lipid levels between *ESR2* genotypes and haplotypes were assessed using the General Linear Model with the type III sum of squares. Models were adjusted for age, smoking, baseline lipid level, prior CVD, controlled hypothyroidism and antithrombotic use because there were differences in sex frequency (Table 1). A p-value <0.05 was considered statistically significant. The false discovery rate (FDR) procedure proposed by Benjamini and Hochberg [36] was performed for multiple testing corrections.

### 3. Results

#### *3.1 General sample characteristics*

The SNP set allele frequencies were similar to those reported in the NCBI SNP database [37], and the SNPs tagged are shown in Table 2. From all SNPs tested, only five are under expected from Hardy-Weinberg equilibrium and are included in the association analysis. The cohort was sex-stratified to perform association tests. The mean age of women ( $62.3 \pm 10.7$ ) was higher than that of the men ( $59.9 \pm 11.1$ ) ( $p = 0.021$ ). The majority of women studied were post-menopausal and hormone-deficient.

#### *3.2 ESR2 SNPs and baseline lipid levels*

The rs1256049 A allele showed low allele frequency (MAF: A = 0.02). Therefore, homozygous A/A were grouped with the G/A genotype to perform the analyses. Significant associations were detected between rs1256049 and LDL-C baseline levels in women. G/A and A/A showed lower LDL-C levels than G/G homozygotes ( $3.85 \pm 0.92$  versus  $4.39 \pm 0.91$ , respectively) ( $p = 0.023$ ,  $p_C = 0.115$ ). (Table 3).

Another *ESR2* single locus showed no association with basal lipid and lipoprotein levels in either gender. Figure 1 shows the LD scheme from the analyzed SNPs. The rs4365213 and rs1256049 present a complete LD ( $D' = 1.0$ ; CI: 0.64 – 1.0), had their haplotype derived and showed no association with basal lipid and lipoprotein levels.

### 3.3 *ESR2* SNPs and statin efficacy

The SNP set analyzed showed no association with simvastatin/atorvastatin efficacy in this cohort. The average treatment time did not differ between genders (women:  $6.4 \pm 3.4$  months; men:  $6.1 \pm 2.9$  months) ( $p = 0.357$ ). The standard statin dose was also similar (women:  $10.3 \pm 4.7$  mg; men:  $10.2 \pm 4.3$  mg) ( $p = 0.840$ ). Regarding the LD pattern (Figure 1), the rs4365213 and rs1256049 haplotype deviation showed no association with statin efficacy in either sex.

## 4. Discussion

Our research focused on *ESR2* SNPs in determining baseline lipid and lipoprotein levels and the possible association with the simvastatin/atorvastatin efficacy, stratified by women and men, in a South Brazilian cohort with European

descent. This cohort has been previously analyzed, and a more robust sample description can be found in Smiderle et al. [30].

Statin efficacy is variable, particularly between men and women. This might be explained by biological factors (metabolism, genetic and epigenetic backgrounds, age and sex) [11, 38] and by environmental factors [39]. Genetic factors include DNA sequence changes that might change the gene expression pattern and influence different metabolism pathways. Women and men have different responses to a wide range of therapies, and numerous studies suggest a link between genetic polymorphisms and drug effects [40, 41]. However, there is a lack of information about sex and pharmacogenetics on drug activity interaction [39].

We detected significant differences only between rs1256049 and LDL-C baseline levels in women. After multiple test correction, the  $p$ -value did not remain significant. However, the appropriate application of this correction test is not clear because the probability of a type II error increases when the probability of a type I error decreases [42]. This observation is particularly important because this SNP, rs1256049, had already been associated with lipids and lipoproteins in previous studies by our research group. Almeida et al. [29] detected an association between *ESR2* rs1256049 and T-chol and LDL-C levels in premenopausal women and in postmenopausal women in therapy with estrogen/progestogen hormones. G/A carriers exhibited lower T-chol and LDL-C levels than G/G carriers, suggesting that the *ESR2* rs1256049 genotype may influence T-chol and LDL-C levels in women with abundant estrogen levels. In the present study, the vast majority of women were postmenopausal. However, information about hormone therapy use was lost for some subjects. The hormone-deficient status led to a worse lipid profile due to a decrease in estrogen production, resulting in the downregulation of LDL receptors in

the liver and decreased clearance of LDL-C from the serum [43]. Additionally, Smiderle et al. [44] analyzed two SNPs in the *ESR2* gene (rs3020450 and rs7154455) in the same cohort studied by Almeida et al. [29] and derived haplotypes with *ESR2* SNPs previously studied (rs4986938 and rs1256049). The haplotype analysis shows that only *ESR2* rs1256049 was associated with T-chol and LDL-C in premenopausal and HT+ postmenopausal women. Thus, the observation noted by this study reinforces the hypothesis that rs1256049 may be involved in *ESR2* expression and in the lipid and lipoprotein pathway. The rs1256049 comprises a G to A nucleotide change in exon 5, constituting a synonymous mutation [45], and might alter gene expression as previously described [46, 47].

This approach has limitations: (1) subjects were not matched by age between gender sub-samples, (2) the difference in proportion of women and men because of the convenience sampling, (3) we do not have lifestyle information (diet and physical exercise), (4) there was a lack of information regarding hormonal status (in women), (5) this is an observational study.

To the best of our knowledge, there are no studies in the literature evaluating the *ESR2* role in baseline lipid levels and in statin therapy response. In summary, this research emphasizes the involvement of *ESR2* rs1256049 on determining the baseline LDL-C in women, with no relation to statin efficacy in this cohort. However, definitive conclusions should be assessed in performing prospective follow-up investigations. CVD and pharmacogenetics can be influenced by several factors and considering the genetic role, multiple loci can be involved. We therefore consider rs1256049 a relevant variable for determining baseline LDL-C. We suggest further replicative studies including *ESR2* rs1256049 consider the baseline and the

interindividual statin response variability to allow physicians better therapeutic outcomes.

## References

- 1 Davidson MH, Toth PP: Comparative effects of lipid-lowering therapies. *Prog Cardiovasc Dis* 2004;47:73-104.
- 2 Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R, Simes R, Cholesterol Treatment Trialists C: Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: Prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005;366:1267-1278.
- 3 Bousoula E, Kolovou V, Perrea D, Kolovou G: Pharmacogenetics and statin treatment: Reality or theory? *Current vascular pharmacology* 2015
- 4 Postmus I, Verschuren JJ, de Craen AJ, Slagboom PE, Westendorp RG, Jukema JW, Trompet S: Pharmacogenetics of statins: Achievements, whole-genome analyses and future perspectives. *Pharmacogenomics* 2012;13:831-840.
- 5 Reidenberg MM: Statins for primary prevention of coronary artery disease. *Lancet* 2007;369:1078; author reply 1079.
- 6 Petretta M, Costanzo P, Perrone-Filardi P, Chiariello M: Impact of gender in primary prevention of coronary heart disease with statin therapy: A meta-analysis. *International journal of cardiology* 2010;138:25-31.
- 7 Reiner Z: Statins in the primary prevention of cardiovascular disease. *Nature reviews Cardiology* 2013;10:453-464.
- 8 Dale KM, Coleman CI, Shah SA, Patel AA, Kluger J, White CM: Impact of gender on statin efficacy. *Current medical research and opinion* 2007;23:565-574.
- 9 Kostis WJ, Cheng JQ, Dobrzynski JM, Cabrera J, Kostis JB: Meta-analysis of statin effects in women versus men. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:572-582.
- 10 Blauwet LA, Hayes SN, McManus D, Redberg RF, Walsh MN: Low rate of sex-specific result reporting in cardiovascular trials. *Mayo Clinic proceedings* 2007;82:166-170.
- 11 Mendelsohn ME, Karas RH: The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1999;340:1801-1811.
- 12 Ellegren H, Parsch J: The evolution of sex-biased genes and sex-biased gene expression. *Nat Rev Genet* 2007;8:689-698.
- 13 Ober C, Loisel DA, Gilad Y: Sex-specific genetic architecture of human disease. *Nat Rev Genet* 2008;9:911-922.

- 14 Yoon M: Pparalpha in obesity: Sex difference and estrogen involvement. PPAR research;2010.
- 15 Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA: Mechanisms of estrogen action. Physiological reviews 2001;81:1535-1565.
- 16 Meyer MR, Barton M: Eralpha, erbeta, and gper: Novel aspects of oestrogen receptor signalling in atherosclerosis. Cardiovasc Res 2009;83:605-610.
- 17 The NCBI gene database. Available in <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>. Retrieved December, 15<sup>th</sup> 2014.
- 18 Deroo BJ, Korach KS: Estrogen receptors and human disease. The Journal of clinical investigation 2006;116:561-570.
- 19 Babiker FA, De Windt LJ, van Eickels M, Grohe C, Meyer R, Doevendans PA: Estrogenic hormone action in the heart: Regulatory network and function. Cardiovasc Res 2002;53:709-719.
- 20 Almeida S, Fiegenbaum M, de Andrade FM, Osorio-Wender MC, Hutz MH: Esr1 and apoe gene polymorphisms, serum lipids, and hormonal replacement therapy. Maturitas 2006;54:119-126.
- 21 Silvestri S, Thomsen AB, Gozzini A, Bagger Y, Christiansen C, Brandi ML: Estrogen receptor alpha and beta polymorphisms: Is there an association with bone mineral density, plasma lipids, and response to postmenopausal hormone therapy? Menopause 2006;13:451-461.
- 22 Alevizaki M, Saltiki K, Cimponeriu A, Kanakakis I, Xita N, Alevizaki CC, Georgiou I, Sarika HL: Severity of cardiovascular disease in postmenopausal women: Associations with common estrogen receptor alpha polymorphic variants. Eur J Endocrinol 2007;156:489-496.
- 23 Almeida S, Hutz MH: Genetic variation of estrogen metabolism and the risks of cardiovascular disease. Current opinion in investigational drugs 2007;8:814-820.
- 24 Zhao T, Zhang D, Liu Y, Zhou D, Chen Z, Yang Y, Li S, Yu L, Zhang Z, Feng G, He L, Xu H: Association between esr1 and esr2 gene polymorphisms and hyperlipidemia in chinese han postmenopausal women. Journal of human genetics 2010;55:50-54.
- 25 Marini H, Curro M, Adamo EB, Polito F, Ferlazzo N, Bitto A, Atteritano M, D'Anna R, Alibrandi A, Altavilla D, Squadrito F, Ientile R, Caccamo D: The esr2 alui 1730g>a (rs4986938) gene polymorphism is associated with fibrinogen plasma levels in postmenopausal women. Gene 2012;508:206-210.
- 26 Rexrode KM, Ridker PM, Hegener HH, Buring JE, Manson JE, Zee RY: Polymorphisms and haplotypes of the estrogen receptor-beta gene (esr2) and cardiovascular disease in men and women. Clin Chem 2007;53:1749-1756.

- 27 Nikkari ST, Henttonen A, Kunnas T, Kahonen M, Hutri-Kahonen N, Juonala M, Marniemi J, Viikari J, Raitakari OT, Lehtimäki T: Estrogen receptor 2 polymorphism and carotid intima-media thickness. *Genetic testing* 2008;12:537-540.
- 28 Mansur Ade P NC, strunz CM, Aldrigui JM, Ramires JA.: Genetic polymorphisms of estrogen receptors in patients with premature coronary artery disease. *Arch Med Res* 2005;36:511-517.
- 29 Almeida S, Franken N, Zandona MR, Osorio-Wender MC, Hutz MH: Estrogen receptor 2 and progesterone receptor gene polymorphisms and lipid levels in women with different hormonal status. *Pharmacogenomics J* 2005;5:30-34.
- 30 Smiderle L, Lima LO, Hutz MH, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira ME, *et al.* Evaluation of sexual dimorphism in the efficacy and safety of simvastatin/atorvastatin therapy in a southern Brazilian cohort. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2014; **103**: 33-40.
- 31 Kivisto KT, Niemi M, Schaeffeler E, Pitkala K, Tilvis R, Fromm MF, Schwab M, Eichelbaum M, Strandberg T: Lipid-lowering response to statins is affected by cyp3a5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 2004;14:523-525.
- 32 Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS: Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
- 33 International Hapmap Project. Available in <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>. Retrieved December, 15<sup>th</sup> 2014.
- 34 Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ: Haploview: Analysis and visualization of Id and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21:263-265.
- 35 Long JC, Williams RC, Urbanek M: An e-m algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *Am J Hum Genet* 1995;56:799-810.
- 36 Benjamini Y HY: Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B, Statistical methodology* 1995:289-300.
- 37 The NCBI Snp database. Available in <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>. Retrieved December, 15<sup>th</sup> 2014.
- 38 Becquemont L, Verstuyft C, Jaillon P: [pharmacogenetics and interindividual variability in drug response: Cytochrome p-450 2c9 and coumarin anticoagulants]. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine* 2006;190:37-49; discussion 50-33.
- 39 Franconi F, Campesi I: Pharmacogenomics, pharmacokinetics and pharmacodynamics: Interaction with biological differences between men and women. *British journal of pharmacology* 2014;171:580-594.

- 40 Schwartz JB: The influence of sex on pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 2003;42:107-121.
- 41 Myburgh R, Hochfeld WE, Dodgen TM, Ker J, Pepper MS: Cardiovascular pharmacogenetics. *Pharmacol Ther* 2012;133:280-290.
- 42 Perneger TV: What's wrong with bonferroni adjustments. *British Medical Journal* 1998;316:1236-1238.
- 43 Mendelsohn ME, Karas RH: Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science* 2005;308:1583-1587.
- 44 Smiderle L, Mattevi VS, Giovenardi M, Wender MC, Hutz MH, Almeida S: Are polymorphisms in oestrogen receptors genes associated with lipid levels in response to hormone therapy? *Gynecological endocrinology* 2012;28:644-648.
- 45 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T: Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001;294:853-858.
- 46 Tsai CJ, Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C, Ambudkar SV, Gottesman MM, Nussinov R: Synonymous mutations and ribosome stalling can lead to altered folding pathways and distinct minima. *J Mol Biol* 2008;383:281-291.
- 47 Grymek K, Lukasiewicz S, Faron-Goreckaa A, Tworzydło M, Polit A, Dziedzicka-Wasylewska M: Role of silent polymorphisms within the dopamine d1 receptor associated with schizophrenia on d1-d2 receptor hetero-dimerization. *Pharmacol Rep* 2009;61:1024-1033.

**Table 1.** Characteristics of the sample\*

| <b>Characteristics</b>        | <b>All</b>  | <b>Women</b> | <b>Men</b>  | <b><i>p</i><sup>a</sup></b> |
|-------------------------------|-------------|--------------|-------------|-----------------------------|
| Number                        | 495         | 331 (66.9%)  | 164 (33.1%) |                             |
| Age (years)                   | 61.5 ± 10.9 | 62.3 ± 10.7  | 59.9 ± 11.1 | <b>0.021</b>                |
| Statin Use (%)                |             |              |             | 0.229                       |
| Simvastatin                   | 85.1        | 86.8         | 81.8        |                             |
| Atorvastatin                  | 14.9        | 13.2         | 18.2        |                             |
| Treatment time (months)       | 6.3 ± 3.2   | 6.4 ± 3.4    | 6.1 ± 2.9   | 0.357                       |
| Standard dose (mg)            | 10.2 ± 4.6  | 10.3 ± 4.7   | 10.2 ± 4.3  | 0.840                       |
| Post-menopausal (%)           |             | 76.0         |             |                             |
| Hormone therapy use (%)       |             | 14.1         |             |                             |
| Smoking (%)                   |             |              |             | <b>0.020</b>                |
| Past                          | 12.1        | 8.9          | 18.2        |                             |
| Current                       | 8.7         | 8.1          | 9.8         |                             |
| Never                         | 78.5        | 82.8         | 71.2        |                             |
| Hypertension (%)              | 71.7        | 71.2         | 73.1        | 0.649                       |
| Prior CVD (%)                 | 32.5        | 28.8         | 40.0        | <b>0.014</b>                |
| Controlled hypothyroidism (%) | 15.1        | 20.5         | 4.5         | <b>&lt;0.001</b>            |

Values of age, treatment time and standard dose are expressed as mean ± standard deviation; <sup>a</sup> *p*-values are women x men comparisons; \*data already published<sup>30</sup>.

**Table 2.** *ESR2* SNP set genotyped in the total sample and the tagged SNPs.

| SNPs       | Chromosome position | <i>ESR1</i> location          | Base changed | Minor allele frequency <sup>a</sup> | Tagged SNP                                                                          |
|------------|---------------------|-------------------------------|--------------|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| rs4986938  | 64699816            | UTR – 3'                      | G → A        | 0.38 (A)                            |                                                                                     |
| rs944045   | 64701446            | intron 1                      | A → G        | 0.08 (G)                            | rs1109056                                                                           |
| rs1256062  | 64703318            | intron 2                      | A → G        | 0.14 (G)                            | rs10144225<br>rs2274705<br>rs8017441                                                |
| rs4365213  | 64720264            | intron 3                      | T → C        | 0.42 (C)                            | rs12435857<br>rs6573549<br>rs1256061                                                |
| rs1256049  | 64724051            | synonymous mutation<br>exon 5 | G → A        | 0.02 (A)                            | rs944461<br>rs1256060<br>rs944050<br>rs1256055<br>rs944460<br>rs1256053<br>rs953592 |
| rs1256033  | 64745399            | intron 6                      | A → G        | 0.43 (A)                            | rs10143616<br>rs1256040<br>rs1256030<br>rs960070<br>rs6573553<br>rs1256031          |
| rs3783736  | 64751372            | intron 8                      | A → C        | 0.42 (A)                            |                                                                                     |
| rs17179740 | 64756751            | intron 8                      | G → A        | 0.40 (A)                            |                                                                                     |
| rs1952586  | 64759419            | intron 8                      | G → A        | 0.14 (G)                            |                                                                                     |
| rs1271572  | 64761917            | UTR – 5'                      | G → T        | 0.41 (T)                            |                                                                                     |

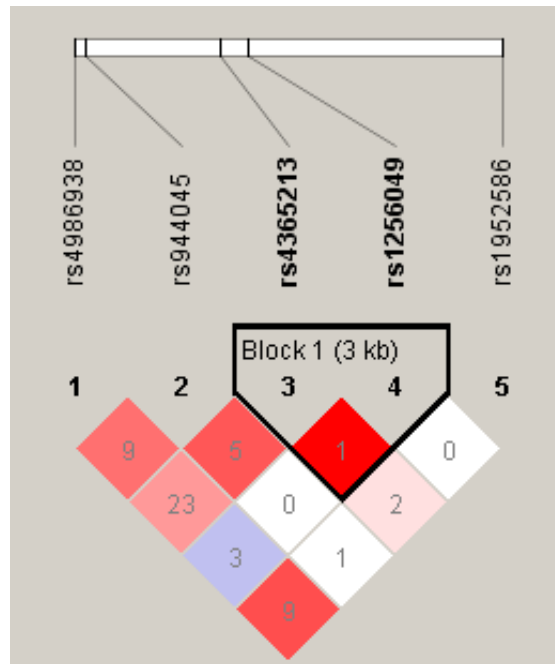
<sup>a</sup> Allele frequencies observed in our study.

**Table 3.** Baseline and mean change of lipid and lipoprotein levels according to *ESR2* rs1256049 in women and men.  
**rs1266049**

|                                | Women        |              |                          |       | Men          |              |                    |    |
|--------------------------------|--------------|--------------|--------------------------|-------|--------------|--------------|--------------------|----|
|                                | G/G          | G/A + A/A    | p                        | pC    | G/G          | G/A + A/A    | p <sup>a</sup>     | pC |
| No. of subjects                | 301          | 17           |                          |       | 142          | 8            |                    |    |
| <b>Baseline (mmol/L)</b>       |              |              |                          |       |              |              |                    |    |
| TC                             | 6.59 ± 0.99  | 6.14 ± 1.23  | 0.158 <sup>a</sup>       |       | 6.04 ± 1.00  | 5.84 ± 0.58  | 0.387 <sup>a</sup> |    |
| LDL-C                          | 4.39 ± 0.87  | 3.85 ± 0.92  | <b>0.023<sup>a</sup></b> | 0.115 | 4.02 ± 0.94  | 3.54 ± 0.56  | 0.106 <sup>a</sup> |    |
| HDL-C                          | 1.39 ± 0.33  | 1.33 ± 0.26  | 0.714 <sup>a</sup>       |       | 1.19 ± 0.27  | 1.26 ± 0.26  | 0.637 <sup>a</sup> |    |
| TG                             | 1.70 ± 0.75  | 2.06 ± 0.87  | 0.078 <sup>a</sup>       |       | 1.75 ± 0.81  | 1.72 ± 0.47  | 0.691 <sup>a</sup> |    |
| <b>Post-treatment (mmol/L)</b> |              |              |                          |       |              |              |                    |    |
| TC                             | 4.69 ± 0.77  | 4.88 ± 1.33  | 0.053 <sup>b</sup>       |       | 4.56 ± 0.94  | 4.15 ± 0.50  | 0.365 <sup>b</sup> |    |
| LDL-C                          | 2.65 ± 0.68  | 2.59 ± 1.12  | 0.591 <sup>b</sup>       |       | 2.65 ± 0.77  | 2.22 ± 0.48  | 0.300 <sup>b</sup> |    |
| HDL-C                          | 1.41 ± 0.36  | 1.41 ± 0.32  | 0.179 <sup>b</sup>       |       | 1.23 ± 0.30  | 1.28 ± 0.27  | 0.961 <sup>b</sup> |    |
| TG                             | 1.37 ± 0.58  | 1.70 ± 0.99  | 0.677 <sup>b</sup>       |       | 1.45 ± 0.64  | 1.37 ± 0.51  | 0.871 <sup>b</sup> |    |
| <b>Mean change (%)</b>         |              |              |                          |       |              |              |                    |    |
| TC                             | -27.7 ± 12.4 | -20.1 ± 11.6 | 0.142 <sup>c</sup>       |       | -23.6 ± 12.2 | -28.6 ± 4.9  | 0.221 <sup>c</sup> |    |
| LDL-C                          | -38.1 ± 17.8 | -34.0 ± 18.8 | 0.960 <sup>c</sup>       |       | -32.9 ± 16.9 | -41.7 ± 8.39 | 0.152 <sup>c</sup> |    |
| HDL-C                          | 2.27 ± 21.1  | 11.5 ± 20.5  | 0.210 <sup>c</sup>       |       | 4.98 ± 22.4  | 2.5 ± 13.5   | 0.790 <sup>c</sup> |    |
| TG                             | -12.9 ± 29.5 | -16.6 ± 27.3 | 0.981 <sup>c</sup>       |       | -9.52 ± 34.3 | -18.6 ± 21.7 | 0.886 <sup>c</sup> |    |

All data are presented as mean ± standard deviation, TC indicates, Total cholesterol; LDL-C, Low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, High-density lipoprotein cholesterol; TG, triglycerides; <sup>a</sup> p-values after adjustment for age, smoking status, prior CVD and hypertension; <sup>b</sup> p-values after adjustment for age, smoking status, prior CVD, hypertension, baseline lipid level, standard dose and treatment time; <sup>c</sup> p-values after adjustment for age, smoking, baseline lipid level, standard dose, treatment time, prior CVD, hypertension, controlled hypothyroidism and antithrombotic use; pC, corrected p-value by Benjamini and Hochberg correction procedure.

**Figure 1.** Linkage disequilibrium (LD) structure and correlation of 5 SNPs in *ESR2*.



The plot was built using Haploview with  $D'$  color scheme ( $D'=0$  white color,  $D'<1$  shades of pink and  $D'=1$  red color). The value within each diamond represents the pair-wise  $r^2$  (correlation) between the two SNPs. The block 1 represents SNPs that were in LD and were used in the haplotype analysis. LD was considered when  $D' \geq 0.90$ .



As doenças cardiovasculares (DCV) acometem o coração e os vasos sanguíneos. O controle da hiperlipidemia, principalmente no que se refere aos níveis de CT e LDL-C, através do uso de estatinas constitui a principal estratégia farmacológica utilizada clinicamente. O uso de estatinas, tanto para a prevenção primária (indivíduos sem história prévia de DCV) quando secundária (indivíduos com história prévia de DCV) permitiu uma significativa redução de risco de novos eventos cardiovasculares. Metanálises presentes na literatura demonstram a variabilidade interindividual observada na resposta às estatinas, à qual pode ser influenciada por variações genéticas e também por diferenças entre os sexos, estas últimas, denominadas dimorfismo sexual.

Dessa forma o objetivo da nossa pesquisa foi avaliar o perfil clínico da coorte, bem como avaliar o perfil lipídico basal e a resposta da terapia com sinvastatina ou atorvastatina, separadamente entre homens e mulheres e a possível associação de variantes de genes relacionados ao mecanismo de ação dos estrógenos.

Na avaliação do perfil clínico da coorte estudada observou-se que as mulheres: apresentaram em média níveis de CT e LDL-C mais elevados do que homens; são em média 3 anos mais velhas do que os homens; a maioria encontra-se no período de pós-menopausa e em *status* de deficiência hormonal. O nível basal de lipoproteínas foi um forte preditor da resposta às estatinas. Indivíduos que apresentam pior perfil lipídico geralmente apresentam uma resposta mais favorável quando recebem estatinas. Em contrapartida, a idade e o *status* de deficiência hormonal tendem a um perfil lipídico desfavorável. A porcentagem de homens e mulheres que apresentou níveis normalizados de lipídeos após o tratamento foi semelhante. Não houve diferença entre a porcentagem média de mudança nos níveis de lipídeos antes e após o tratamento com estatinas, de acordo com o sexo. Nesta coorte, embora as mulheres apresentassem perfil lipídico mais desfavorável, o percentual de redução de TC e LDL-C foi muito semelhante aos homens. Fato que pode ser explicado pelo nível basal ser um forte preditor de eficácia: ele explica em torno de 36% da redução nos níveis de CT e de LDL-C nesta coorte.

Sugerimos a presença de dimorfismo sexual na segurança desta terapia. RAMs foram observadas em 74 dos 495 indivíduos avaliados. Mialgia (com ou sem alteração de creatinafosfoquinase - CPK) ocorreu mais frequentemente em mulheres (25,9%), enquanto que o aumento isolado de CPK e alterações de função hepática foram mais frequentemente observados em homens (17,9%). Além disso, mulheres

que receberam bloqueadores do canal de cálcio, diuréticos e antitrombóticos concomitantemente ao uso de estatinas, apresentaram maior ocorrência de RAM do que homens. A distribuição de gordura corporal em mulheres pode influenciar no volume de distribuição de fármacos, aumentando o seu tempo de meia-vida e, por consequência, produzir reações indesejadas como mialgia. O uso de outros fármacos, como por exemplo, inibidores ou indutores de enzimas da família do citocromo P 450, concomitante ao uso de estatinas também podem contribuir com a RAM.

Os perfis de lipídeos e lipoproteínas basais sofrem influências ambientais e genéticas. Polimorfismos genéticos podem estar relacionados com a determinação destes parâmetros. Este trabalho investigou 13 SNPs no gene *ESR1* e 10 SNPs no gene *ESR2*. Foram observadas associações entre SNPs no gene *ESR1* com os níveis de HDL-C e TG basais e com níveis de CT e TG em resposta às estatinas em mulheres.

A análise incluindo polimorfismos nos genes que codificam os receptores de estrógenos demonstrou, nesta coorte, associação com níveis de lipídeos e lipoproteínas apenas em mulheres, tanto nos níveis basais quanto na resposta ao tratamento. Tal observação pode ser resultado de variações na expressão destes genes (*ESR1* e *ESR2*) e influenciar no metabolismo de estatinas diferentemente em homens e mulheres. Ainda considerando o componente genético, todas as associações com o gene *ESR1* observadas incluíram níveis basais de HDL-C e TG e eficácia de TG. O efeito das estatinas ocorre principalmente sobre a redução de CT e LDL-C, o que explica o seu uso na prevenção do desenvolvimento de DCV. O gene *ESR1* demonstrou associação com resposta de CT e TG. O nível de TG não é utilizado como preditor de risco cardiovascular, porém é claro o seu envolvimento na formação e desenvolvimento da placa aterosclerótica contribuindo para o desenvolvimento de DCV.

Uma observação particularmente interessante é a associação entre o rs1256049 do gene *ESR2* e níveis basais de LDL-C. Este SNP vem sendo estudado pelo nosso grupo de pesquisa e a sua associação na determinação dos níveis de LDL-C se mantêm nas diferentes amostras estudadas. Essa observação reforça a hipótese de que este polimorfismo possa apresentar funcionalidade, ou seja, possa estar influenciando na expressão do gene *ESR2*. Ou ainda, este polimorfismo pode estar em desequilíbrio de ligação com outro polimorfismo funcional cujo papel na

resposta a estatinas ainda não está descrito na literatura. Assim, estudos avaliando a expressão desta variante genética poderiam trazer respostas definitivas.

Cabe ressaltar que a nossa amostra é constituída por uma maior proporção de mulheres. Pelo fato de ser uma amostra coletada por conveniência, o cronograma de estudos inviabilizou a continuidade da coleta de um maior número de pacientes. E ainda, o número de mulheres que fazem acompanhamento médico regular é maior do que o número de homens, o que culminou na obtenção de dados clínicos de um maior número de mulheres.

Estudos como o nosso, definido como estudo de associação genética, utilizam estratégias focadas em variantes genéticas que possam estar relacionadas com a fisiopatologia de condições complexas, como o perfil lipídico e a DCV. A resposta farmacológica é influenciada por fatores genéticos e ambientais. Identificar as variantes genéticas que influenciam na eficácia farmacológica e compreender o seu efeito pode contribuir para o desenvolvimento de uma terapêutica individualizada, permitindo aumentar a eficácia, reduzir os eventos indesejados - secundários aos fármacos - e aumentar a aderência à terapia.



## 8.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA.



### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP UFCSPA

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA, registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o nº 075/05 em 23/07/04, analisou o Projeto:

**Projeto:** 10-686

**Versão do Projeto:**

**Versão do TCLE:**

**Pesquisadores:**

MARILU FIEGENBAUM

SILVANA DE ALMEIDA

MARA HELENA HUTZ

LISIANE SMIDERLE

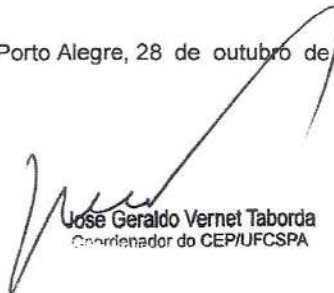
LUCIANA OTERO LIMA

RENATA BIANCHI MARIAN

**Título:** ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR E NA FARMACOGENÉTICA DE HIPOLIPEMIANTES.

Esse projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos conforme as Resoluções 196/09 e demais Resoluções complementares. Toda e qualquer alteração do projeto, assim como eventos adversos graves, deverão ser comunicados a este CEP. Os TCLE, quando necessários, somente poderão ser utilizados após prévia e explícita aprovação (carimbo) de sua redação por este CEP".

Porto Alegre, 28 de outubro de 2010.



Jose Geraldo Vernet Taborda  
Coordenador do CEP/UFCSPA

## 8.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: Estudo da influência da variabilidade genética em fatores de risco cardiovascular e na farmacogenética de hipolipemiantes.

#### I. Por que realizar essa pesquisa e qual o objetivo dela?

A doença cardiovascular é a maior causa de morte no mundo, e níveis elevados de lipídios (colesterol e triglicerídeos) no sangue contribuem para o seu desenvolvimento. Os níveis de lipídios podem ser influenciados pelas características presentes do DNA das pessoas.

Algumas vezes, para controlar os níveis de lipídios no sangue precisamos utilizar medicamentos hipolipemiantes. Apesar de esses medicamentos serem seguros e eficazes, algumas poucas pessoas que tomam esses medicamentos apresentam efeitos indesejados e outras têm seus níveis de colesterol diminuídos mais rapidamente e com menores doses de medicamentos. Estudos mostram que esta variabilidade na segurança (apenas algumas pessoas desenvolvem efeitos indesejados) e na resposta (o quanto os níveis de colesterol diminuem) pode ser influenciada por características presentes no DNA de cada pessoa.

Desta forma, o objetivo deste estudo é verificar se determinadas diferenças no DNA estão associadas a fatores de risco para doença cardiovascular e a respostas adequadas ao uso de hipolipemiantes.

#### II. Qual o procedimento que será utilizado?

Uma escovinha descartável (swab) será introduzida na sua boca e com movimentos giratórios delicados será friccionada na parte interna da sua bochecha para coleta de células bucais. Este procedimento será feito por um indivíduo treinado. O swab será colocado em um tubo estéril identificado por números diferentes daqueles utilizados pelo Centro de Diagnóstico Cardiológico, e encaminhado ao laboratório para a análise do DNA. Ao final desse trabalho as amostras de DNA serão guardadas para, eventualmente, serem utilizadas em futuras pesquisas sobre esse assunto. Todos os dados que vinculem sua identidade com os dados obtidos serão separados e preservados em diferentes bancos de dados.

#### III. Quais os riscos em participar?

Não há riscos em participar da pesquisa. A coleta será feita cuidadosamente e não causará dor, lesão ou machucado em sua boca, podendo apenas causar um pequeno desconforto durante a coleta.

#### IV. Quais os benefícios para o paciente que participar deste estudo?

Embora esta pesquisa não possa gerar nenhum benefício imediato aos participantes, ela poderá trazer vários benefícios a longo prazo, quando será possível conhecer quais pessoas possuem características genéticas associadas com níveis de lipídios mais elevados e quais pessoas respondem melhor ao tratamento com hipolipemiantes. Por fim, a sua participação ajudará no desenvolvimento de novos conhecimentos, que poderão eventualmente beneficiar você e outras pessoas no futuro.

#### V. Com quem você pode esclarecer suas dúvidas?

Em caso de qualquer outra dúvida quanto à pesquisa ou sobre os seus direitos, você poderá contatar com Marilu Fiegenbaum, Farmacêutica, Mestre e Doutora em Genética e Biologia Molecular, responsável pelo estudo, pelo telefone (051) 33038773.

#### VI. Quais são os seus direitos?



CEP/UFCSPA  
TCLE  
APROVADO  
21/10/17  
JOSÉ G. V. TABORDA  
COORDENADOR

### 8.3 Guia para autores para a submissão de artigo no periódico *Annals of Nutrition and Metabolism*

#### Submission

Manuscripts written in English are considered and should be submitted online

#### Conditions

All manuscripts are subject to editorial review.

Manuscripts are received with the explicit understanding that they are not under simultaneous consideration by any other publication. Submission of an article for publication implies the transfer of the copyright from the author to the publisher upon acceptance. Accepted papers become the permanent property of 'Annals of Nutrition and Metabolism' and may not be reproduced by any means, in whole or in part, without the written consent of the publisher. It is the author's responsibility to obtain permission to reproduce illustrations, tables, etc. from other publications.

#### Types of Articles

The journal consists of the following sections:

**Original Papers** are full-length research papers which will be considered for the journal. These articles cover topics relevant to clinical studies. Basic and experimental work appears only if directly related to clinical issues (max. 3,000 words).

**Review Articles/Systematic Reviews** Reviews in which a specific field is reviewed through an exhaustive literature survey. An Abstract is required and should be divided into Background, Summary and Key Messages. Review Articles should consist of a maximum of 4,000 words.

**Commentaries and Viewpoint** of an editorial nature may be submitted to the journal. In these communications, usual manuscript subdivisions do not apply and a summary statement is not needed; however, a very brief reference list may be included (max. 500 words).

**Meeting Reports** are brief summaries of scientific meetings in the field of nutrition and metabolism. Authors should write to the Editor inquiring about potential interest before submitting the paper (max. 1,500 words).

**Letters to the Editor** are encouraged if they directly concern articles previously published in this journal or clinical subjects related to the matters discussed. The Editor reserves the right to submit copies of such letters to the authors of the articles concerned prior to publication in order to permit them to respond in the same issue of the journal (max. 500 words).

**Editorials** are usually invited by the Editor (max. 1,000 words). Please send suggestions to the Editor.

#### Conflicts of Interest

Authors are required to disclose any sponsorship or funding arrangements relating to their research and all authors should disclose any possible conflicts of interest. Conflict of interest statements will be published at the end of the article.

#### Ethics

Published research must comply with the guidelines for human studies and animal welfare regulations. Authors should state that subjects have given their informed consent and that the study protocol has been approved by the institute's committee on human research. Further, they should also state that animal experiments conform to institutional standards.

#### Plagiarism Policy

Whether intentional or not, plagiarism is a serious violation. We define plagiarism as a case in which a paper reproduces another work with at least 25% similarity and without citation. If evidence of plagiarism is found before/after acceptance or after publication of the paper, the author will be offered a chance for rebuttal. If the arguments are not found to be satisfactory, the manuscript will be retracted and the author sanctioned from publishing papers for a period to be determined by the responsible Editor(s).

#### Arrangement

**Title page:** The first page of each paper should indicate the title, the authors' names, the institute where the work was conducted, and a short title for use as running head. NB: Authors wishing to preserve the phonetic meaning of diacritics (PubMed reduces diacritics to their root characters) must spell their names accordingly when submitting manuscripts (e.g. Müller should be Mueller).

**Full address:** The exact postal address of the corresponding author complete with postal code must be given at the bottom of the title page. Please also supply phone and fax numbers, as well as e-mail address.

**Key words:** Please supply 3–10 key words in English that reflect the content of the paper.

**Abstract of Reviews:** Should be divided into the following subsections: Background, Summary and Key Messages. The Background should provide a brief clinical context

for the review and is followed by the Summary, which should include a concise description of the main topics covered in the text. The Key Messages encapsulate the main conclusions of the review.

**Abstract:** Each paper needs an abstract of up to 200 words. It should be structured as follows:

*Background/Aims:* What is the major problem that prompted the study?

*Methods:* How was the study performed?

*Results:* Most important findings?

*Conclusions:* Most important conclusion?

**Footnotes:** Avoid footnotes.

**Tables and illustrations:** Tables are part of the text. Place them at the end of the text file. Illustration data must be stored as separate files. Do not integrate figures into the text. Electronically submitted b/w half-tone and color illustrations must have a final resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800–1,200 dpi.

#### Color Illustrations

**Online edition:** Color illustrations are reproduced free of charge. In the print version, the illustrations are reproduced in black and white. Please avoid referring to the colors in the text and figure legends.

**Print edition:** Up to 6 color illustrations per page can be integrated within the text at CHF 960.00 per page.

#### References

In the text identify references by Arabic numerals [in square brackets]. Material submitted for publication but not yet accepted should be noted as ‘unpublished data’ and not be included in the reference list. The list of references should include only those publications which are cited in the text. Do not alphabetize; number references in the order in which they are first mentioned in the text. The surnames of the authors followed by initials should be given. There should be no punctuation other than a comma to separate the authors. Preferably, cite all authors. Abbreviate journal names according to the Index Medicus system. Also see International Committee of Medical Journal Editors: Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals ([www.icmje.org](http://www.icmje.org)).

*Examples*

*(a) Papers published in periodicals:*

Chatel J-M, Bernard H, Orson FM: Isolation and characterization of two complete Ara h 2 isoforms cDNA. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;131: 14–18.

*(b) Papers published only with DOI numbers:*

Theoharides TC, Boucher W, Spear K: Serum interleukin-6 reflects disease severity and osteoporosis in mastocytosis patients. *Int Arch Allergy Immunol* DOI: 10.1159/000063858.

*(c) Monographs:*

Matthews DE, Farewell VT: *Using and Understanding Medical Statistics*, ed 3, revised. Basel, Karger, 1996.

*(d) Edited books:*

DuBois RN: Cyclooxygenase-2 and colorectal cancer; in Dannenberg AJ, Dubois RN (eds): *COX-2. Prog Exp Tum Res*. Basel, Karger, 2003, vol 37, pp 124–137.

*Reference Management Software:* Use of EndNote is recommended for easy management and formatting of citations and reference lists.

## Digital Object Identifier (DOI)

S. Karger Publishers supports DOIs as unique identifiers for articles. A DOI number will be printed on the title page of each article. DOIs can be useful in the future for identifying and citing articles published online without volume or issue information. More information can be found at [www.doi.org](http://www.doi.org)

## Supplementary Material

Supplementary material is restricted to additional data that are not necessary for the scientific integrity and conclusions of the paper. Please note that all supplementary files will undergo editorial review and should be submitted together with the original manuscript. The Editors reserve the right to limit the scope and length of the supplementary material. Supplementary material must meet production quality standards for Web publication without the need for any modification or editing. In general, supplementary files should not exceed 10 MB in size. All figures and tables should have titles and legends and all files should be supplied separately and named clearly. Acceptable files and formats are: Word or PDF files, Excel spreadsheets (only if the data cannot be converted properly to a PDF file), and video files (.mov, .avi, .mpeg).

*Author's Choice™*

Karger's Author's Choice™ service broadens the reach of your article and gives all

users worldwide free and full access for reading, downloading and printing at [www.Karger.com](http://www.Karger.com). The option is available for a one-time fee of CHF 3,000.00, which is a permissible cost in grant allocation. More information can be found at [www.karger.com/authors\\_choice](http://www.karger.com/authors_choice).

#### NIH-Funded Research

The U.S. National Institutes of Health (NIH) mandates under the NIH Public Access Policy that final, peer-reviewed manuscripts appear in its digital database within 12 months of the official publication date. As a service to authors, Karger submits your manuscript on your behalf to PubMed Central (PMC) immediately upon publication. It usually receives a PMCID within approximately a month and will appear in PMC after 12 months. For those selecting our premium [Author's Choice](#)<sup>™</sup> service, the usual embargo will be overridden, accelerating the accessibility of your work. More details on NIH's Public Access Policy are available [here](#).

#### Self-Archiving

Karger permits authors to archive their pre-prints (i.e. pre-refereeing) or post-prints (i.e. final draft post-refereeing) on their personal or institution's servers, provided the following conditions are met: Articles may not be used for commercial purposes, must be linked to the publisher's version, and must acknowledge the publisher's copyright. Authors selecting Karger's [Author's Choice](#)<sup>™</sup> feature, however, are also permitted to archive the final, published version of their article, which includes copyediting and design improvements as well as citation links.

#### Page Charges

There are no page charges for papers of 3 or fewer printed pages (including tables, illustrations and references). Each additional complete or partial page is charged to the author at CHF 325.00. The allotted size of a paper is equal to approx. 10 manuscript pages (including tables, illustrations and references).

#### Proofs

Unless indicated otherwise, proofs are sent to the first-named author and should be returned with the least possible delay. Alterations made in proofs, other than the correction of printer's errors, are charged to the author.

#### Reprints

Order forms and a price list are sent with the proofs. Orders submitted after the issue is printed are subject to considerably higher prices.