**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA**

Carlos Alberto Werutsky

**AS BASES MOLECULARES DAS HIPERCOLESTEROLEMIAS
FAMILIARES NO BRASIL: O RIO GRANDE DO SUL**

**Ribeirão Preto
2006**

Carlos Alberto Werutsky

**AS BASES MOLECULARES DAS HIPERCOLESTEROLEMIAS
FAMILIARES NO BRASIL: O RIO GRANDE DO SUL**

**Tese para obtenção do título de Doutor em Clínica
Médica – Investigação Clínica da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São
Paulo.**

Orientador: Prof. Dr. José Ernesto dos Santos

**Ribeirão Preto
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA

Werutsky, Carlos Alberto

As bases moleculares das hipercolesterolemias familiares no
Brasil: o Rio Grande do Sul. Ribeirão Preto, 2006.

88 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Clínica Médica.
Investigação Clínica.

Orientador: Santos, José Ernesto dos.

1. Hipercolesterolemia familiar. 2. Receptor do LDL (LDLR).
3. Bases moleculares. 4. Mutações.

DEDICATÓRIA

A Leila, minha esposa, e aos nossos filhos Gustavo, Ricardo e Lucas pela compreensão e tolerância e, também, aos amigos Lara e Terezinha pelo incansável apoio ao longo desses anos.

Havia uma vela no chão, e todos tropeçavam.

Colocou-se a vela acima, e todos se enxergavam.

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Em especial, a todos os pacientes participantes desse estudo, sem os quais não seria possível concretizá-lo.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Ernesto dos Santos pela confiança e apoio no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Julio Sérgio Marchini pela receptividade que tive na FMRP-USP e pela indicação do meu orientador.

A Adriana Ferreira pela sua solicitude em orientações tão necessárias para quem vem de fora da USP.

Ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior e sua equipe do Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética da FMRP-USP, em especial ao Israel Tojal, a Lidiane Cristina Melato, a Adriana Aparecida Marques, a Greice Andreotti de Molfetta, a Carla Martins Kaneto e a Cristiane Ayres Ferreira pelo trabalho conjunto na elaboração dos resultados dessa pesquisa.

A Julia Keiko do Laboratório de Nutrição do HC-FMRP pelo tratamento, conservação, triagem do material coletado e extração do DNA.

Ao Prof. Dr. Giuseppe Repetto, Chefe do Serviço de Endocrinologia do Hospital São Lucas da PUCRS, pela amizade e apoio técnico-científico..

À Dra. Vera Portal, responsável pelo Projeto no Instituto de Cardiologia – Fundação de Cardiologia do Rio Grande do Sul, instituição parceira da FMRP-USP, e seus estagiários, na obtenção dos dados desse estudo. Ao Dr. Ricardo SantaLucia Bruch do Laboratório do Instituto de Cardiologia pelo tratamento do material coletado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Endocrinologia da Faculdade de Medicina da UFRGS – Áreas de Concentração: Endocrinologia Clínica & Metabolismo e Nutrição, pela oportunidade de cursar cinco disciplinas reconhecidas pelo Programa de Pós-Graduação da FMRP-USP.

Ao Sr. Miguel Duarte do Instituto Histórico e Geográfico do Rio Grande do Sul pelas informações documentais sobre os movimentos imigratórios para o Estado.

Ao amigo Jorge Mendes Ribeiro Filho que acreditou na importância desse trabalho para a população do nosso Estado.

À Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul através da suas Coordenadorias Regionais de Saúde (CRS), em especial ao Dr. Paulo Domingos Savaris (19º CRS), ao Dr. Gilberto Feldens (15º CRS) e à Dra. Sonia Regina Gheller Egert (4º CRS) pela apresentação do Projeto aos Serviços de Saúde dos demais Municípios. Às Secretarias de Saúde, seus médicos e demais servidores, pela presteza e envolvimento na coleta de dados, em Dom Feliciano, Dra. Adriana Chaves e Equipe, em Rio Grande, Enf^{as}. Lorena Rimoli, Tânia Mara Ortiz Souza e Nutric. Roberta Araújo, em São Lourenço do Sul, Enf^a Mara Dulce Mendes Soares, em Tupanciretã, Drs. Antonio Carlos Mazo Martins e Adonir Belmiro Campra e Sr. Luiz Carlos Martins, em Ijuí, Drs. Jorge Ralf Brust, Armindo Pydd, e Sra. Beatriz Kusbick, em Frederico Westphalen, Enf^a Marta Hermes Cocco.

À Elci Ribeiro (cunhada) e Maria Mercedes Ribeiro (sogra) pelo apoio junto às comunidades dos municípios de Pinhal, Erval Seco, Rodeio Bonito, Frederico Westphalen, Alpestre, Planalto e Ametista.

Ao Laboratório Bom Pastor (Taquara, Igrejinha), responsável Técnico Dr. Jorge Alberto Schaefer e Laboratório Martel (Ijuí), Responsável Técnico Dr. Gilson Martel, pela coleta apropriada de material para essa pesquisa.

À Prof^a Kátia Gonçalves dos Santos, do Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do Centro de Pesquisas do HCPA, pela revisão técnica da Tese e sugestões oportunas que contribuíram para a sua apresentação.

À bibliotecária Rosária Geremia pela ajuda imprescindível na normalização das referências.

Ao Sr. Giquitibá Moraes de Melo, do Serviço de Imagem Digital do Hospital São Lucas da PUCRS, pela dedicação e competência na formatação desse trabalho.

RESUMO

WERUTSKY, C. A. **As bases moleculares das hipercolesterolemias familiares no Brasil: o Rio Grande do Sul**. 2006. 88 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença autossômica dominante causada por mutações no gene do receptor de LDL (LDLR) (cromossomo 19p13.1 – p13.3), que alteram parcialmente ou totalmente a função do LDLR. A HF é também uma das doenças genéticas mais comuns com frequências estimadas de heterozigotos e homozigotos de 1/500 e 1/1.000.000, respectivamente. Manifesta-se com altos níveis de LDL colesterol, arco corneal, xantomas tendíneos e sintomas prematuros de doença coronariana.. A grande heterogeneidade observada na manifestação clínica desta doença pode ser explicada, ao menos parcialmente, pelo amplo espectro de mutações no gene do LDLR. O presente estudo teve por objetivo a caracterização molecular do gene LDLR em pacientes com HF do Rio Grande do Sul (RS), Brasil. Para isso, foram obtidas amostras de DNA de 40 indivíduos provenientes de cinco macrorregiões do Estado, representando seis diferentes populações de ascendência européia, para a realização do seqüenciamento direto do gene do LDLR, com posterior análise por meio das ferramentas de bioinformática. Quinze mutações pontuais foram identificadas no gene do LDLR, a saber: c.408C>T (D115D), c.1616C>T (P518L), c.1773C>T (N570N) e c.2243A>G (D727G) na região codificadora, IVS6+36G>A, IVS6+171G>A, IVS11+56C>T, IVS11-69G>T, IVS11-55A>C, IVS15-136A>G, IVS16+46C>T e IVS17-42A>G na região intrônica, e *52G>A, *105T>G e *141G>A na região 3'-UTR. Destas, oito ainda não foram descritas na literatura (três situadas nos exons, quatro nos introns e uma na região 3'-UTR). A mutação *52G>A foi previamente identificada em pacientes com HF da região Sudeste do Brasil, sugerindo que possa exercer um importante efeito na patogênese da HF em pacientes

brasileiros. Em relação às macrorregiões do RS, os portugueses, italianos e espanhóis apresentaram o maior número de mutações dentre os grupos étnicos analisados. Assim, os resultados obtidos confirmam que existe um amplo de espectro de mutações no gene do LDLR. As mutações nas regiões intrônicas precisam ser investigadas sobre seu efeito potencial no desenvolvimento de HF. Considerando que este é o primeiro estudo que teve por objetivo a caracterização molecular de pacientes com HF no RS, novos estudos que visem a elucidação das bases moleculares da HF devem ser realizados, a fim de obter uma melhor caracterização genética desta doença no Brasil.

Palavras-chave: hipercolesterolemia familiar, receptor do LDL (LDLR), bases moleculares, mutações.

ABSTRACT

Werutsky, CA. **The molecular bases of the familial hypercholesterolemia in Brazil: Rio Grande do Sul.** 2006. 88 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant disorder caused by mutations in the low-density lipoprotein receptor (LDLR) gene (chromosome 19p13.1 – p13.3), which alter partially or totally the LDLR function. FH is also one of the most common inherited disorders with frequencies of heterozygotes and homozygotes estimated to be 1/500 and 1/10⁶, respectively. Affected individuals display high levels of LDL cholesterol, arcus corneae, tendon xanthomas and premature symptomatic coronary heart disease. The extensive heterogeneity observed in the clinical manifestation of this disorder may be explained, at least partially, by the broad spectrum of mutations identified in the LDLR gene. The present study had as the main goal the molecular characterization of the LDLR gene in patients with FH from Rio Grande do Sul (RS) State, Brazil. For this, DNA samples were obtained from 40 individuals living in five macroregions of RS, representing six different isolated populations of European ascendancy. The LDLR gene was subjected to the direct sequencing with further analysis through bioinformatics tools. Fifteen punctual mutations were identified in the LDLR gene, namely: c.408C>T (D115D), c.1616C>T (P518L), c.1773C>T (N570N) and c.2243A>G (D727G) in the coding region, IVS6+36G>A, IVS6+171G>A, IVS11+56C>T, IVS11-69G>T, IVS11-55A>C, IVS15-136A>G, IVS16+46C>T and IVS17-42A>G in the intronic region, and *52G>A, *105T>G and *141G>A in the 3'-UTR region. Of these, eight were not yet described in the literature (three situated in exons, four in introns and one in 3'-UTR region). The *52G>A mutation was previously identified in FH patients from Southeast Brazil, suggesting that it can exert an important effect in the pathogenesis of FH in Brazilian patients. In relation to the macroregions of Rio Grande do Sul, Portuguese, Italian and Spanish subjects carried the highest number of mutations among the ethnic groups analyzed.

Thus, the results obtained confirm the existence of a broad spectrum of mutations in the LDLR gene. The mutations in intronic regions need to be investigated in relation to its potential effect in the development of FH. Taking into account that this is the first study that had as the goal the molecular characterization of FH patients in RS, further studies aimed at elucidating the molecular bases of FH should be performed, in order to obtain the better characterization of this disease in Brazil.

Key words: familial hypercholesterolemia, LDL receptor (LDLR), molecular bases, mutations.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Etnicidade e nº de mutações do gene LDLR	26
Tabela 2 – A contribuição da imigração forçada e imigração espontânea para o Brasil até a metade do século XX.....	27
Tabela 3 - Mutações encontradas em pacientes brasileiros com HF descritas por Salazar et al. (2002)	28
Tabela 4 - Imigração espontânea para o Estado do Rio Grande do Sul	30
Tabela 5 - Seqüência de <i>primers</i> utilizados para o seqüenciamento dos exons e introns do gene LDLR, temperatura de <i>annealing</i> e tamanho dos fragmentos amplificados.....	36
Tabela 6 – Mutações encontradas na amostra e sua frequência relativa (%) por grupo étnico	40
Tabela 7 – Mutações identificadas no Brasil.....	43
Tabela 8 – Mutações descritas/não descritas em exons no presente estudo por grupo étnico .	46
Tabela 9 – Mutações descritas/não descritas em introns e região 3' não traduzida (3'UTR) da amostra por população.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação dos mapas físico e genético do cromossomo 19	23
Figura 2 - Heredograma dos membros da família, mostrando os valores do perfil lipídico em mg/dL	29
Figura 3. Macrorregiões do Estado do Rio Grande do Sul.....	33
Figura 4. Cromatograma do seqüenciamento do DNA	37
Figura 5. Alinhamento múltiplo da região de interesse com as <i>ESTs</i> e o respectivo <i>SNP</i> sinalizado através do círculo	38
Figura 6. Mutações no gene <i>LDRL</i> : Frequência relativa (%) por região do Rio Grande do Sul	41

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	16
A hipercolesterolemia como doença genética e familiar.....	17
A Hipercolesterolemia Familiar (HF)	20
Mecanismo celular da HF: defeitos no receptor LDL-C (LDLR)	21
As Bases Moleculares da Hipercolesterolemia Familiar (HF)	22
Mutações do gene LDLR relacionadas à etnicidade	25
OBJETIVOS	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
Delineamento da Pesquisa.....	32
Amostra	32
Coleta e Transporte do Material	34
Extração do DNA	34
Amplificação por PCR (“Polymerase Chain Reaction”).....	34
Reação de Sequenciamento	36
Análise das Sequências.....	38
RESULTADOS	40
DISCUSSÃO	43
CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICES	64
ANEXOS	69

INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade e morbidade nas populações adultas de países ocidentais (ANDERSON; CASTELLI; LEVY, 1987). Anitshcoff (1913) sugeriu pela primeira vez em modelo animal, a associação do consumo de gordura e aterosclerose. Os níveis séricos elevados de colesterol total (CT) e de lipoproteína de baixa densidade (LDL, *low-density lipoprotein cholesterol*) são identificados como fatores de risco para desenvolver doença arterial coronariana (DAC) (KANNEL et al. 1971).

Os estudos epidemiológicos sugerindo a associação entre ingestão de gordura e DAC iniciaram com Keys em 1955 (KEYS et al. 1966) com o “Seven Country Study”, seguido dos estudos Framingham em 1961 (KANNEL et al. 1971) e o *MRFIT (Multiple Risk Factor Intervention Trial)* (LAROSA et al., 1990; MULTIPLE RISK FACTOR INTERVENTION TRIAL RESEARCH GROUP, 1982) demonstraram haver correlação entre níveis médios de CT de diferentes populações e índices de mortalidade por DAC (MENOTTI et al., 2000).

No Brasil, níveis elevados de CT foram encontrados em 8,8% dos indivíduos, a partir de um estudo conduzido em 9 capitais, envolvendo 8.045 indivíduos com idade média de 34,7+/-9,6 anos, com valores mais elevados no sexo feminino e nas faixas etárias mais elevadas (GUIMARÃES, 1998).

A Campanha Nacional de Alerta Sobre o Colesterol Elevado mediu a colesterolemia de 81.262 indivíduos em 13 cidades brasileiras, identificando em 40% deles, níveis de CT>200 mg/dL, sendo 42% em Porto Alegre, capital do Rio Grande do Sul (MARTINEZ

et al., 2003). Essa pesquisa serviu de referência para o relatório da Organização Mundial de Saúde sobre Vigilância de Fatores de Risco recentemente publicado (WHO, 2006).

No Rio Grande do Sul, uma pesquisa envolvendo 1.066 indivíduos em 19 cidades representativas da Secretaria Estadual da Saúde do Estado, os níveis elevados de CT atinge 20,3 % da população (CT entre 200-239 mg/dL) e 5,6% com CT $\geq$ 240 mg/dL, com prevalência maior entre as mulheres (6,9%) em relação aos homens (4,1%) (RIO GRANDE DO SUL, 2003)

A principal causa de mortalidade no Rio Grande do Sul em 2002 foi a doença cardiovascular, que atingiu 31,6% da população, equivalente a 21.802 óbitos, considerada uma das mais altas do Brasil (RIO GRANDE DO SUL, 2006).

A hipercolesterolemia como doença genética e familiar

A história familiar tem sido mostrada como ajuda preditiva de risco numa variedade de doenças como a DAC. Williams et al. (2001) determinaram que o antecedente de dois ou mais parentes de primeiro grau com enfermidade coronariana, era identificado em 8% da população com risco relativo entre 3-6 para enfermidade precoce coronariana antes dos 50 anos.

A hipercolesterolemia tem sido classificada como um dos escores qualitativos de risco familiar para a doença aterosclerótica precoce. Nora et al. (1980) mostraram evidências que o risco da enfermidade cardiovascular era 7.1 vezes maior se um familiar de primeiro grau era portador de patologia vascular manifesta antes dos 65 anos. Este risco era substancialmente maior que o associado com colesterol superior a 270 mg/dL.

A eficácia do escore hipercolesterolemia se destaca quando da identificação das famílias e populações de alto risco, e a história familiar como instrumento para a detecção de população com risco cardiovascular elevado em *family based case finding* (THOMPSON, 2002).

Os estudos ultrassonográficos de Wendelhag, Wiklund e Wikstrand (1992) mostraram que a espessura da parede arterial carotídea era significativamente maior em pacientes hipercolesterolêmicos, pertencentes a famílias portadoras de hipercolesterolemia familiar, comparados ao grupo controle. Essa “marca” patológica da placa aterosclerótica pode ser melhor entendida, se nos reportarmos aos estudos de Brown e Goldstein (1976) que elucidaram o mecanismo de ligação do LDL-C com os seus receptores e o metabolismo do colesterol.

As partículas de LDL-C têm um diâmetro de 19-23 nm, e peso molecular $2,75 \times 10^6$ daltons, apresentando uma parte central com cerca de 1.500 moléculas de colesterol esterificado, principalmente linoleato. Este núcleo altamente hidrofóbico é circundado por uma capa de fosfolípidos e colesterol não-esterificado. A capa contém ainda uma única cópia de apoproteína B-100, com 514 kD. Esta proteína envolvida no transporte de lípidos, tem basicamente 2 funções: solubiliza os lípidos altamente hidrofóbicos e contém sinais que regulam o movimento das LDLs-C em sua entrada e saída de células-alvo específicas (RIFAI; BACHORIK; ALBERS, 1999). O fígado secreta LDLs-C como precursoras de partículas chamadas VLDL (*very-low-density lipoproteins*), que contêm triglicérides e ésteres de colesterol. Capilares musculares e adipocitários removem os triglicérides com a conseqüente modificação da partícula lipídica em LDL-C. Estas partículas de LDL-C circulam no plasma até a ligação com os receptores da apoproteína B-100 na superfície do hepatócito e em outras células corporais. Por endocitose mediada pelos receptores, as partículas LDL-C entram nas células e são degradadas pelas enzimas dos lisossomos liberando colesterol para o *pool* celular, cuja quantidade produz retroalimentação negativa do número de receptores e sobre a síntese endógena de colesterol. A elevação do nível de colesterol hepatocitário suprime a transcrição dos genes dos receptores, e o LDL-C é retido no plasma. Reciprocamente, a diminuição do nível de colesterol hepatocitário estimula a transcrição dos genes receptores, e o LDL-C é removido do plasma. Quatro doenças

monogênicas elevam os níveis plasmáticos de LDL-C, dentre elas a hipercolesterolemia familiar (HF) (NABEL, 2003).

Os níveis de colesterol total > 240 mg/dL e de LDL-C > 160 mg/dL são considerados de alto risco para o desenvolvimento da DAC de acordo com o Painel de Especialistas Sobre a Detecção, Avaliação e Tratamento dos Níveis Elevados de Colesterol Sangüíneo, que chamam a atenção para as pessoas que possuem formas genéticas de hipercolesterolemias, pela necessidade de detecção precoce para a prevenção da DAC prematura (NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM-NCEP, 2001).

A alta concordância de infarto do miocárdio entre gêmeos monozigóticos e dizigóticos (aproximadamente 40% e 20%, respectivamente) sugere de maneira quase inequívoca, que uma fração significativa da predisposição da doença cardiovascular pode ser representada por fatores genéticos (BERG, 1983; DE FAIRE, 1974; HARVALD; HAUGE, 1965; LILJEFORS, 1970). Tem sido relatada uma dislipidemia geneticamente vinculada em até 2/3 dos pacientes com DAC, e em até metade de seus descendentes de primeiro e segundo graus (GENEST et al., 1992).

A gradual progressão da aterosclerose a partir da infância e na adolescência, pode ser demonstrado pela presença de placas na artéria carótida com sua íntima-média mais engrossada do que os sujeitos controles (TONSTAD et al., 1996). Estudos realizados em autópsia sugerem que a aterogênese tem início na infância (STRONG et al., 1999), com a formação da placa aterosclerótica iniciando-se no desenvolvimento fetal, podendo ser acelerada pela hipercolesterolemia materna, com a subsequente progressão rápida da lesão aterosclerótica na criança (NAPOLI et al., 1997).

Estas alterações precoces, que aceleram a doença aterosclerótica, têm forte componente familiar, atribuíveis à ocorrência da herança monogênica de um produto gênico anormal, envolvido num padrão metabólico determinado como é o caso da DAC precoce devido à hipercolesterolemia familiar (HF).

Pela análise dos estudos atuais, existem pelo menos cinco genes envolvidos na etiologia das hipercolesterolemias (ABIFADEL et al., 2003; GOLDSTEIN; BROWN, 2001), ou seja:

- 1) O gene do receptor de LDL-C;
- 2) O gene da apoproteína B-100;
- 3) O gene da proteína adaptadora do receptor do LDL-C (*Autosomal Recessive LDL-C (Hypercholesterolemia - ARH)*);
- 4) O gene do transportador do grupamento ligante adenosina-trifosfato (*ABCG5 e/ou ABCG8 ATP – binding cassette transporters*);
- 5) O gene PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) implicado na HCHOLA 3 ou FH 3 (*hypercholesterolemia, autossomal dominant, 3*)

As variações nos genes do LDLR, apolipoproteína B e apolipoproteína E têm um considerável efeito sobre as concentrações plasmáticas de colesterol, especialmente nos indivíduos com hipercolesterolemia familiar (HF), onde as variações no gene LDLR dos heterozigotos duplica as concentrações plasmáticas de colesterol em relação às apo B/E, sendo maior ainda nos homozigotos (BOER et al., 1998; KASTELEIN et al., 1999; KUIVENHOVEN et al., 1998).

A Hipercolesterolemia Familiar (HF)

O evento cardiovascular mais precoce que ocorre numa população, procede de famílias com história positiva de doença cardiovascular. A história familiar é ferramenta validada e de baixo custo para a medicina preventiva e para a pesquisa médica (WILLIAMS et al., 2001).

A detecção da HF se baseia na identificação de famílias com aterosclerose precoce e em indivíduos com antecedentes familiares de enfermidade cardiovascular.

Khachadurian e Uthman (1973) descreveram pela primeira vez 2 categorias de HF, autossômica dominante e recessiva.

A HF autossômica dominante é uma doença provocada por alterações do metabolismo das lipoproteínas, causando depósitos de colesterol em tendões (xantomas), nas pálpebras (xantelasma), arco corneal precoce e doença arterial coronariana,

usualmente na quarta e quinta décadas de vida nos heterozigotos, com ocorrência aproximada de 1/500 indivíduos com níveis séricos de colesterol que oscilam entre 300-400 mg/dL. Os homozigotos, com ocorrência descrita de 1/1.000.000 nascimentos, são mais gravemente afetados, possuindo níveis de colesterol variando entre 600-1.200 mg/dL, a maioria tendo infarto do miocárdio antes dos 20 anos de idade (GOLDSTEIN; BROWN, 2001).

A HF de herança autossômica dominante, possui as seguintes características gerais (THOMPSON, 2002):

- 1- O fenótipo em geral aparece em todas as gerações, com as pessoas afetadas tendo pelo menos um genitor afetado.
- 2- Qualquer filho de um genitor afetado tem um risco de 50% de herdar a característica, se for heterozigoto.
- 3- Membros da família fenotipicamente normais não transmitem o fenótipo para seus filhos.
- 4- Homens e mulheres têm igual probabilidade de transmitir o fenótipo para seus filhos de ambos os sexos. Pode ocorrer a transmissão de homem para homem, e os homens podem ter filhas não-afetadas.
- 5- Uma proporção significativa de casos isolados deve-se a mutações novas. Quanto menor é a adaptabilidade, maior é a proporção devida a uma mutação nova.

Mecanismo celular da HF: defeitos no receptor LDL-C (LDLR)

Entre 60-70% do LDL-C circulante é removido da circulação pelo processo de endocitose mediado por receptores que são glicoproteínas sintetizados no retículo endoplasmático das células, parte deles se projetando para fora da célula, ligando-se às partículas circulantes de LDL pela apoproteína B-100 (BROWN; GOLDSTEIN, 1976; GOLDSTEIN; BROWN, 1984), nas chamadas “depressões revestidas” que se invaginam, trazendo a partícula LDL-C para dentro da célula. Nesse momento, separa-se do receptor, é captada e degradada pelas enzimas lisossômicas em seus constituintes. O LDLR é recirculado para a superfície da célula para captação de outras partículas LDL-C (cada LDLR passa por este ciclo aproximadamente uma vez a cada dez minutos, mesmo que não esteja ocupado por uma partícula de LDL-C). O colesterol livre é liberado do vacúolo

digestivo para incorporação às membranas celulares para o metabolismo de ácidos biliares, esteróides e, provavelmente, outras funções fisiológicas.

O excesso de colesterol pode ser armazenado na célula como éster de colesterol, ou removido da célula por associação com lipoproteínas de alta densidade (HDL *high-density lipoprotein*). À medida que se elevam os níveis de colesterol na célula, a síntese de colesterol celular é reduzida pela inibição da enzima da HMG-CoA redutase (3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase) e pela redução da síntese de LDLR. A elevação dos níveis de colesterol também aumenta a atividade de acilCoA: colesterol aciltransferase (ACAT), enzima que modifica o colesterol para armazenamento como ésteres de colesterol (GOLDSTEIN; BROWN, 1984).

A HF é causada por uma alteração na síntese ou capacidade funcional dos receptores de LDL-C. O número de receptores efetivos é reduzido em cerca da metade nos heterozigotos, e os homozigotos tem praticamente a ausência de receptores funcionais de LDL-C (GOLDSTEIN; BROWN, 2001). Em outras situações, os receptores podem ter atividade funcional reduzida.

As Bases Moleculares da Hipercolesterolemia Familiar (HF)

Francke, Brown e Goldstein (1984) identificaram a localização do gene do LDLR no cromossomo 19 com base nos estudos de células somáticas híbridas de hamster e de células humanas. O gene do LDLR foi localizado na região 19p13.1-p 13.3 pelo seu sítio de hibridização (LINDGREN et al., 1985). Na construção computacional do mapa físico desse cromossomo, comparado com o mapa genético, foram identificadas mais recombinações em direção aos telômeros e uma taxa de recombinações masculina/feminina variada, sendo o mapa feminino 10% mais longo que o mapa masculino (MOHRENWEISER et al., 1998) como mostra a Figura 1.

Figura 1. Relação dos mapas físico e genético do cromossomo 19

Mb (megabase) = distância física entre dois loci

cM (centimorgan) = distância entre dois loci com 1% de recombinação

cen = centrômero

O LDL-r ou LDLR ou LDL-R é sintetizado como uma glicoproteína precursora de 120 kD e que sofre modificações para glicoproteína madura de 160 kD, pela adição covalente de uma proteína de 40 kD (TOLLESHAUG et al., 1982). Yamamoto et al. (1984) relataram que o LDLR é uma proteína de 839 aminoácidos, rica em cisteína e com múltiplas cópias da família *Alu* de DNA repetitivo.

O gene LDLR possui 18 exons (seqüências codificadoras de proteínas), 17 introns e 5 domínios (regiões conservadas importantes, cada uma com função específica), cobrindo uma região de cerca de 45 kb (SÜDHOF et al., 1985). O domínio amino-terminal com função de ligação com o LDL-C apresenta 292 aminoácidos e, ainda, uma seqüência rica em cisteína de aproximadamente 40 aminoácidos, a qual é repetida, com algumas variações, sete vezes. Existem nesse domínio cadeias laterais de aminoácidos carregados negativamente, que interagem com um domínio positivamente carregado da apoproteína B-100. A liberação da proteína receptora de seu ligante (apoB-100) se faz, no endossomo, por ruptura das cadeias laterais de glutamato e aspartato nele presentes. Em seguida a esse domínio, encontra-se uma região constituída por 350 aminoácidos, homóloga a uma parte

do precursor do fator de crescimento epidérmico (EGF). Neste domínio, existem duas cadeias oligosídicas N-ligadas, que são inseridas no retículo endoplasmático e depois modificadas quando da passagem no aparelho de Golgi. Um terceiro domínio rico em serina e treonina, formado por 58 aminoácidos, contém várias O-ligadas. É possível que sirvam como escoras para manter o domínio de ligação com a apoB-100 adequadamente posicionada para o acesso desta proteína. O quarto domínio corresponde à região transmembrana, sendo formado por 22 aminoácidos hidrófobos que atravessam a membrana plasmática. O quinto domínio, carboxiterminal, consiste em 50 aminoácidos e está localizado no lado citossólico da membrana, participando da interação entre o receptor e a fossa revestida para o processo de endocitose (LEHNINGER, 1995).

Sudhof et al. (1985) mostraram em dezoito exons do gene, que treze deles são homólogos a seqüências em outras proteínas: cinco codificam uma seqüência similar existente no componente do complemento C9 (5p13); três codificam uma seqüência similar a uma repetida no precursor do EGF e em três proteínas do sistema de coagulação sanguínea – fator IX (Xq27.1-q27.2), fator X (13q34) e proteína C (2q13-q14) – e 5 outros exons codificam seqüências não repetidas que participam somente com o precursor do EGF. Subseqüentemente, o LDLR é um mosaico composto de exons em que os domínios são compartilhados por diferentes proteínas, e se constitui um membro das diversas famílias de supergenes. A relevância desses achados permitiu a compreensão do significado da segregação dos genes e o rearranjo dos exons durante a evolução (GILBERT, 1985).

A análise do gene LDLR em pacientes com HF já permitiu identificar 477 mutações de sentido alterado (*missense*) ou sem sentido (*nonsense*), 57 mutações que alteram o sítio de *splicing*, 12 mutações que deslocam o quadro de leitura (*frameshift*), 91 grandes deleções, 130 pequenas deleções, 19 grandes inserções, 55 pequenas inserções, 15 pequenas inserções/deleções (*indels*) e 1 rearranjo complexo (BIOBASE, 2005).

Essas mutações estão organizadas em cinco classes:

Classe I, contém as mutações mais comuns e levam a uma falta total de síntese da proteína receptora (alelo nulo) (HOBBS et al., 1988);

Classe II, são aquelas mutações que causam o acúmulo de LDLR endoplasmático, por não poderem ser transportados para o complexo de Golgi;

Classe III, são mutações que afetam o domínio de ligação da molécula de LDL-C no receptor. As proteínas codificadas atingem a superfície, mas não se ligam ao LDL-C ou ligam-se muito pouco (alelos de ligação deficiente) (TOLLESHAUG et al., 1983);

Classe IV, mutações que levam a síntese de proteínas que são transportadas eficientemente para a superfície celular. Elas se ligam normalmente ao LDL-C, mas não se situam nas depressões revestidas e, portanto, a ligação com o LDL-C não é internalizada (GOLDSTEIN et al., 1985); e

Classe V, sendo aquelas mutações que fazem com que o complexo receptor-molécula de LDL-C não se dissocie. Desta forma, o receptor é enzimaticamente degradado junto com a molécula de LDL-C no endossomo (DAVIS et al., 1987; ROBBINS et al., 1996).

Este acúmulo de moléculas mutantes de LDLR no retículo endoplasmático, foi mostrado em modelo animal, pela técnica da microscopia imunofluorescente (KIM et al., 2004) onde a imagem da LDLR selvagem localizada primariamente sobre a superfície da célula é comparada com a imagem da LDLR mutante, que forma um padrão reticular através do citoplasma, com alta intensidade luminosa na região perinuclear.

Mutações do gene LDLR relacionadas à etnicidade

De acordo com informações do On Line Mendelian Inheritance in Man (OMIM, 2005) o número de mutações do gene LDLR relacionadas à etnicidade são apresentados no Tabela 1.

Tabela 1 – Etnicidade e nº de mutações do gene LDLR

Etnia	Nº de Mutações(Locus LDLR)
Afriacanos *	21
Sul Africanos *	43
Australianos	45
Judeus	05
Afro-americanos	19
Canadenses	11
Chineses *	15
Austríacos	27
Belgas	19
Tchecos	12
Dinamarqueses	44
Libaneses	01
Sírios	06
Costa-riquenhos	81
Holandeses	29
Russos	09
Finlandeses	20
Franceses *	28
Ingleses *	110
Alemães *	98
Gregos *	13
Húngaros	124
Coreanos	18
Mexicanos	04
Italianos *	14
Japoneses	36
Poloneses *	13
Irlandeses	14
Noruegueses	22
Escoceses	05
Suecos	26
Espanhóis	57
Portugueses	03

* de várias procedências

A frequência de diferentes mutações no gene LDLR varia no mundo, em diferentes regiões e podem ser comuns a várias etnias. No Brasil, a sua população é formada pela contribuição de um grande número de componentes étnicos (Tabela 2).

Tabela 2 – A contribuição da imigração forçada e imigração espontânea para o Brasil até a metade do século XX

Séculos 16 – 19	Imigração forçada	
	Negros africanos	2.500.000
1819 – 1947	Imigração espontânea	
	Italianos	1.513.151
	Portugueses	1.142.117
	Espanhóis	598.802
	Alemães e Austríacos	348.302
	Eslavos	202.430
	Japoneses	188.622
	Libaneses + Sírios	79.509
	Outros	511.058
	Total	4.903.991
População brasileira em 1940		40.000.000

Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 1986

A frequência de diferentes mutações também deve variar em diferentes regiões, refletindo a variedade de imigração e os vários graus de miscigenação dos diferentes grupos étnicos (ALBERTO et al., 1999; FIGUEIREDO et al., 1992; SALAZAR et al., 2000).

O Brasil participa do Programa MED-PED (“*Make Early Diagnoses to Prevent Early Deaths*”) da Organização Mundial da Saúde que estimou cerca de 320.000 indivíduos com heterozigose para a HF no Brasil (WHO, 1999).

O estudo molecular dos defeitos do gene LDLR no Brasil foi iniciado em Ribeirão Preto (região Sudeste do Brasil) por um grupo de pesquisadores liderados por Zago e Santos (ALBERTO et al., 1999; FIGUEIREDO et al., 1992) que encontraram em 14 famílias das 16 pesquisadas, o “alelo libanês”, uma mutação C > A no exon 14, do tipo *nonsense* C660X, que resulta na produção de uma proteína truncada, sem atividade funcional. Apesar da pequena contribuição do povo árabe (menos de 1%), a mutação

C660X tem prevalência de 30% entre os pacientes atendidos no Ambulatório de Nutrologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Provavelmente, a mutação C660X representa uma das mais importantes, senão a mais importante causa de HF no Brasil, que pode se dever ao efeito fundador “*inbreeding*” por causa da endogamia que ocorreu entre os imigrantes da primeira geração.

Mais recentemente, Salazar et al. (2002) definiram a base molecular de um grupo de pacientes com HF, residentes no município de São Paulo, todos de origem européia, identificando 15 mutações no gene LDLR, das quais sete são mutações novas, cinco do tipo sinônimas e duas do tipo *frameshift*, que alteram a sequência original de aminoácidos a partir do ponto onde a mutação ocorreu (Tabela 3).

Tabela 3 - Mutações encontradas em pacientes brasileiros com HF descritas por Salazar et al. (2002)

Região	Mutação	Tipo	Substituição do aminoácido	Nome
Exon 1	c.4G>C	Não-sinônima	Gly → Arg	G (-20)R
Exon 4	c.337G>T	Codon de parada	Glu → stop	E92X
Exon 5	c.769C>T	Não-sinônima	Arg → Trp	R236W
Exon 7	c.1027G>A	Não-sinônima	Gly → Ser	G322S
Exon 8	c.1118G>A	Não-sinônima	Gly → Asp	G352D
Exon 8	c.1171G>A	Não-sinônima	Ala → Thr	A370T
Exon 8	c.1176C>A	Codon de parada	Cys → stop	C371X
Exon 10	c.1489A>G	Não-sinônima	Thr → Pro	T476P
Exon 10	c.1571T>G	Não-sinônima	Val → Gly	V503G
Exon 12	c.1801G>C	Não-sinônima	Asp → His	D580H
Exon 14	c.2017A>C	Não-sinônima	Ser → Arg	S652R
Exon 14	c.2088C>C	Não-sinônima	Cys → Trp	C675W
Exon 14	c.2093G>A	Não-sinônima	Cys → Tyr	C677Y
Exon 16	c.2333insC	Frameshift	R757fsX760	FsR757
Exon 17	c.2546delC	Frameshift	S828fsX828	FsS828

As mutações novas estão representadas em negrito (BIOBASE, 2005) (cDNA sequence)

Inocência (2003) em Ribeirão Preto, analisou as mutações do gene LDLR em 32 casos índices e suas famílias, previamente caracterizados nos estudos de Alberto et al. (1999) e Figueiredo et al. (1992), identificando oito mutações novas, que ainda não haviam sido descritas na literatura.

Van de Kerkhof et al. (2003) identificaram uma mutação do gene LDLR nunca descrita, onde a serina é substituída por uma cisteína na posição do aminoácido 305 da proteína (S305C) em descendentes de italianos no Brasil. Essa família, cujo heredograma é mostrado na Figura 1, com análise da sequência dos exons 7 e 14, revelou a presença da mutação S305C proveniente da herança materna, e da mutação C660X da herança paterna. Ambas as mutações segregaram com a hipercolesterolemia por três gerações, sendo a família do pai (probando) de origem libanesa e a família da mãe de origem italiana.

Figura 2 - Heredograma dos membros da família, mostrando os valores do perfil lipídico em mg/dL

Os poucos estudos no Brasil que relatam cerca de 20 mutações associadas com a deficiência na função do gene LDLR e a identificação de mutações distintas, além de

novas mutações envolvendo pacientes da mesma região, predominantemente de origem européia, foi o que motivaram a ampliação do estudo para a região Sul do Brasil, especificamente o Estado do Rio Grande do Sul colonizado por imigrantes vindos principalmente da Europa (Tabela 4).

Tabela 4 - Imigração espontânea para o Estado do Rio Grande do Sul

Nacionalidade	Período da Imigração	Nº de Imigrantes
Italianos	1875 – 1914	76.000
Alemães	1885 – 1937	43.115
Poloneses	1885 – 1937	23.796
Uruguaios	1882 – 1940	19.739
Russos	1885 – 1912	19.525
Austríacos	1885 – 1912	4.779
Portugueses	1886 – 1954	4.141
Franceses	1844 – 1852	955
Espanhóis	1844 – 1852	720
Sírios + Libaneses	1880 – 1926	700
Judeus	1904 – 1926	178 famílias
Letonianos	1890 – 1895	32 famílias
Japoneses	Século XX	Sem registro

Fonte: Enciclopédia Rio-Grandense (1958a, 1958b, 1958c, 1958d, 1958e, 1958f)

OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi o de identificar, na população do Rio Grande do Sul, as características genéticas da hipercolesterolemia familiar, por três motivos fortes:

- a) o tipo de imigração predominantemente européia;
- b) uma das regiões do Brasil com a maior prevalência de hipercolesterolemia; e
- c) a região do Brasil com uma das mais altas taxas de mortalidade por doença cardiovascular.

Para tanto, procedemos o seqüenciamento direto do gene LDLR e posterior identificação das mutações pela análise dos cromatogramas pela bioinformática.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento da Pesquisa

Este é um estudo descritivo-exploratório (VAN DALEN; MEYER, 1979) das mutações do gene LDLR em indivíduos portadores de hipercolesterolemia familiar e residentes no Estado do Rio Grande do Sul.

Amostra

Para estimar a proporção de ocorrência de mutações de quaisquer tipos no gene LDLR, foram selecionados por amostragem de conveniência 40 indivíduos de ambos os sexos, cadastrados em serviços assistenciais de saúde (hospitais, ambulatórios, postos de saúde) do Estado do Rio Grande do Sul, e que atenderam aos seguintes critérios de inclusão:

- ter idade mínima de 18 anos;

- serem hipercolesterolêmicos:

- a) com colesterol total igual ou superior a 280 mg/dL sem tratamento

- b) com colesterol total maior que 200 mg/dL e menor que 280 mg/dl em tratamento

com estatinas por 6 meses ou mais

- ter história de infarto do miocárdio ou angioplastia ou doença arteriosclerótica ou, ainda,

- ter cardiopatia isquêmica

- apresentar xantomas

Todos os pacientes são pertencentes a famílias viáveis de serem acessadas e de origem étnica oriunda dos movimentos migratórios para o Rio Grande do Sul, e concentrados nas macrorregiões do Estado, conforme Figura 2.

Figura 3. Macrorregiões do Estado do Rio Grande do Sul

Nas unidades de assistência médica de cada município visitado, depois da explicação pelo pesquisador aos participantes do estudo sobre os objetivos da pesquisa e esclarecimentos a respeito da doença e seu modo de herança, foi preenchida ficha de identificação individual pelos funcionários da unidade (ANEXO A), e assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (ANEXO C)

Coleta e Transporte do Material

No ambulatório dos serviços de saúde, atendido por pessoal técnico, foram coletados 10 mililitros de sangue venoso de cada paciente, em tubos de hemólise contendo o anticoagulante EDTA.

Estes tubos foram submetidos à centrifugação (2.500 rpm) por 20 minutos e invertidos para a obtenção do “creme leucocitário”, em tubos cônicos (Falcon – 15 ml). Devidamente identificados, estes tubos foram embalados adequadamente para o transporte via aérea do Rio Grande do Sul para o Laboratório de Lípidos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo.

Extração do DNA

No Laboratório de Lípidos, estes tubos foram centrifugados com um tampão de lise de glóbulos vermelhos para eliminá-los, até a obtenção dos leucócitos, e a seguir o isolamento do DNA desses leucócitos (Apêndice A). Após essa extração, o DNA foi quantificado e diluído para a formação de alíquotas de 100 microlitros, com uma concentração de 100 nanogramas por microlitros de DNA, e posteriormente estocados a 20 °C negativos.

Amplificação por PCR (“Polymerase Chain Reaction”)

A PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) explora a capacidade de duplicação do DNA. Uma fita simples de DNA é usada como molde para a síntese de novas cadeias complementares sob a ação da DNA polimerase, capaz de adicionar os nucleotídeos presentes na reação que são complementares à fita molde. A enzima polimerase do DNA requer, entretanto, um “ponto de início” ligado à fita molde que serve de apoio para que os nucleotídeos subsequentes sejam adicionados. Esse “ponto de início” da síntese é fornecido

por um oligonucleotídeo, de cerca de 20 pb, que se hibrida (se anela) à fita molde simples, o qual é denominado de *primer*. Ambas as fitas simples iniciais servem de fita molde para a síntese, desde que se forneça *primers* específicos a cada uma delas. Dessa forma, a região do DNA genômico a ser sintetizada é definida pelos *primers*, que se anelam especificamente as suas seqüências complementares na fita molde, delimitando o fragmento de DNA que se deseja amplificar.

O processo que requer diferentes reagentes (APÊNDICE B) inicia-se com a **desnaturação** da dupla fita do DNA que contém a seqüência a ser amplificada. Geralmente, a desnaturação é realizada a uma temperatura ao redor de 94°C durante 5 minutos, uma temperatura na qual as duas fitas do DNA se separam.

O passo seguinte, consiste em baixar a temperatura para níveis ao redor de 60°C, permitindo que os oligonucleotídeos iniciadores **anelem-se** especificamente nas extremidades flanqueadas da seqüência alvo e nas fitas opostas. Finalmente, a temperatura é elevada para aproximadamente 72°C e com isto a DNA-polimerase copia a seqüência alvo a partir dos oligonucleotídeos iniciadores, é a fase de **extensão**.

As condições de PCR e *primers* utilizados na amplificação dos exons e introns estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Sequência de *primers* utilizados para o sequenciamento dos exons e introns do gene LDLR, temperatura de *annealing* e tamanho dos fragmentos amplificados

Regiões Amplificadas	Primers	Sequência 5' → 3'	TA	Produto do PCR (pb)
Exon 3	LDLrEx3F	CTCGGCTCAGTGGGTCTTTC	57°C	260pb
	LDLrEx3R	GAGCAGGACCCCGTAGAGACAAA		
Exon 4	LDLrEx4F	AATGGGCTGGTGTGGGAGACTTC	60°C	497pb
	LDLrEx4R	GAGCCCAGGGACAGGTGATAGGAC		
Exon 5	LDLrEx5F	AGGCCCTGCTTCTTTTCTCT	56°C	414pb
	LDLrEx5R	CTGCCGTGAGCTGTGATTGTG		
Exon 6	LDLrEx6F	GTGCCCCGACGCGTTTCTTA	59°C	699pb
	LDLrEx6R	ATCCACCGCGCCAGCATC		
Exon 7	LDLrEx7F	GGCGAAGGGATGGGTAGGGGC	59°C	236pb
	LDLrEx7R	GGTGCCATGTCAGGAAGCGC		
Exon 8	LDLrEx8F	TGTCTCCTGGCTGCCTTCGAA	58°C	406pb
	LDLrEx8R	GGCAAGCCCAAGTCCTAACA		
Exon 9	LDLrEx9F	TCCATCGACGGGTCCCCTCTGACCC	53°C	272pb
	LDLrEx9R	AGCCCTCATCTCACCTGCGGGCCAA		
Exon 10	LDLrEx10F	ATGCCCTTCTCTCCTCCTGCCTCAG	63°C	280pb
	LDLrEx10R	AGCCCTCAGCGTCGTGGATAGGCAC		
Exon 11	LDLrEx11F	CCAGCAGGACTATTTCCCAA	58°C	346pb
	LDLrEx11R	GGAAACCTTCAGGGAGCAGCTT		
Exon 12	LDLrEx12F	AGGCTCACATGTGGTTGGAG	54°C	360pb
	LDLrEx12R	GCTTGAGTGATCTATAGTCTGTGT		
Exon 14	LDLrEx14R	GGAGGGGGCAGTTGGAGGACAC	60°C	661pb
Exon 15	LDLrEx15F	GAGACTTTCGTCATTAGGCG	54°C	435pb
	LDLrEx15R	GTTATTAGACCCACTTTACAG		
Exon 16	LDLrEx16F	GTCTACAACCTCGATAACTCAC	56°C	401pb
	LDLrEx16R	GAGGCCGTGGGGGTGATAAAGGAC		
Exon 17	LDLrEx17F	CCACAAGGCGATCTCTAAAC	56°C	491pb
	LDLrEx17R	TGCTTATCCAACATTCCTCTACAC		
Exon 18	LDLrEx18F	TGCCAGGCCCCAGAAGGTGAGAA	60°C	355pb
	LDLrEx18R	CCCCCGGGCCTGTTTCTCTTAT		

TA = temperatura de *annealing*; F = *Forward*; R = *Reverse*

As regiões mutantes amplificadas são analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,5% e são utilizados para a reação de sequenciamento.

Reação de Sequenciamento

A partir do primeiro PCR, as placas são preparadas para a eletroforese no ciclador automático (APÊNDICE C).

O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático MegaBace™1000 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) utilizando DYEnamic ET Dye Terminator Sequencing kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) (APÊNDICE D) em que os nucleotídeos que compõem a cadeia do DNA (dCTP, dATP, dGTP, dTTP) foram

marcados com fluorocromos. Quatro diferentes fluorocromos foram empregados e, uma vez excitados por um feixe de *laser*, emitem luz em diferentes comprimentos de onda. É possível marcar com estes fluorocromos o *primer* universal M13 ou então cada um dos dideoxinucleotídeos (terminadores).

Assim, uma vez que em cada uma das reações (A, T, C, G) foi empregado um fluorocromo diferente, é possível juntar estes produtos e realizar a corrida em uma única raia do gel de seqüenciamento. Os produtos da reação de seqüenciamento, marcados com fluorocromos, ao serem submetidos à eletroforese, passam pelo feixe de *laser* que promove a excitação dos fluorocromos. A luz emitida pelos fluorocromos é detectada por um fotomultiplicador, e a informação é processada e traduzida na forma de seqüência de bases, representadas por sinais (picos) coloridos ou cromatogramas, conforme ilustra a Figura 3.

Figura 4. Cromatograma do seqüenciamento do DNA

Os sinais (picos) coloridos representam uma seqüência de bases marcadas com fluorocromos.

Análise das Sequências

A abordagem computacional para identificação dos *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorphism*) foi realizada pelo Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética da FMRP-USP – Centro de Terapia Celular, através do *software* SNPIndex via *web* disponível no portal GDM (GENOME DATA MINING, 2006). Esta ferramenta executa uma sequência de programas que incluem:

Programa	Análise
<i>Phred et al</i> Ewing et al. (1998) e Ewing e Green (1998)	Base-calling dos cromatogramas
<i>Cross_match</i> University of Washington (1993-1996)	Alinhamento pareado de cada <i>EST</i> (<i>Expressed Sequence Tags</i>) com a região de interesse do exon
<i>PolyBayes et al</i> Marth et al. (1999)	Montagem e alinhamento múltiplo ancorado das <i>ESTs</i> com a região de interesse do exon
<i>PolyPhred</i> Nickerson, Tobe e Taylor (1997)	Identificação dos <i>SNPs</i>

Ao final, por meio de uma interface *web*, é possível visualizar e interagir com os resultados. Na Figura 4 é apresentado um alinhamento múltiplo de uma região de interesse do gene e seu respectivo *SNP*.

Figura 5. Alinhamento múltiplo da região de interesse com as *ESTs* e o respectivo *SNP* sinalizado através do círculo
Informações suplementares que incluem a descrição do *SNP*, região do exon analisado e detalhes do *SNP* encontram-se disponíveis acima do alinhamento em tabelas.

As mutações encontradas nos pacientes de diferentes macrorregiões do Rio Grande do Sul, foram comparadas com as mutações encontradas na região Sudeste do País, e as descritas em populações européias e asiáticas.

RESULTADOS

Utilizando a técnica de sequenciamento direto do DNA e posterior abordagem computacional, foram identificadas um total de 15 mutações no gene LDLR em 38 pacientes (em 95% da amostra) pertencentes a 6 grupos étnicos conforme demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6 – Mutações encontradas na amostra e sua frequência relativa (%) por grupo étnico

				M u t a ç õ e s						
Exon	Nucleotídeo	Aminoác ¹	Tipo	População, Freq. Rel.(%)						Ocor- rência
				Port N=12	Ital N=8	Alem N=7	Espa N=5	Polo N=5	Leto N=3	
4	c.408C>T	D115D	S		12			20		2
11	c.1616C>T	P518L	NS	8	25					3
12	c.1773C>T	N570N	S	33	25	71	20	60	67	17
15	c.2243A>G	D727G	NS	42	37	14	60	40		14
Introns (<i>InterVening Sequence</i>) ¹										
6	IVS6+171G>A			16	12					3
6	IVS6+36G>A			16	12	14				4
11	IVS11+56C>T			33	37		60	20		11
11	IVS11-69G>T			25	37	14	40	20		10
11	IVS11-55A>C			42	25	14		20		9
15	IVS15-136A>G			83	62	57	60	40	100	27
16	IVS16+46C>T			25	25	14	20	20		8
17	IVS17-42A>G			58	62	43	40	40	66	21
3'UTR (<i>Untranslated Region</i>) ²										
	*52G>A			42	25	14	40	20		11
	*105T>G			33	37	28	20	40	66	14
	*141G>A			16	12					3

¹ A posição das mutações está de acordo com BIOBASE (2005) (cDNA sequence) (ANEXO D) e a nomenclatura para descrição de codons e aminoácidos (HUMAN GENOME VARIATION SOCIETY, 2002)

² A posição das mutações está de acordo com nº de acesso AF217403 (*GenBank*) com a substituição das bases (ANEXO E)

A nomenclatura das mutações obedeceu as regras sugeridas por den Dunnen e

Antonarakis (2001)

N = N° de pacientes. Tipo de mutação: S = sinônima; NS = não-sinônima

Nota: Exon 3: pela má qualidade do sequenciamento, não permitiu afirmar sobre as variações encontradas, poderiam ser confundidas com artefato.

Exons 5, 7 e 8: não foram identificadas mutações.

A relação das mutações do gene LDLR identificadas nos exons, introns e região 3' não traduzida (3'UTR *untranslated region*) do gene LDLR, são mostradas em homozigose/heterozigose por paciente da amostra e seu componente étnico no Anexo F.

A frequência de ocorrência dessas 15 mutações nos 38 pacientes (Tabela 6) tiveram uma distribuição em 5 macrorregiões do Estado do Rio Grande do Sul conforme mostra a Figura 5.

Figura 6. Mutações no gene LDLR: Frequência relativa (%) por região do Rio Grande do Sul

As mutações P518L e D727G situadas na região codificadora (exons 11 e 15, respectivamente), são do tipo não-sinônimas, portanto, há substituição de aminoácido. As mutações D115D e N570N (66% na Região Missioneira) situadas na região codificadora (exons 4 e 12 respectivamente), são do tipo sinônimas não havendo substituição do aminoácido (ANEXO D).

As mutações situadas nos introns são um total de oito: IVS6+36G>A, IVS6+171G>A, IVS11+56C>T, IVS11-69G>T, IVS11-55A>C, IVS15-136A>G (66% na Região Missioneira, 100% na Região Norte), IVS16+46C>T e IVS17-42A>G (66% na Região Missioneira, 100% na Região Sul, 83,3% na Região Centro-Oeste, 100% na Região Norte) (ANEXO E). Essas mutações podem trazer consequências para o RNA mensageiro quando localizadas nos sítios de *splicing* doador e aceptor, podendo provocar a produção de uma proteína disfuncional. Para tanto, seria necessário realizar estudos funcionais ou de predição, o que não foi realizado nesse trabalho.

Três mutações foram localizadas após o último exon, na região 3' não traduzida (3'UTR *untranslated region*): *52G>A (75% na Região Metropolitana, 66% na Região Missioneira, 100% na Região Sul, 100% na Região Norte), *105T>G (66% na Região Missioneira) e *141G>A (ANEXO E).

Todas as mutações apresentaram frequência superior a 1%. A mutação de maior frequência nos exons, foi a N570N (39%), e nos introns, a IVS-136A>G (74%), sugerindo que se trata de sítios polimórficos.

A região promotora e os exons 1 e 2 do gene LDLR não foram seqüenciados.

DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo com o propósito de identificar no Rio Grande do Sul, Brasil, as mutações no gene LDLR em pacientes com hipercolesterolemia familiar. Tais mutações são mostradas na Tabela 7 em conjunto com as já identificadas por Alberto et al. (1999), Figueiredo et al. (1992), Inocêncio (2003), Salazar et al. (2002) e van de Kerkhof et al. (2003) e em relação à região Sudeste do Brasil.

Tabela 7 – Mutações identificadas no Brasil

Região do Gene/Ref.	Mutação Nucleotídeo	Posição do Aminoácido	Região do Brasil	População	Referência (previamente mencionado) ¹
<u>Exon 1</u>					
Salazar et al.(2002)	c.4G>C	G(-20)R	Sudeste	caucasiana	nova
<u>Exon 4</u>					
Salazar et al.(2002)	c.337G>T	E92X	Sudeste	caucasiana	Hobbs, Brown e Goldstein (1992)
Inocêncio (2003)	c.532G>T	D157Y	Sudeste	caucasiana	nova
Presente Estudo	c.408C>T	D115D	RS	polonesa#	
<u>Exon 5</u>					
Salazar et al.(2002)	c.769C>T	R236W	Sudeste	caucasiana	Amsellem e Benlian (2000)
<u>Intron 6</u>					
Presente Estudo	IVS6+36G>A		RS	portuguesa#	
Presente Estudo	IVS6+171G>A		RS	portuguesa#	
<u>Exon 7</u>					
van de Kerkhof et al.(2003)	c.977C>G	S305C	Sudeste	libanesa e italiana	nova
Salazar et al.(2002)	c.1027G>A	G322S	Sudeste	caucasiana	Hobbs, Brown e Goldstein (1992)
<u>Intron 7</u>					
Inocêncio (2003)	IVS7+10C>G		Sudeste	caucasiana	Dedoussis et al. (2004)
<u>Exon 8</u>					
Salazar et al.(2002)	c.1118G>A	G352D	Sudeste	caucasiana	Bertolini et al. (1999)
	c.1171G>A	A370T	Sudeste	caucasiana	Kotze et al. (1989)
	c.1176C>A	C371X	Sudeste	caucasiana	Langenhoven et al. (1996)
<u>Exon 10</u>					
Salazar et al.(2002)	c.1489A>G	T476P	Sudeste	caucasiana	nova
	c.1571T>G	V503G	Sudeste	caucasiana	nova
<u>Exon 11</u>					
Presente Estudo	c.1616C>T	P518L	RS	italiana#	

Tabela 7 (continuação) – Mutações identificadas no Brasil

Região Gene/Ref.	Mutação Nucleotídeo	Posição do Aminoácido	Região do Brasil	População	Referência (previamente mencionado) ¹
<u>Intron 11</u>					
Inocência (2003) ¹	IVS11-10G>A		Sudeste	caucasiana	Cenarro et al. (1998)
Presente Estudo	IVS11+56C>T		RS	espanhola#	Amsellem et al. (2002)
	IVS11-69G>T		RS	espanhola#	Amsellem et al. (2002)
	IVS11-55A>C		RS	portuguesa#	
<u>Exon 12</u>					
Salazar et al.(2002)	c.1801G>C	D580H	Sudeste	caucasiana	nova
Presente Estudo	c.1773C>T	N570N	RS	letonianos#	Boright et al. (1998)
<u>Exon 14</u>					
Figueiredo et al. (1992) e Alberto et al.(1999)	c.2043C>A	C660X	Sudeste	libanesa	nova
Salazar et al.(2002)	c.2017A>C	S652R	Sudeste	caucasiana	nova
	c.2088C>G	C675W	Sudeste	caucasiana	Arca e Jokinen (1998)
	c.2093G>A	C677Y	Sudeste	caucasiana	Schmidt e Kostner (2000)
<u>Exon 15</u>					
Presente Estudo	c.2243A>G	D727G	RS	espanhola#	
<u>Intron 15</u>					
Presente Estudo	IVS15-136A>G		RS	portuguesa#	
<u>Exon 16</u>					
Salazar et al.(2002)	c.2333insC	FsR757	Sudeste	caucasiana	nova
<u>Intron 16</u>					
Presente Estudo	IVS16+46C>T		RS	italiana e portuguesa#	Gen Bank
<u>Exon 17</u>					
Salazar et al.(2002)	c.2546delC	FsS828	Sudeste	caucasiana	nova
<u>Intron 17</u>					
Presente Estudo	IVS17-42A>G		RS	letoniana#	Amsellem et al. (2002)
<u>3'UTR (Untranslated Region)</u>					
Inocência (2003)	*52G>A		Sudeste	caucasiana	Gen Bank
Presente Estudo	*52G>A		RS	portuguesa#	
Presente Estudo	*105T>G		RS	letoniana#	
Presente Estudo	*141G>A		RS	portuguesa#	Amsellem et al. (2002)

A posição das mutações nos exons está de acordo BIOBASE (2005) (cDNA sequence) (ANEXO D) e a nomenclatura para descrição de codons e aminoácidos (HUMAN GENOME VARIATION SOCIETY, 2002) A posição das mutações nos introns e região 3' não traduzida está de acordo com n° de acesso AF217403 (GenBank) com a substituição das bases (Anexo E)

¹ <http://www.ucl.ac.uk/fh/>

A nomenclatura das mutações obedeceu às regras sugeridas por den Dunnen e Antonarakis (2001) #etnia mais prevalente

Os primeiros estudos no Brasil (ALBERTO et al., 1999; FIGUEIREDO et al., 1992) utilizando a técnica combinada de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e *Southern blotting*, identificaram a mutação libanesa C660X com uma prevalência de 30% dentre os pacientes

em tratamento, provavelmente devido ao efeito fundador e à endogamia entre os imigrantes da primeira geração.

Com a técnica de amplificação por meio de PCR seguida da SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) Salazar et al. (2002) identificaram 15 mutações no gene do LDLR, das quais cinco são do tipo não-sinônimas e duas que deslocam o quadro de leitura (frameshift) alterando a sequência original de aminoácidos. E, a seguir, utilizando a DGGE (Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis), van de Kerkhof et al. (2003) descreveram pela primeira vez no Brasil a mutação S305C em descendentes de italianos.

Por meio da técnica de SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*), seqüenciamento direto do DNA e posterior análise computacional, Inocêncio (2003) identificou outras mutações na região codificadora e intrônica (Tabela 7) que estão associadas à HF, porque alteram o processamento do DNA.

No presente estudo, além do seqüenciamento direto do gene LDLR, foi utilizada uma seqüência de programas de bioinformática (*Phred*, *Cross_match*, *PolyBayes*, *PolyPhred*) que permitiu a melhor visualização de cada região de interesse do gene LDLR, embora essas mutações pontuais devam, a seguir, ser amplificadas e reanalisadas para validação.

A Tabela 8 contém as quatro mutações pontuais na região codificadora do gene do LDLR identificadas no presente estudo, com as respectivas frequências encontradas nessa população. Dessas mutações, três ainda não tinham sido descritas (das 481 mutações descritas) (HGMD, 2005), portanto, necessitando reanálise.

Tabela 8 – Mutações descritas/não descritas em exons no presente estudo por grupo étnico

Região do Gene	Mutação ¹		Freq. Rel. % na População Estudada					
			Port	Espa	Polo	Alem	Leto	Ital
Exon 4	D115D	ND			20			12
Exon 11	P518L	ND	8					25
Exon 12	N570N	D	33	20	60	71	67	25
Exon 15	D727G	ND	42	60	40	14		37

¹A posição das mutações está de acordo com BIOBASE (2005) (cDNA sequence) (ANEXO D) e a nomenclatura para descrição de codons e aminoácidos (HUMAN GENOME VARIATION SOCIETY, 2002) ND = não descrita

D= Descrita por Boright et al. (1998) em caucasóides americanos da colônia de Alberta Hutterite (alelos 1773T>61% e 1773C>39%)

A nomenclatura das mutações obedeceu às regras sugeridas por den Dunnen e Antonarakis (2001)

A mutação N570N no exon 12 foi a mais prevalente encontrada em todos os grupos étnicos, com predominância de heterozigotos (73%) sobre os homozigotos (27%) (ANEXO F), o que confirma a heterozigosidade relativamente alta do gene LDLR (1:500) (GOLDSTEIN; HOBBS; BROWN, 1995).

Esta mutação descrita em uma população geneticamente isolada de caucasianos na América do Norte, com taxas elevadas de endogamia, também foi identificada no presente estudo em poloneses e letonianos mais concentrados nos municípios de Dom Feliciano e Ijuí, em populações mais conservadas, e com menores taxas de miscigenação do que os italianos, portugueses, espanhóis e alemães.

As mutações D115D e N570N são do tipo silenciosas, mas podem alterar a função protéica se criarem um novo sítio de *splicing* ou, ainda, se afetarem a estabilidade do RNAm.

As mutações P518L e N570N por pertencerem à Classe II (acúmulo endoplasmático do LDLR por deficiência no seu transporte) e a mutação D115D por pertencer à Classe III (alelos da ligação deficiente), podem acarretar prejuízo funcional do LDLR.

A mutação D727G no exon 15 foi a mais prevalente encontrada em espanhóis (60%), com predominância de homozigotos (57%) sobre heterozigotos (43%). Essa mutação,

assim como a P518L encontrada em italianos e portugueses, são do tipo *missense* ou com maior chance de afetar a funcionalidade do LDLR, ainda dependendo de estudos funcionais para determinar o seu papel no desenvolvimento da HF.

Diferentes mutações no mesmo domínio e mutações iguais em diferentes pacientes podem resultar na variação clínica de fenótipos (UMANS-ECKENHAUSEN et al., 2002).

Estudos com pacientes portadores de HF homozigóticos têm mostrado que diferentes tipos de mutações resultam numa atividade do LDLR residual funcional que varia entre 0 – 30% (BERTOLINI et al., 1999; HOBBS; BROWN; GOLDSTEIN, 1992). Essa heterogeneidade mutacional explica a variação fenotípica mostrada nos pacientes com HF homozigotos, em que a forte correlação entre a atividade residual do receptor em cultura de células e a gravidade da doença ocorre (BERTOLINI et al., 1999; GOLDSTEIN; HOBBS; BROWN, 1995; HOBBS; BROWN; GOLDSTEIN, 1992).

Van Gaal et al. (2001) e Descamps et al. (2003) sugeriram que, apesar do fenótipo similar da HF, pacientes que portam mutações sugestivas da doença podem ter maior risco de DAC do que os pacientes sem essas mutações.

Pacientes HF heterozigotos que herdaram duas cópias defeituosas do gene LDLR podem se comportar como homozigotos, aumentando até cinco vezes o risco de doença arterial coronariana em estágios precoces da vida (GOLDSTEIN; HOBBS; BROWN, 1995; VAN DE KERKHOF et al., 2003). Pacientes heterozigotos portadores de diferentes mutações no gene LDLR, apresentam correlações genotípicas-fenotípicas como no exemplo de mutações *frameshift*, que estão mais associadas aos altos níveis de LDL-colesterol do que as mutações tipo *missense* (GRAHAM et al., 1999).

Nos casos onde não são detectadas mutações em nível de c.DNA, então é sugerida a análise do RNA mensageiro, porque as variações de sequência ocorridas nas regiões dos introns do gene LDLR podem provocar uma redução da eficiência do *splicing* do RNA

mensageiro (AMSELLEM et al., 2002; COOPER; KRAWCZAK, 1993; WEBB et al., 1996) com conseqüências prejudiciais para a sua estabilidade funcional (ROSS, 1988).

A maior parte das novas mutações descritas no presente estudo ocorreram nas regiões intrônicas, devido a dois fatores principais. Primeiro, o seqüenciamento direto do DNA com a utilização de novos conjuntos de *primers* têm permitido o rastreamento dessas regiões em uma extensão maior. Segundo, espera-se a detecção de um número maior de mutações nas regiões intrônicas, em comparação à região promotora e à região codificadora, já que seriam seletivamente neutras, com exceção daquelas situadas em regiões consenso envolvidas diretamente no processo de *splicing*. Estima-se que mutações nos sítios de *splicing* corresponderiam à aproximadamente 15% das mutações causadoras de doenças em humanos (AMSELLEM et al., 2002).

Amsellem et al. (2002) em um estudo com pacientes franceses com HF observaram que mutações situadas fora das regiões doadoras e aceptoras de *splicing* podem exercer um efeito regulatório na expressão gênica, como por exemplo, na ativação de sítios crípticos de *splicing* ou na alteração parcial da eficiência do *splicing*. Portanto, estas mutações podem se constituir em fatores causadores da HF, mesmo que não localizados nas junções exon-intron.

Na Tabela 9, as oito mutações intrônicas identificadas nesse estudo, foram comparadas com as 58 descritas (HGMD, 2005) em cada um desses introns, quanto à localização e tipo de população.

Tabela 9 – Mutações descritas/não descritas em introns e região 3' não traduzida (3'UTR) da amostra por população

Intron	Mutação	População	Referência/HGMD
6	IVS6+36G>A	portuguesa#	Presente estudo
6	IVS6+171G>A	portuguesa#	Presente estudo
6	IVS6-39C>T	espanhola	Mozas et al. (2004)
6	IVS6-4G>A	sul-africana	Loubser et al. (1999)
6	IVS6-2A>G	francesa	Amsellem et al. (2002)
11	IVS11+56C>T	espanhola#	Presente estudo ^a
11	IVS11-69G>T	espanhola#	Presente estudo ^a
11	IVS11-55A>C	portuguesa#	Presente estudo ^b
11	IVS11+1G>C	japonesa	Hattori et al. (2002)
11	IVS11+1G>A	dinamarquesa	Jenzen et al. (1999)
11	IVS11+1G>T	norueguesa	Leren et al. (1995)
11	IVS11-10G>A	espanhola	Cenarro et al. (1998)
11	IVS11-1G>T	chinesa	Mak et al. (1998)
15	IVS15+1G>A	italiana	Lelli et al. (1995)
15	IVS15-136A>G	portuguesa#	Presente estudo
15	IVS15+2T>G	francesa	Amsellem et al. (2002)
15	IVS15-3C>A	italiana(sul)	Liguori et al. (2001)
16	IVS16+46C>T	italiana e portuguesa#	Presente estudo ^a
16	IVS16+1G>A	italiana	Bertolini et al. (1999)
16	IVS16+1G>T	holandesa	Lombardi et al. 1993)
16	IVS16+4G>A	espanhola	Mozas et al. (2004)
16	IVS16-2A>G	holandesa	Lombardi et al. (1993)
16	IVS16-1G>C	espanhola	Cenarro et al. (1998)
17	IVS17-42A>G	letoniana#	Presente estudo ^a
17	IVS17-12A>G	dinamarquesa	Nissen et al. (1996)
	3'UTR(*52G>A)	portuguesa#	Presente estudo ^b
	3'UTR(*105T>G)	letoniana#	Presente estudo
	3'UTR(*141G>A)	portuguesa#	Presente estudo ^a

^a Previamente descritas em franceses por Amsellem et al. (2002)

^b Previamente descritas em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>

etnia com maior frequência da mutação

HGMD (2005)

Os pacientes nº 11 (português) e nº 23 (italiano), individualmente, foram os portadores do maior número de mutações (10), seguidos pelos pacientes nº 3 (espanhol), nº 5 (italiano) e nº 35 (italiano) com um número de 7 mutações cada um, perfazendo em relação ao total de mutações identificadas, uma frequência da ordem de 66% e 46% respectivamente (ANEXO F).

Notavelmente, poucas mutações nos introns que estão fora das junções exon-introns de quaisquer genes têm sido descritas como causa de desordens genéticas humanas. Elas ocorrem em seqüências intrônicas altamente conservadas nas proximidades dos locais dos sítios doador e aceitor de *splicing* (AMSELLEM et al., 2002; COOPER; KRAWCZAK, 1993; KRAWCZAK; REISS; COOPER, 1992). A atual estratégia de *screening* genômico usando novos *primers* que franqueiam a seqüência intrônica, melhorou

significativamente a detecção de mutações causadoras da doença nos pacientes com HF. Em metade dos pacientes estudados por Amsellem et al. (2002), que portavam mutações, elas não foram detectadas usando técnicas com DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) e seqüenciamento do DNA com *primers* usuais. Inocêncio (2003), realizou uma análise de predição de criar sítios alternativos nos introns que poderiam afetar o processamento normal do RNA mensageiro, através de programas computacionais específicos para esses sítios (MOLQUEST, 2005-2006). A criação de um local a mais de *splicing* no segmento central do intron do gene LDLR deveria ser outra causa da doença. Recentemente, tal mutação intrônica resultou na inclusão aberrante de um pseudoexon no gene DMD (Distrofia Muscular de Duchenne) responsável pelos sintomas clínicos da doença (TUFFERY-GIRAUD et al., 2003). Portanto, os procedimentos de *screening* para a detecção de variações na seqüência do DNA não poderiam omitir as mutações intrônicas. Amsellem et al. (2002), mostraram que as repetições *Alu* representam 65% das seqüências intrônicas do gene LDLR, das quais 85% estão distantes das junções exon-intron. Considerando a hipótese de que esse grande número de repetições *Alu* favoreceria a ocorrência de muitos *crossing-over* desiguais e grandes rearranjos no gene do LDLR, é plausível que o surgimento de novas mutações que geram um determinado grau de variabilidade na sua seqüência de DNA podem ser favorecidas, na medida em que “protegem” o gene da ocorrência de novos eventos de recombinação.

Quanto às mutações na região 3'UTR (*untranslated region*) que foram identificadas após o exon 18, a *141G>A e a *52G>A já foram previamente mencionadas em <http://www.ucl.ac.uk/fh>, esta última, também por Inocêncio (2003). Estas mutações juntamente com a *105T>G, ainda não descrita, deverão ser criticamente avaliadas por meio de estudos de alterações do RNA mensageiro. Jensen et al. (1996a, 1996b) e Dedoussis et al. (2003) indicaram a necessidade da avaliação funcional das mutações na

região 3'UTR (*untranslated region*) igualmente como as mutações situadas na região promotora e em junções do sítio de *splicing*.

Cotton e Scriver (1998) sugeriram critérios para definir se uma determinada mutação modifica o fenótipo, levando ao surgimento de uma dada doença, ou se trata de uma variação neutra e comum na população (polimorfismo). De acordo com a utilidade e acessibilidade, poderão ser escolhidos critérios como a análise do tipo de mutação, a região e o tamanho da sequência analisada, a análise de segregação fenotípica, o aminoácido afetado, a prevalência de tal mutação, a análise de expressão (funcional) e a importância relativa do tipo de mutação. No presente estudo, possíveis erros e ambigüidades foram minimizados pela purificação dos fragmentos amplificados por PCR. A conferência manual das bases identificadas no cromatograma, permitiu excluir o exon 3 pela má qualidade do sequenciamento, cujas variações poderiam ser confundidas com artefato, assim como nos exons 5, 7 e 8 não foram identificadas mutações, porque as bases foram conferidas manualmente uma a uma.

Outra possível causa de erro encontra-se na análise de uma pequena região do gene de interesse para identificar mutações associadas a determinadas doenças (análise de exons específicos). No entanto, um alelo mutante pode não ser o responsável pelo surgimento da doença, mas estar próximo ao alelo de interesse que deixou de ser analisado. Assim, preconiza-se a análise de todo o gene ou a sua maior região possível (COTTON; SCRIVER, 1998). No presente estudo, a maior parte do gene LDLR foi examinada, incluindo a região intrônica (dos exons 3 à região 3'UTR).

O critério da análise de segregação familiar se caracteriza pela comparação dos indivíduos afetados com os familiares não afetados. Como a HF é uma doença autossômica dominante, se uma determinada mutação causa esta doença, ela sempre estará presente nos indivíduos afetados e ausente nos familiares não afetados.

Além disso, a mutação deve ser analisada em indivíduos normolipêmicos da população de origem dos pacientes com HF. Da mesma forma, se a mutação causa a HF, ou está intimamente relacionada a esta patologia, sua frequência deve ser nula ou muito inferior àquela observada nos pacientes com HF. Como exemplo, a mutação T705I (FH-Paris 9) foi primeiramente descrita como uma mutação que causava a HF (HOBBS; BROWN; GOLDSTEIN, 1992). Estudos posteriores demonstraram que esta mutação também ocorre em indivíduos normocolesterolêmicos (LOMBARDI et al., 1997).

Atualmente, dispomos de sessenta e seis amostras de familiares de primeira e segunda gerações dos casos-índices para avaliação das mutações detectadas nos pacientes com HF.

Como este é o primeiro estudo das bases moleculares da HF realizado no Rio Grande do Sul, as 15 mutações identificadas requerem, nos próximos trabalhos, a análise de expressão (alteração do fenótipo), a mensuração da atividade biológica e a análise de segregação com a sua prevalência em normolipêmicos, de acordo com os critérios de Cotton e Scriver (1998).

Para a determinação do fenótipo correspondente, devem estar implicados fatores ambientais e outros genes como o gene CETP (*cholesteryl ester transfer protein*), o gene LPL (*lipoprotein lipase*), o gene da apolipoproteína E e, recentemente, o gene PCSK9. As mutações nesses genes poderiam explicar a manifestação clínica da doença em dois dos casos-índices desse estudo, nos quais não foram encontradas mutações no gene LDLR.

Embora tenha sido o primeiro estudo genético das HF no Rio Grande do Sul, o não seqüenciamento da região promotora, exons 1 e 2 do gene LDLR, a falta da análise funcional das mutações encontradas e hábitos de vida desses pacientes, podem ser considerados os fatores da sua limitação. E, ainda, essas mutações preliminarmente

identificadas no Rio Grande do Sul, nos remetem a questões como a dificuldade de diferenciação entre variantes comuns (polimorfismos) e mutações causadoras da doença.

Assim, diante dessa heterogeneidade de mutações e, provavelmente, também de genes que causam a HF no Brasil, sua base molecular deve continuar sendo investigada para explicar melhor a transmissão de caracteres da HF em mais de 7% dos brasileiros dislipidêmicos (WHO, 1999) e sua expressão fenotípica no Rio Grande do Sul, que detém uma das mais altas taxas de mortalidade por DAC do Brasil.

CONCLUSÃO

A bases moleculares da HF no Rio Grande do Sul, Brasil, foram caracterizadas em nossa amostra pela identificação de 3 mutações ainda não descritas em regiões codificadoras (exon 4/D115D; exon11/P518L; exon 15/D727G), 4 mutações intrônicas não descritas (IVS6+36G>A, IVS6+171G>A, IVS15-136A>G, IVS17-42A>G) e 1 mutação ainda não descrita na região 3' não traduzida (3'UTR) (*105T>G).

A análise funcional desses sítios mutantes, bem como sua análise de segregação, permitirão explicar melhor a expressão fenotípica da HF no Rio Grande do Sul.

REFERÊNCIAS

1. ABIFADEL, M.; VARRET, M.; RABES, J. P.; ALLARD, D.; OUGUERRAM, K.; DEVILLERS, M.; CRUAUD, C.; BENJANNET, S.; WICKHAM, L.; ERLICH, D.; DERRÉ, A.; VILLÉGER, L.; FARNIER, M.; BEUCLER, I.; BRUCKERT, E.; CHAMBAZ, J.; CHANU, B.; LACERF, J-M.; LUC, G.; MOULIN, P.; WEISSENBAACH, J.; PRAT, A.; KREMPF, M.; JUNIEN, C.; SEIBAH, NG.; BOILEAU, C. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. **Nat. Genet.**, New York, v. 34, n. 2, p. 154-6, 2003.
2. ALBERTO, F. L.; FIGUEIREDO, M. S.; ZAGO, M. A.; ARAÚJO, A. G.; DOS-SANTOS, J. E. The Lebanese mutation as an important cause of familial hypercholesterolemia in Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 32, n. 6, p. 739-45, 1999.
3. AMSELLEM, S.; BRIFFAUT, D.; CARRIÉ, A.; RABÈS, J. P.; GIRARDET, J. P.; FREDENRICH, A.; MOULIN, P.; KREMPF, M.; REZNIK, Y.; VIALETES, B.; DE-GENNES, JL.; BRUKERT, E.; BENLIAN, P. Intronic mutations outside of Alu-repeat-rich domains of the LDL receptor gene are a cause of familial hypercholesterolemia. **Hum. Genet.**, Berlin, v. 111, n. 6, p. 501-10, 2002.
4. ANDERSON, K. M.; CASTELLI, W. P.; LEVY, D. Cholesterol and mortality. 30 years of follow-up from the Framingham study. **JAMA**, Chicago, v. 257, n. 16, p. 2176-80, 1987.
5. ANITSCHKOW, N. Über die veränderungen der kaninchenaorta bei experimenteller cholesterinsteatose. **Beitr. Pathol. Anat. Allg.**, Stuttgart, v. 56, p. 379-404, 1913.
6. ARCA, M.; JOKINEN, E. Low density lipoprotein receptor mutations in a selected population of individuals with moderate hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 136, n. 1, p. 187-94, 1998.
7. BERG, K. Genetics of coronary heart disease. **Prog. Med. Genet.**, New York, v. 5, p. 35-90, 1983.
8. BERTOLINI, S.; CASSANELLI, S.; GARUTI, R.; GHISELLINI, M.; SIMONE, M. L.; ROLLERI, M.; MASTRUSO, P.; CALANDRA, S. Analysis of LDL receptor gene mutations in Italian patients with homozygous familial hypercholesterolemia. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Baltimore, v. 19, n. 2, p. 408-18, 1999.
9. BIOBASE. Biological Databases. **HGMD® Human Gene Mutation Database**. Cardiff: The University/Institute of Medical Genetics, c2005. Available from: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=LDLR>. Access: 2006 Jul. 18.
10. BOER, J. M.; FESKENS, E. J.; SCHOUTEN, E. G.; HAVEKES, L. M.; SEIDELL, J. C.; KROMHOUT, D. Lipid profiles reflecting high and low risk for coronary heart disease: contribution of apolipoprotein E polymorphism and lifestyle. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 136, n. 2, p. 395-402, 1998.

11. BORIGHT, A. P.; CONNELLY, P. W.; BRUNT, J. H.; MORGAN, K.; HEGELE, R. A. Association and linkage of LDLR gene variation with variation in plasma low density lipoprotein cholesterol. **J. Hum. Genet.**, Tokyo, v. 43, n. 3, p. 153-9, 1998.
12. BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Receptor mediated control of cholesterol metabolism. **Science**, Washington, v. 191, 4223, p. 150-7, 1976.
13. CENARRO, A.; JENSEN, H. K.; CASAO, E.; CIVEIRA, F.; GONZÁLEZ-BONILLO, J.; RODRÍGUEZ-REY, J. C.; GREGERSEN, N.; POCOVI, M. Identification of recurrent and novel mutations in the LDL receptor gene in Spanish patients with familial hypercholesterolemia. **Hum. Mutat.**, New York, v. 11, n. 5, p. 413, 1998.
14. COOPER, D. N.; KRAWCZAK, M. Splice site mutations. In: _____. **Human gene mutation**. Oxford: BIOS, 1993. p. 239-60.
15. COTTON, R. G. H.; SCRIVER, C. R. Proof of “disease causing” mutation. **Hum. Mutat.**, Melbourne, v. 12, p. 1-3, 1998. Special article.
16. DAVIS, C. G.; GOLDSTEIN, J. L.; SÜDHOF, T. C.; ANDERSON, R. G.; BROWN, M. S. Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. **Nature**, London, v. 326, n. 6115, p. 760-5, 1987.
17. DE FAIRE, U. Ischaemic heart disease in death discordant twins. A study on 205 male and female pairs. **Acta Med. Scand. Suppl.**, Stockholm, v. 568, p. 1-109, 1974.
18. DEDOUSSIS, G. V.; GENSCHER, J.; BOCHOW, B.; PITSAVOS, C.; SKOUMAS, J.; PRASSA, M.; LKHAGVASUREN, S.; TOUTOUZAS, P.; VOGT, A.; KASSNER, U.; THOMAS, H-P.; SCHMIDT, H. Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in German and Greek patients. **Hum. Mutat.**, New York, v. 23, n. 3, p. 285-6, 2004.
19. DEDOUSSIS, G. V.; PITSAVOS, C.; KELBERMAN, D.; SKOUMAS, J.; PRASSA, M. E.; CHOUMERIANOU, D. M.; STEFANADIS, C.; HUMPHRIES, SE.; TOUTOUZAS, P. FH-Pyrgos: a novel mutation in the promoter (-45del T) of the low-density lipoprotein receptor gene associated with familial hypercholesterolemia. **Clin. Genet.**, Copenhagen, v. 64, n. 5, p. 414-9, 2003.
20. DEN DUNNEN, J. T.; ANTONARAKIS, S. E. Nomenclature for the description of human sequence variations. **Hum. Genet.**, Berlin, v. 109, n. 1, p. 121-4, 2001.
21. DESCAMPS, O. S.; GILBEAU, J. P.; LUWAERT, R.; HELLER, F. R. Impact of genetic defects on coronary atherosclerosis in patients suspected of having familial hypercholesterolaemia. **Eur. J. Clin. Invest.**, Berlin, v. 33, n. 1, p. 1-9, 2003.
22. ENCICLOPÉDIA Rio-Grandense: Alemã. Canoas: Regional, 1958a. v. 1, p. 77-108.
23. ENCICLOPÉDIA Rio-Grandense: Espanhola. Canoas: Regional, 1958b. v. 5, p. 210-40.
24. ENCICLOPÉDIA Rio-Grandense: Italiana. Canoas: Regional, 1958c. v. 1, p. 127-40.
25. ENCICLOPÉDIA Rio-Grandense: Letoniana. Canoas: Regional, 1958d. v. 5, p. 283-92.
26. ENCICLOPÉDIA Rio-Grandense: Polonesa. Canoas: Regional, 1958e. v. 5, p. 3-103.

27. ENCICLOPÉDIA Rio-Grandense: Portuguesa. Canoas: Regional, 1958f. v. 5, p. 117-25.
28. EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res.**, Cold Spring Harbor, v. 8, n. 3, p. 186-94, 1998.
29. EWING, B.; HILLER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res.**, Cold Spring Harbor, v. 8, n. 3, p. 175-85, 1998.
30. FIGUEIREDO, M. S.; DOS SANTOS, J. E.; ALBERTO, F. L.; ZAGO, M. A. High frequency of the Lebanese allele of the LDLr gene among Brazilian patients with familial hypercholesterolemia. **J. Med. Genet.**, London, v. 29, n. 11, p. 813-5, 1992.
31. FRANCKE, U.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Assignment of the human gene for the low density lipoprotein receptor to chromosome 19: synteny of a receptor, a ligand, and a genetic disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v. 81, n. 9, p. 2826-30, 1984.
32. GENEST, J. J. JR; MARTIN-MUNLEY, S. S.; MCNAMARA, J. R.; ORDOVAS, J. M.; JENNER, J.; MYERS, R. H.; SILBERMAN, SR.; WILSON, PW.; SALEM, DN.; SCHAEFER, EJ. Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. **Circulation**, Hagerstown, v. 85, n. 6, p. 2025-33, 1992.
33. GENOME DATA MINING (GMD). Ribeirão Preto: USP/Faculdade de Medicina, 2006. Disponível em: http://gdm.fmrp.usp.br/cgi-bin/snpi/index.pl?template_file=index. Acesso em: 19 jul. 2006.
34. GILBERT, W. Genes-in-pieces revisited. **Science**, Washington, v. 228, n. 4701, p. 823-4, 1985.
35. GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S.; ANDERSON, R. G.; RUSSEL, D. W.; SCHNEIDER, W. J. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. **Annu. Rev. Cell. Biol.**, Palo Alto, v. 1, p. 1-39, 1985.
36. GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Molecular medicine. The cholesterol quartet. **Science**, Washington, v. 292, n. 5520, p. 1310-2, 2001.
37. GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. **J. Lipid Res.**, Memphis, v. 25, n. 13, p. 1450-61, 1984.
38. GOLDSTEIN, J. L.; HOBBS, H.; BROWN, M. S. Familial hypercholesterolemia. In: SCRIVER, C. R.; SLY, W. S.; BEAUDET, A. L.; VALLE, D. (Eds.). **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995. p. 1981-2030.
39. GRAHAM, C. A.; MCCLEAN, E.; WARD, A. J.; BEATTIE, E. D.; MARTIN, S.; O'KANE, M.; YOUNG, IS.; NICHOLLS, DP. Mutation screening and genotype:phenotype correlation in familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 147, n. 2, p. 309-16, 1999.
40. GUIMARÃES, A. C.; LIMA, M.; MOTA, E.; LIMA, J. C.; MARTINEZ, T.; CONTI FILHO, A.; PAES, J. N.; BERTOLAMI, M.; LION, M. F.; MARANHÃO, M.; DA-SILVA, O. F.; BODANEZE, L. C.; DIAS, G. C.; MACEDO, V.; ALFIUME NETO, A. The cholesterol level of a selected level of a selected brazilian salaried population: biological and socioeconomic influences. **Cardiovasc. Dis. Prev.**, v. 1, p. 306-17, 1998.

41. HARVALD, B.; HAUGE, M. Hereditary factors elucidated by twins studies. In: NEEL, J. V.; SHAW, M. W.; SCHULL, W. J. (Eds.). **Genetics and epidemiology of chronic disease**. Washington: US Department of Health, Education and Welfare, 1965. p. 61-7.
42. HATTORI, H.; HIRAYAMA, T.; NOBE, Y.; NAGANO, M.; KUJIRAOKA, T.; EGASHIRA, T.; ISHII, J.; TSUJI, M.; EMI, M. Eight novel mutations and functional impairments of the LDL receptor in familial hypercholesterolemia in the north of Japan. **J. Hum. Genet.**, Tokyo, v. 47, n. 2, p. 80-7, 2002.
43. HOBBS, H. H.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. **Hum. Mutat.**, New York, v. 1, n. 6, p. 445-66, 1992.
44. HOBBS, H. H.; LEITERSDORF, E.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S.; RUSSEL, D. W. Multiple crm-mutations in familial hypercholesterolemia. Evidence for 13 alleles, including four deletions. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v. 81, n. 3, p. 909-17, 1988.
45. HUMAN GENOME VARIATION SOCIETY. **Nomenclature for the description of sequence variations**. Melbourne: The Society, c2002. Available from: <http://www.hgvs.org/mutnomen/codon.html#aalist>. Access: 2006 Jul 18.
46. INOCÊNCIO, M. T. **Análise de mutações associadas ao gene do receptor de LDL em pacientes com hipercolesterolemia familiar**. 2003. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.
47. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Séries estatísticas retrospectivas**. Rio de Janeiro: IBGE, 1986. v. 1.
48. JENSEN, H. K.; JENSEN, L. G.; MEINERTZ, H.; HANSEN, P. S.; GREGERSEN, N.; FAERGEMAN, O. Spectrum of LDL receptor gene mutations in Denmark: implications for molecular diagnostic strategy in heterozygous familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 146, n. 2, p. 337-44, 1999.
49. JENSEN, L. G.; JENSEN, H. K.; HEATH, F.; EIBERG, H.; KJELDSSEN, M.; FAERGEMAN, O.; KOLVRAA, S.; BOLUND, L.; GREGERSEN, N. Allele-specific measurement of low-density lipoprotein receptor transcript levels. **Hum. Mutat.**, New York, v. 8, n. 2, p. 126-33, 1996c..
50. JENSEN, L. G.; JENSEN, H. K.; NISSEN, H.; KRISTIANSEN, K.; FAERGEMAN, O.; BOLUND, L.; GREGERSEN, N. An LDL receptor promoter mutation in a heterozygous FH patient with dramatically skewed ratio between the two allelic mRNA variants. **Hum. Mutat.**, New York, v. 7, n. 1, p. 82-4, 1996d..
51. KANNEL, W. B.; CASTELLI, W. P.; GORDON, T.; MCNAMARA, P. M. Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham Study. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 74, n. 1, p. 1-12, 1971.
52. KASTELEIN, J. J.; ORDOVAS, J. M.; WITTEKOEK, M. E.; PIMSTONE, S. N.; WILSON, W. F.; GAGNE, S. E.; LARSON, MG.; SCHAEFER, EJ.; BOER, JM.; GERDES, C.; HAYDEN, MR. Two common mutations (D9N, N291S) in lipoprotein lipase: a cumulative analysis of their influence on plasma lipids and lipoprotein in men and women. **Clin. Genet.**, Copenhagen, v. 56, n. 4, p. 297-305, 1999.
53. KEYS, A.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H. W.; VAN BUCHEM, F. S.; BUZINA, R.; DJORDJEVIC, B. D.; DONTAS, AS; FIDANZA, F.; KARVONEN,

- MJ.; KIMURA, N.; LEKOS, D.; MONTI, M.; PUDDU, V.; TAYLOR, HL. Epidemiological studies related to coronary heart disease: characteristics of men aged 40-59 in seven countries. **Acta Med. Scand. Suppl.**, Stockholm, v. 460, p. 1-392, 1966.
54. KHACHADURIAN, A. K.; UTHMAN, S. M. Experiences with the homozygous cases of familial hypercholesterolemia. A report of 52 patients. **Nutr. Metab.**, Basel, v. 15, n. 1, p. 132-40, 1973.
 55. KIM, S. J.; KIM, J. E.; MOON, I. S. Paraquat induces apoptosis of cultured rat cortical cells. **Mol. Cells.**, Seoul, v. 17, n. 1, p. 102-7, 2004.
 56. KOTZE, M. J.; LANGENHOVEN, E.; WARNICH, L.; DU PLESSIS, L.; MARX, M. P.; OOSTHUIZEN, C. J.; RETIEF, AE. The identification of two low-density lipoprotein receptor gene mutations in South African familial hypercholesterolaemia. **S. Afr. Med. J.**, Cape Town, v. 76, n. 8, p. 399-401, 1989.
 57. KRAWCZAK, M.; REISS, J.; COOPER, D. N. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. **Hum. Genet.**, Berlin, v. 90, n. 1-2, p. 41-54, 1992.
 58. KUIVENHOVEN, J. A.; JUKEMA, J. W.; ZWINDERMAN, A. H.; DE KNIJFF, P.; MCPHERSON, R.; BRUSCHKE, A. V.; LIE, KI.; KASTELEIN, JJ. The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. The Regression Growth Evaluation Statin Study Group. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 338, n. 2, p. 86-93, 1998.
 59. LANGENHOVEN, E.; WARNICH, L.; THIART, R.; RUBINSZTEIN, D. C.; VAN DER WESTHUYZEN, D. R.; MARAIS, A. D.; KOTZE, M. Two novel point mutations causing receptor-negative familial hypercholesterolemia in South African Indian homozygote. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 125, n. 1, p. 111-9, 1996.
 60. LAROSA, J. C.; HUNNINGHAKE, D.; BUSH, D.; CRIQUI, M. H.; GETZ, G. S.; GOTTO, A. M. JR.; GRUNDY, SM.; RAKITA, L.; ROBERTSON, RM.; WEISFELDT, ML.; CLEEMAN, JI. The cholesterol facts. A summary of the evidence relating dietary fats, serum cholesterol, and coronary heart disease. A joint statement by the American Heart Association and the National Heart, Lung, and Blood Institute. The Task Force on Cholesterol Issues, American Heart Association. **Circulation**, Texas, v. 81, n. 5, p. 1721-33, 1990.
 61. LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 2ª ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839 p.
 62. LELLI, N.; GARUTI, R.; GHISELLINI, M.; TIOZZO, R.; ROLLERI, M.; AIMALE, V.; GINOCCHIO, E.; NASELLI, A.; BERTOLINI, S.; CALANDRA, S. Occurrence of multiple aberrantly spliced mRNAs of the LDL-receptor gene upon a donor splice site mutation that causes familial hypercholesterolemia (FHBenevento). **J. Lipid. Res.**, Memphis, v. 36, n. 6, p. 1315-24, 1995.
 63. LEREN, T. P.; SOLBERG, K.; RODNINGEN, O. K.; TONSTAD, S.; OSE, L. Two novel point mutations in the EGF precursor homology domain of the LDL receptor gene causing familial hypercholesterolemia. **Hum. Genet.**, Berlin, v. 96, n. 2, p. 241-2, 1995.
 64. LIGUORI, R.; BIANCO, A. M.; ARGIRIOU, A.; PAUCIULLO, P.; GIANNINO, A.; RUBBA, P.; SIMONE, V-D. LDL receptor cDNA sequence analysis in familial hypercholesterolemia patients: 5 novel mutations with high prevalence in families originating from southern Italy. **Hum. Mutat.**, New York, v. 17, n. 5, p. 433, 2001.

65. LILJEFORS, I. Coronary heart disease in male twins. Hereditary and environmental factors in concordant and discordant pairs. **Acta Med. Scand. Suppl.**, Stockholm, v. 511, p. 1-90, 1970.
66. LINDGREN, V.; LUSKEY, K. L.; RUSSEL, D. W.; FRANCKE, U. Human genes involved in cholesterol metabolism: chromosomal mapping of the loci for the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase with cDNA probes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v. 82, n. 24, p. 8567-71, 1985.
67. LOMBARDI, P.; HOFFER, M. J.; TOP, B.; DE WIT, E.; GEVERS LEUVEN, J. A.; FRANTS, R. R.; HAVEKES, LM. An acceptor splice site mutation in intron 16 of the low density lipoprotein receptor gene leads to an elongated, internalization defective receptor. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 104, n. 1-2, p. 117-28, 1993.
68. LOMBARDI, P.; SIJBRANDS, E. J. G.; KAMERLING, S.; LEUVEN, J. A. G.; HAVEKES, L. M. The T705I mutation of the low density lipoprotein receptor gene (FH Paris-9) does not cause familial hypercholesterolemia. **Hum. Genet.**, Leiden, v. 99, p. 106-9, 1997.
69. LOUBSER, O.; MARAIS, A. D.; KOTZE, M. J.; GODENIR, N.; THIART, R.; SCHOLTZ, C. L.; DE VILLIERS, JN.; HILLERMANN, R.; FIRTH, JC.; WEICH, HF.; MARITZ, F.; JONES, S.; VAN DER WESTHUYZEN, DR. Founder mutations in the LDL receptor gene contribute significantly to the familial hypercholesterolemia phenotype in the indigenous South Africa population of mixed ancestry. **Clin. Genet.**, Copenhagen, v. 55, n. 5, p. 340-5, 1999.
70. MAK, Y. T.; PANG, C. P.; TOMLINSON, B.; ZHANG, J.; CHAN, Y. S.; MAK, T. W.; MASAREI, JR. Mutations in the low-density lipoprotein receptor gene in Chinese familial hypercholesterolemia patients. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Baltimore, v. 18, n. 10, p. 1600-5, 1998.
71. MARTH, G. T.; KORF, I.; YANDELL, M. D.; YEH, R. T.; GU, Z.; ZAKERI, H. A.; STIZIEL, NO.; HILLIER, L.; KWOK, PY.; GISH, WR. A general approach to single-nucleotide polymorphism discovery. **Nat. Genet.**, New York, v. 23, n. 4, p. 452-6, 1999.
72. MARTINEZ, T. L.; SANTOS, R. D.; ARMAGANIJAN, D.; TORRES, K. P.; LOURES-VALE, A.; MAGALHÃES, M. E.; LIMA, JC.; MORIGUCHI, E.; AMODEO, C.; ORTIZ, J. National alert campaign about increased cholesterol: determination of cholesterol levels in 81,262 Brazilians. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 80, n. 6, p. 635-8, 2003.
73. MENOTTI, A.; LANTI, M.; PUDDU, P. E.; KROMHOUT, D. Coronary heart disease incidence in northern and southern European populations: a reanalysis of the seven countries study for a European coronary risk chart. **Heart**, London, v. 84, n. 3, p. 238-44, 2000.
74. MOHRENWEISER, H. W.; TSUJIMOTO, S.; GORDON, L.; OLSEN, A. S. Regions of sex-specific hypo- and hyper-recombination identified through integration of 180 genetic markers into the metric physical map of human chromosome 19. **Genomics**, San Diego, v. 47, n. 2, p. 153-62, 1998.
75. MOLQUEST. **Bioinformatics toolbox for analysis of biomedical data**. Mount Kisko: Softberry, c2005-2006. Available from: <http://www.molquest.com/molquest.phtml>. Access: 2006 Jul. 19.
76. MOZAS, P.; CASTILLO, S.; TEJEDOR, D.; REYES, G.; ALONSO, R.; FRANCO, M.; SAENZ, P.; FUENTES, F.; ALMAGRO, F.; MATA, P.; POCOVÍ, M.

- Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain: identification of 39 novel and 77 recurrent mutations in LDLR. **Hum. Mutat.**, New York, v. 24, n. 2, p. 187, 2004.
77. MULTIPLE RISK FACTOR INTERVENTION TRIAL RESEARCH GROUP. Risk factor changes and mortality results. **JAMA**, Chicago, v. 248, n. 12, p. 1465-77, 1982.
 78. NABEL, E. G. Cardiovascular disease. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 349, n. 1, p. 60-72, 2003.
 79. NAPOLI, C.; D'ARMIENTO, F. P.; MANCINI, F. P.; POSTIGLIONE, A.; WITZTUM, J. L.; PALUMBO, G.; PALINSKI W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v. 100, n. 11, p. 2680-90, 1997.
 80. NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP). Executive summary of the third report of expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III). **JAMA**, Chicago, v. 285, n. 19, p. 2486-97, 2001.
 81. NICKERSON, D. A.; TOBE, V. O.; TAYLOR, S. L. PolyPhred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 25, n. 14, p. 2745-51, 1997.
 82. NISSEN, H.; GULDBERG, P.; HANSEN, A. B.; PETERSEN, N. E.; HORDER, M. Clinically applicable mutation screening in familial hypercholesterolemia. **Hum. Mutat.**, New York, v. 8, n. 2, p. 168-77, 1996.
 83. NORA, J. J.; LORTSCHER, R. H.; SPANGLER, R. D.; NORA, A. H.; KIMBERLING, W. J. Genetic: epidemiologic study of early-onset ischemic heart disease. **Circulation**, Dallas, v. 61, n. 3, p. 503-8, 1980.
 84. NUSSBAUM, R. L. Thompson & Thompson genética médica. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 387 p.
 85. OMIM Online Mendelian Inheritance in Man. Bethesda: The National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2005. LDLR gene mutations. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>. Access: 2005 Aug 12.
 86. RIFAI, N.; BACHORIK, P. S.; ALBERS, J. J. Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. (Eds.). Tietz textbook of clinical chemistry. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1999. p. 809-61.
 87. RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Saúde. **Prevalência de fatores de risco para a doença arterial coronariana no estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: A Secretaria, 2003. Disponível em: http://www.saude.rs.gov/cronicos_degenerativos/documentos/pesquisa.pdf. Acesso em: 18 jul. 2006.
 88. RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Saúde. **Evolução da mortalidade proporcional por principais grupos de causas Rio Grande do Sul, 1998 a 2002**. Porto Alegre: A Secretaria, 2006. Disponível em: http://www.saude.rs.gov.br/documentos/evolucao_mortalidade12.pdf. Acesso em: 19 jul. 2006.
 89. ROBBINS, S. L.; CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Patologia estrutural e funcional. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1277 p.

90. ROSS, J. Messenger RNA turnover in eukaryotic cells. **Mol. Biol. Med.**, London, v. 5, n. 1, p. 1-14, 1988.
91. SALAZAR, L. A.; CAVALLI, S. A.; HIRATA, M. H.; DIAMENT, J.; FORTI, N.; GIANNINI, S. D.; NAKANDAKARE, ER.; BERTOLAMI, MC.; HIRATA, RDC. Polymorphisms of the low-density lipoprotein receptor gene in brazilian individuals with heterozygous familial hypercholesterolemia. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 11, p. 1301-4, 2000.
92. SALAZAR, L. A.; HIRATA, M. H.; CAVALLI, S. A.; NAKANDAKARE, E. R.; FORTI, N.; DIAMENT, J.; GIANNINI, SD.; BETOLAMI, MC.; HIRATA, RD. Molecular basis of familial hypercholesterolemia in Brazil: identification of seven novel LDLR gene mutations. **Hum. Mutat.**, New York, v. 19, n. 4, p. 462-3, 2002.
93. SCHMIDT, H.; KOSTNER, G. M. Familial hypercholesterolemia in Austria reflects the multi-ethnic origin of our country. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 148, n. 2, p. 431-2, 2000.
94. STRONG, J. P.; MALCOM, G. T.; MCMAHAN, C. A.; TRACY, R. E.; NEWMAN, W. P. 3RD.; HERDERICK, E. E.; CORNHILL, JF. Prevalence and extend of atherosclerosis in adolescents and young adults: implications for prevention from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Study. **JAMA**, Chicago, v. 281, n. 8, p. 727-35, 1999.
95. SÜDHOF, T. C.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S.; RUSSEL, D. W. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. **Science**, Washington, v. 228, n. 4701, p. 815-22, 1985.
96. THOMPSON, G. R. Screening relatives of patients with premature coronary heart disease. **Heart**, London, v. 87, n. 4, p. 390-4, 2002.
97. TOLLESHAUG, H.; GOLDSTEIN, J. L.; SCHNEIDER, W. J.; BROWN, M. S. Posttranslational processing of the LDL receptor and its genetic disruption in familial hypercholesterolemia. **Cell**, Cambridge, v. 30, n. 3, p. 715-24, 1982.
98. TOLLESHAUG, H.; HOBGOOD, K. K.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: multiple mutations disrupt transport and processing of a membrane receptor. **Cell**, Cambridge, v. 32, n. 3, p. 941-51, 1983.
99. TONSTAD, S.; JOAKIMSEN, O.; STENSLAND-BUGGE, E.; LEREN, T. P.; OSE, L.; RUSSELL D.; BONAA, KH. Risk factors related to carotid intima-media thickness and plaque in children with familial hypercholesterolemia and control subjects. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Baltimore, v. 16, n. 8, p. 984-91, 1996.
100. TUFFERY-GIRAUD, S.; SAQUET, C.; CHAMBERT, S.; CLAUSTRES, M. Pseudoxon activation in the DMD gene as a novel mechanism for Becker muscular dystrophy. **Hum. Mutat.**, New York, v. 21, n. 6, p. 608-14, 2003.
101. UMANS-ECKENHAUSEN, M. A.; SIJBRANDS, E. J.; KASTELEIN, J. J.; DEFESCHE, J. C. Low-density lipoprotein receptor gene mutations and cardiovascular risk in a large genetic cascade screening population. **Circulation**, Dallas, v. 106, n. 24, p. 3031-6, 2002.
102. UNIVERSITY OF WASHINGTON. Genome Science Department. Laboratory of Phil Green. **Phred, phrap, consed**. Washington: The University, 1993-1996. Available from: <http://www.phrap.org/>. Access: 2006 Jul. 19.

103. VAN DALEN, D. B.; MEYER, W. J. Estrategia de la investigación descriptiva. In: _____. **Manual de técnica de la investigación educacional**. Buenos Aires: Paidós, 1979. p. 226-66.
104. VAN DE KERKHOF, L.; VAN EIJK, S. J.; DEFESCHE, J. C.; DOS SANTOS, J. E. Identification of a new mutation, S305C, in exon 7 of the low-density lipoprotein receptor gene in a Brazilian family with homozygous familial hypercholesterolemia. **Genet. Test.**, Larchmont, v. 7, n. 1, p. 77-9, 2003.
105. VAN GAAL, L. F.; PEETERS, A. V.; DE BLOCK, C. E.; DE LEEUW, I. H.; THIART, R.; KOTZE, M. J. Low-density lipoprotein receptor gene mutation analysis and clinical correlation in Belgian hypercholesterolemics. **Mol. Cell. Probes.**, London, v. 15, n. 6, p. 329-36, 2001.
106. WEBB, J. C.; PATEL, D. D.; SHOULDERS, C. C.; KNIGHT, B. L.; SOUTAR, A. K. Genetic variation at a splicing branch point in intron 9 of the low density lipoprotein (LDL)-receptor gene: a rare mutation that disrupts mRNA splicing in a patient with familial hypercholesterolemia and a common polymorphism. **Hum. Mol. Genet.**, Oxford, v. 5, n. 9, p. 1325-31, 1996.
107. WENDELHAG, I.; WIKLUND, O.; WIKSTRAND, J. Arterial wall thickness in familial hypercholesterolemia: ultrasound measurement of intima-media thickness in the common carotid artery. **Arterioscler. Thromb.**, Dallas, v. 12, n. 1, p. 70-7, 1992.
108. WILLIAMS, R. R.; HUNT, S. C.; HEISS, G.; PROVINCE, M. A.; BENSON, J. T.; HIGGINS, M.; CHAMBERLAIN, RM.; WARE, J.; HOPKINS, PN. Usefulness of cardiovascular family history data for population-based preventive medicine and medical research (the Health Family Tree Study and the NHLBI Family Heart Study). **Am. J. Cardiol.**, New York, v. 87, n. 2, p. 129-35, 2001.
109. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Raised lipids**. Geneva: The Organization, 2006. Available from: http://www.who.int/ncd_surveillance/infobase/web/surf2/html_files/PAHO/Brazil.pdf. Access: 2006 Jul 19.
110. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Familial hypercholesterolaemia (FH). Report of a second WHO consultation. Geneva, 4 September 1998. Geneva: The Organization, 1999. Available from: http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/WHO_HGN_FH_CONS_99.2.pdf. Access: 2006 Jul. 19.
111. YAMAMOTO, T.; DAVIS, C. G.; BROWN, M. S.; SCHNEIDER, W. J.; CASEY, M. L.; GOLDSTEIN, J. L.; RUSSELL, DW. The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. **Cell**, Cambridge, v. 39, n. 1, p. 27-38, 1984.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Extração de DNA

Kit: Super Quik-Gene-DNA Isolation Kit

Componentes do Kit

>160 ml de 10x RBC Lysis Buffer

>150 ml WBC Lysis Buffer

>20 ml 10% SDS

>50 ml Protein Precipitating Reagent

Procedimentos:

- 1- Descongelar bem o sangue que já deverá estar em tubo cônico (Falcon – 15 ml), caso o sangue ainda esteja em tubo de coleta, centrifugá-lo à 2.000 rpm por 10 minutos;
- 2- Acrescentar 10 ml do tampão de lise de glóbulos [1X] (O RBC Lysis Buffer-deve ser diluído e preparado no momento do uso, em seguida manter em gelo);
Obs.: o volume do tampão pode variar de 0,7 a 10,0 ml de acordo com o volume de sangue total.
- 3- Homogeneizar durante 15 minutos;
- 4- Centrifugar a 2.500 rpm/20 minutos;
- 5- Desprezar o sobrenadante;
- 6- Acrescentar novamente o tampão de lise de glóbulos vermelhos (podendo variar de 7,0 a 10,0 ml do tampão);
- 7- Homogeneizar durante 15 minutos;
- 8- Centrifugar a 2.500 rpm/20 minutos;
- 9- Desprezar o sobrenadante, tomando cuidado de limpar a borda com papel absorvente (um para cada amostra);
Obs.: se necessário, fazer mais lavagens com o tampão de lise de glóbulos vermelhos antes de prosseguir com a técnica.
- 10- Adicionar 1,5 ml do tampão de lise de glóbulos brancos (WBC Lysis Buffer);
- 11- Misturar bem no Vórtex;
- 12- Colocar em banho-maria a 55°C durante 30 minutos;
- 13- Acrescentar 200 microlitros de SDS 10%;
- 14- Acrescentar 500 microlitros de Reagente Precipitante de Proteínas;
- 15- Agitar vigorosamente por 30 segundos;
- 16- Incubar em banho-maria a 55°C durante 25 minutos;
- 17- Centrifugar a 2.500 rpm/20 minutos;
- 18- Transferir todo o sobrenadante límpido para um tubo cônico Falcon de 15 ml com o auxílio de uma pipeta de Pasteur;
- 19- Adicionar Etanol Absoluto, na proporção de duas vezes o volume do sobrenadante;
- 20- Misturar por inversões delicadas o tubo cônico onde está o DNA (precipitação);
- 21- “Pescar” o DNA e colocá-lo em um Eppendorf estéril de 1,5 ml devidamente identificado;
- 22- Fazer a diluição com água Milli-Q estéril. Aguardar a diluição total do DNA. Se necessário, deixar em geladeira *overnight*.
- 23- Estocar em freezer para a quantificação que, em tempo oportuno, será realizada em tubos de Eppendorf estéreis pipetando 1,0 ml de água deionizada com 5 microlitros de DNA.

APÊNDICE B: Reagentes utilizados para o 1º PCR

Reagentes	Volume por Reação	Volume por Placa
H2O Milli Q autoclavada	9,19 microL	900,62 microL
Buffer PCR 10X Invitrogen	1,50 microL	147,00 microL
DNTPs 1,25 Mm	1,50 microL	147,00 microL
MgCl ₂ 50 mM Invitrogen	0,45 microL	44,10 microL
Primer R ¹ 3,2 pmoles/microL	0,63 microL	61,74 microL
Primer R ² 3,2 pmoles/microL	0,63 microL	61,74 microL
Taq ³ Invitrogen 5 pmoles/microL	0,20 microL	19,60 microL

Colocar 168 microL do mix nos 8 primeiros poços e distribuir 14 microL para os demais poços. Colocar 1 microL da cultura de bactérias.

Ciclo:

95 °C - 3 min

95 °C - 40 seg >

60 °C - 40 seg > 35 ciclos

72 °C - 55 seg >

72 °C - 5 min

4 °C - infinito

¹ Primer Reverse (R)

² Primer Flanking (F)

³ Taq (*Thermus aquaticus*) microorganismos com habitat em fontes quentes, do qual é obtida uma DNA-polimerase termoestável entre 94 °C e 80 °C.

APÊNDICE C: Preparação da Placa para Eletroforese no Rol de Capilares do Sistema MegaBACE

H ₂ O	921,2 micro l
Premix ET	784,0 micro l
Primer R	156,8 micro l

Colocar 228 micro l do mix nos primeiros poços (dos 96 da placa) da 1ª fileira

Distribuir 19 micro l para os poços restantes da placa

Colocar 1 micro l do produto de 1º PCR

Condições:	95 °C - 2 seg }	1 vez
	95 °C - 10 seg }	35 vezes
	51 °C - 15 seg }	35 vezes
	60 °C - 1 seg }	35 vezes

APÊNDICE D: Conjunto do equipamento MegaBACE e Rol de capilares.**A – Conjunto do equipamento MegaBACE** **B) Rol de capilares**

ANEXOS

ANEXO A: Modelo de Identificação

[____/____/____]	[_____]	
Data	Município	
[_____]		[_____]
[____/____/____]		
Nome Completo	Sexo	Data
Nascimento		
[_____]		[_____]
[(____)_____]		
Endereço	CEP	Telefone
[_____]	[_____]	[_____]
Escolaridade	Profissão	Nº de Filhos
[_____]		
[_____]		
Nome do Doente da Família	Grau de Parentesco	

HISTÓRIA DA DOENÇA

[_____mg/dl]	
Taxa Máxima Colesterol	Medicação em Uso para o Colesterol
	Em Qual Parente?
[____] Verrugas nas pálpebras (olhos)	[_____]
[____] “Caroços” nos tendões dos músculos (mãos, braços, pernas)	[_____]
[____] Infarto	Idade [____] [_____]
[____] Safena/Angioplastia	Idade [____] [_____]
[____] Doença. Isquêmica Coração	Idade [____] [_____]
[____] AVC (“derrame”)	Idade [____] [_____]

ETNIA AUTO-RELATADA

[____] Portuguesa (brasileira)	[____] Polonesa	[____] Espanhola
[____] Açoriana	[____] Letoniana	[____] Uruguaia
[____] Indígena	[____] Austríaca	[____] Síria
[____] Afriana	[____] Romena	[____] Libanesa

ANEXO B: Termo de Consentimento Informado e Esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Termo de Consentimento Informado e Esclarecido

Autorizo o Médico Carlos Alberto Werutsky, doutorando do Curso de Clínica Médica dessa Faculdade, incluir-me na Pesquisa, cujos objetivos são de identificar o tipo de “traço” genético que desenvolve a doença familiar do colesterol.

Estou ciente que, para tanto, é necessário que cada participante:

- 1- responda aos questionários de identificação e de hábitos de vida;
- 2- doe 10 mililitros de sangue da veia do braço-antebraço, por técnica apropriada e idêntica ao exame de sangue (laboratorial) de rotina;
- 3- autorize a medida do colesterol total e suas frações, bem como a análise genética; e
- 4- fique disponível para a repetição dos mesmos se, eventualmente, for solicitado.

Nesta avaliação, os participantes não devem sentir nenhum desconforto, dor ou constrangimento, e devo ter a garantia de resposta a qualquer pergunta.

Os resultados dos exames de cada participante, onde consta a medida do colesterol total e suas frações e o tipo de “traço” genético da doença familiar do colesterol, serão entregues confidencialmente, sem nenhum custo (serão absorvidos pelo orçamento da Pesquisa), seguindo-se a orientação médica elucidativa para cada caso.

Caso tiver ainda mais perguntas sobre esta Pesquisa, posso chamar o pesquisador responsável no telefone (051)3342-0742 e, para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante desta Pesquisa ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar o orientador no telefone (016)602-2366.

Se por qualquer motivo pessoal, de saúde ou de não adequação, o participante tem a liberdade de abandonar a Pesquisa, sem prejuízo para si, bastando informar ao pesquisador.

Portanto, concordo que as informações provenientes de todos os testes a que fui submetido(a), sem minha identificação, possam ser usadas para esta Pesquisa científica, bem como sua publicação.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Compromisso.

Assinatura do Paciente

Nome

Data

Assinatura do Pesquisador

Nome

Data

Este Termo foi lido para _____ (nome do participante) em
____/____/____(data) pelo _____(nome do pesquisador ou seu auxiliar)
enquanto eu estava presente.

Assinatura da testemunha

Nome

Data

ANEXO C: Carta de Aprovação do Comitê de Ética

CEP. 14048-900
RIBEIRÃO PRETO - S.P.
BRASIL

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 08 de agosto de 2003

Ofício nº 2238/2003
CEP/SPC

PROCESSO HCRP nº 10303/2002

Prezado Senhor:

O Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 160ª Reunião Ordinária realizada em 04/08/2003, **analisou e aprovou a recomendação solicitada pela CONEP em Parecer nº 636/2003**, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado: **“AS BASES MOLECULARES DAS HIPERCOLESTEROLEMIAS FAMILIARES (HF) NO BRASIL: A REGIÃO SUL”**.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração:

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
CARLOS ALBERTO WERUTSKY
PROF. DR. JOSÉ ERNESTO DOS SANTOS (Orientador)
Depto. de Clínica Médica
Em mãos

Anexo D: Posição das Mutações nos Exons

-21	ATG GGG CCC TGG GGC TGG AAA TTG CGC TGG ACC GTC GCC TTG CTC	-7	
-6	CTC GCC GCG GCG GGG ACT GCA GTG//GGC GAC AGA TGT GAA AGA AAC	9	Exon 1
10	GAG TTC CAG TGC CAA GAC GGG AAA TGC ATC TCC TAC AAG TGG GTC	24	
25	TGC GAT GGC AGC GCT GAG TGC CAG GAT GGC TCT GAT GAG TCC CAG	39	Exon 2
40	GAG ACG TGC TTG//TCT GTC ACC TGC AAA TCC GGG GAC TTC AGC TGT	54	
55	GGG GGC CGT GTC AAC CGC TGC ATT CCT CAG TTC TGG AGG TGC GAT	69	Exon 3
70	GGC CAA GTG GAC TGC GAC AAC GGC TCA GAC GAG CAA GGC TGT CCC //	84	
85	CCC AAG ACG TGC TCC CAG GAC GAG TTT CGC TGC CAC GAT GGG AAG	99	
100	TGC ATC TCT CGG CAG TTC GTC TGT GAC TCA GAC CGG GAC TGC TTG	114	
115	GAC GGC TCA GAC GAG GCC TCC TGC CCG GTG CTC ACC TGT GGT CCC	129	
130	GCC AGC TTC CAG TGC AAC AGC TCC ACC TGC ATC CCC CAG CTG TGG	144	
145	GCC TGC GAC AAC GAC CCC GAC TGC GAA GAT GGC TCG GAT GAG TGG	159	Exon 4
160	c.408C>T TGT AGG GGT CTT TAC GTG TTC CAA GGG GAC AGT AGC	174	
175	D115D GCC TTC GAG TTC CAC TGC CTA AGT GGC GAG TGC ATC	189	
190	TGG CGC TGT GAT GGT GGC CCC GAC TGC AAG GAC AAA	204	
205	TCT GAC GAG GAA AAC TGC GCT//GTG GCC ACC TGT CGC CCT GAC GAA	219	
220	TTC CAG TGC TCT GAT GGA AAC TGC ATC CAT GGC AGC CGG CAG TGT	234	Exon 5
235	GAC CGG GAA TAT GAC TGC AAG GAC ATG AGC GAT GAA GTT GGC TGC	249	
250	GTT AAT GTG//ACA CTC TGC GAG GGA CCC AAC AAG TTC AAG TGT CAC	264	
265	AGC GGC GAA TGC ATC ACC CTG GAC AAA GTC TGC AAC ATG GCT AGA	279	Exon 6
280	GAC TGC CGG GAC TGG TCA GAT GAA CCC ATC AAA GAG TGC GGG//ACC	294	
295	AAC GAA TGC TTG GAC AAC AAC GGC GGC TGT TCC CAC GTC TGC AAT	309	
310	GAC CTT AAG ATC GGC TAC GAG TGC CTG TGC CCC GAC GGC TTC CAG	324	Exon 7
325	CTG GTG GCC CAG CGA AGA TGC GAA GAT//ATC GAT GAG TGT CAG GAT	339	
340	CCC GAC ACC TGC AGC CAG CTC TGC GTG AAC CTG GAG GGT GGC TAC	354	
355	AAG TGC CAG TGT GAG GAA GGC TTC CAG CTG GAC CCC CAC ACG AAG	369	Exon 8
370	GCC TGC AAG GCT GTG GGC//TCC ATC GCC TAC CTC TTC TTC ACC AAC	384	
385	CGG CAC GAG GTC AGG AAG ATG ACG CTG GAC CGG AGC GAG TAC ACC	399	
400	AGC CTC ATC CCC AAC CTG AGG AAC GTG GTC GCT CTG GAC ACG GAG	414	Exon 9
415	GTG GCC AGC AAT AGA ATC TAC TGG TCT GAC CTG TCC CAG AGA ATG	429	
430	ATC TGC AGC//ACC CAG CTT GAC AGA GCC CAC GGC GTC TCT TCC TAT	444	
445	GAC ACC GTC ATC AGC AGG GAC ATC CAG GCC CCC GAC GGG CTG GCT	459	
460	GTG GAC TGG ATC CAC AGC AAC ATC TAC TGG ACC GAC TCT GTC CTG	474	
475	GGC ACT GTC TCT GTT GCG GAT ACC AAG GGC GTG AAG AGG AAA ACG	489	Exon 10
490	TTA TTC AGG GAG AAC GGC TCC AAG CCA AGG GCC ATC GTG GTG GAT	504	
505	CCT GTT CAT GGC//TTC ATG TAC TGG ACT GAC TGG GGA ACT CCC GCC	519	
520	AAG ATC AAG AAA GGG GGC CTG AAT GGT GTG GAC ATC TAC TCG CTG	534	Exon 11
535	GTG ACT GAA AAC ATT CAG TGG CCC AAT GGC ATC ACC CTA GAT//CTC	549	
550	CTC AGT GGC CGC CTC TAC TGG GTT GAC TCC AAA CTT CAC TCC ATC	564	Exon 12
565	TCA AGC ATC GAT GTC AAT GGG GGC AAC CGG AAG ACC ATC TTG GAG	579	
580	GAT GAA AAG AGG CTG GCC CAC CCC TTC TCC TT c.1616C>T T GAG //	594	
595	GAC AAA GTA TTT TGG ACA GAT ATC ATC AAC GA P518L C AGT	609	
610	GCC AAC CGC CTC ACA c.1773C>T GTC AAC TTG TTG GCT GAA AAC	624	Exon 13
625	CTA CTG TCC CCA GAG N570N CTC TTC CAC AAC CTC ACC CAG	639	
640	CCA AGA GGA//GTG AAC AGG ACC ACC CTG AGC AAT GGC	654	
655	GGC TGC CAG TAT CTG TGC CTC CCT GCC CCG CAG ATC AAC CCC CAC	669	
670	TCG CCC AAG TTT ACC TGC GCC TGC CCG GAC GGC ATG CTG CTG GCC	684	Exon 14
685	AGG GAC ATG AGG AGC TGC CTC ACA GAG//GCT GAG GCT GCA GTG GCC	699	
700	ACC CAG GAG ACA TCC ACC GTC AGG CTA AAG GTC AGC TCC ACA GCC	714	
715	GTA AGG ACA CAG CAC ACA ACC ACC CGG CCT GTT CCC GAC ACC TCC	729	
730	CGG CTG CCT GGG GCC ACC CCT GGG CTC ACC ACG GTG GAG ATA GTG	744	Exon 15
745	ACA ATG TCT CAC CAA GCT//CTG GGC GAC GTT GCT GGC AGA GGA AAT	759	
760	GAG AAG AAG CCC AGT AGC GTG AGG GCT CTG TCC ATT c.2243A>G	774	Exon 16
775	ATC GTG//CTC CTC GTC TTC CTT TGC CTG GGG GTC TTC D727G	789	
790	AAG AAC TGG CGG CTT AAG AAC ATC AAC AGC ATC AAC	804	
805	CCC GTC TAT CAG AAG ACC ACA GAG GAT GAG GTC CAC ATT TGC CAC	819	Exon 17
820	AAC CAG GAC GGC TAC AGC TAC CCC TCG//AGA CAG ATG GTC AGT CTG	834	
835	GAG GAT GAC GTG GCG TGA		Exon 18

ANEXO E: Posição das Mutações nos Íntrons e Região 3' Não Traduzida

1	gtttccctaaaaatcctgctgagaggttagcactgcctgccaaagtgcagtttgcaaaatcc	60
61	cagagaaatccagcttattcctgggggaaccgccaagactgccagccctgtgtgggggtt	120
121	caggcaagtttctcacatgtgcctttttggcaagaggcctctggcaaccccatgagtc	180
181	caaagagactcaattctaaaagttggtctccaccagctctctgtggcttaggggttcaag	240
241	ttcaactgtgaaagccctgttttgttttgattttgctttgaggagagggaaaccgccc	300
301	ctgtttgttcaactccttctcctaaggggagaaatcaatatttacgtccagactccaggt	360
361	atccgtacaattgatttttcagatgtttatactcagccaaaggcgggatcccacaaaaca	420
421	aaaaatatttttttggctgtacttttgtgaagattttatttaaattcctgattgatcagt	480
481	gtctattaggtgatttggaaataacaatgtaaaaacaatatacaacgaaaggaagctaaaa	540
541	atctatacacaaattcctagaaaggaaaaggcaaatatagaaagtggcggaagtccccaac	600
601	attttttagtgttttcttttggagcagagaggacaatggcattaggctattggaggatct	660
661	tgaagggtttgtttatccttctgtggacaacaacagcaaaatgttaacagttaaacatc	720
721	gagaaatttcaggaggatctttcagaagatgcgtttccaattttgagggggcgctcagctc	780
781	ttcacccgagacccaaatacaacaaatcaagtcgcctgccctggcgacactttcgaagga	840
841	ctggagtgggaatcagagcttcacgggttaaaaagccgatgtcacatcgggcgttcgaaa	900
901	ctcctcctcttgcagtgaggtgaagacatttgaaaatcaccccactgcaaaactcctcccc	960
1	M G P W G W K	
961	ctgctagaaacctcacattgaaatgctgtaaatgacgtggATGGGGCCCTGGGGCTGGAA	1020
8	L R W T V A L L L A A A G T A V	
1021	ATTGCGCTGGACCGTCGCCTTGCTCCTCGCCGCGGCGGGGACTGCAGgttaaggcttgc	1080
1081	caggcgccagaataggttgagagggagcccccggggggccccttgggaatttatttttttg	1140
1141	ggtacaaataatcactccatccctgggagacttgtggggtaatggcacggggctccttccc	1200
1201	aaacggctggagggggcgctggagggggcgctgaggggagcgcgagggctcgggaggag	1260
1261	ctgagggatttaagggaacgggggacccgctgtcccccaagtctccacagggtagggac	1320
1321	cgcactcttctttgagacggagtctagctctgtcgcccaggatggagtgcagtggcacgat	1380
1381	ctcagctcactgcaacctccgcctcccggttttaagcgagctctcctctctcagcctccc	1440
1441	aatagctgggattacaggcgcccaaccaccacgcccgcctaatttttgtatttttagtag	1500
1501	agacgggttttaccatttttgccaggtggtctcgaaccccgacctcaggtgatctgcc	1560
1561	caaaagtgcctgggtattacaggcgctcagccacgcgcgcggcgccgggacctctcttcaac	1620
1621	tcggagctgggtgtggggacctccagtcctaaaaacaagggatcactcccacccccgcctt	1680
1681	aagtcttcttgggggcgagggcgactggagacccggatgtccagcctggaggtcacccgcg	1740
1741	ggctcaggggtcccgatccgctttgcgcgacccaggggcgccactgccatcctgagttgg	1800
1801	gtgcagctcccggtattccgcgcgctgctccgggacgggggccaacccccctcccgcccctgc	1860
1861	ccccgcccccttggcccgccccccgaattccattgggtgtagtcacaacaggccaccctcg	1920
1921	agccactccccctgtccaatgtgagggcgtggagggcgagggcgggcgctcgggagcggg	1980
1981	gcttgtgtacgagcgggggcggggctggcgcggaagtctgagcctcaacttgtccggggcg	2040
2041	aggcggtatgcaggggaggcctggcgcttccctccgcggttccctgtcacaaaggcgacgaca	2100
2101	gtcccgggtccccggagccgcctccgcgacatacacagagtcgcctccgttatcctgggc	2160
2161	cctcctggcgaagtccccggtttccgctgtgctctgtggcgacacctccgtccccacctt	2220
2221	gtcctggggggcgccctcgccccaccagccccgatcaagttcacagagggggcccccgcc	2280
2281	acctcaaggcctcgggtccttccagaggttgaaacgttgccctcagaatctccccgcccc	2340
2341	ccttgggtctgcagccgagatcttcagccacgggtggggcagctatcccccgggacgaccc	2400
2401	cctgggggtggcctcgcttcttcagaggtgtgaatggccttcgggttcagctgtccaagcgg	2460
2461	cgatttttctctgtgggtgaaatggattagatttttagattttccacaagaggctgggttagtg	2520
2521	catgatcctgagtttagagcttttttaggtggcttttaattagttgcagagagacagcctcg	2580
2581	ccctagacaacagctacatggccctttccctcctgagaaccagcctagcctagaaaagga	2640
2641	ttgggattgcctgatgaacacaaggattgcaggaacttttttttaattggcaaggggg	2700
2701	ttggctttagctggatggagagacttgaactgccttgaaattcacgctgtaactaacaca	2760
2761	ccagtttctcttgggaggccagagaggggaggggaggggtgtaatgaaatacggatgattgtt	2820
2821	cttttatttttatttacttatttattttttaactttttgtagagatgaggtctcgcttg	2880
2881	ttgctcaggctggtcttgaactcctggcctcaagcgatcctcctacctcagcctcccaaa	2940
2941	gtgttgggattacaggagtgcacccgcgcgccccaccgggggatgatgatgattgcaaaca	3000
3001	ttctgccactcagttttacaaaagagagaggcactggattaatgtgtatctcactcac	3060
3061	caatcaacctcttctcctaagagaaaatgttaaggaagtcttaggcaaggccttgtttgtt	3120
3121	catcacttttagtttctctctcccgggatggctgagaatgtgatgtttcctctgttgtcaa	3180
3181	ggagactacacccctgatgttttccctccagacttctgagagctgggtgtgtgtttctagca	3240
3241	ctttctagctgcaccacctcacgctgtagctggcttcaaggcatatccaggggggagttt	3300
3301	cttgtccattttcctttacaaagggaagtgttggaattgaaccgcaagccttcaacttag	3360
3361	accaaaatcagggaacagcggtgagcgagctccaaacgtgtcaatgactcacccaaatt	3420
3421	tgagtaaggagttggctgcttttaacgagcgcgaggggtgattcccttgtcatttccggaa	3480
3481	atacctatcttccagggaacactgggaaaaaacaggggagacctttgttgagacagaaaac	3540
3541	ctgtaggggaattctgttccctcattcctgctcttatctgtagacttccctccctgataaga	3600
3601	tccaattctagatgggtcggttgccttgcctttgatgggtgctttgatgggctttatta	3660
3661	ttattattattattattattatttttgatgggctttttgatgtcccttttccctccac	3720
3721	actctgtcccaactgtcaagcaaatagccttttggctgaagagactgcagatgtaaac	3780
3781	accagcagcaaacagtgagtcaggctctctcttccggaagcaaaatcaattgctgagatc	3840

Exon 1

3841	actctggggaaaataccacacctatttggaaagaagcactgatcaattgatgtctat	3900
3901	ttttttttttttagttggagtcctgcctgtcaccaggctggagtgcaatggcataatct	3960
3961	cgctcactgcaatccccgcctccgggttcagcaattctcctgcctcagcctcctgag	4020
4021	tagctggaattataggcgctgccacaacaccggctaatttttgtattttagtagaga	4080
4081	tggggtttcaccacgttggccaggctgggtctcgaactcctgacctcgtgatccaccgc	4140
4141	tcagcctcccaaagtcgaaggattgcaggcgtgacccactgtgccagccaatcaattgat	4200
4201	ttctcattcattttcagctggctctgttcccttaagccagggttttctgtttgtgtt	4260
4261	tcccttcaaggaaatgattctagctacagtttttgatttctgtacaactgttttcagt	4320
4321	agcacagggaagaaaacatcgaaagcattcaccacctcatttgtgtgctgggggaaaaa	4380
4381	gcagaaatgtgtattctctttttttgttttcgatgacctgttctgacttgttactcgtg	4440
4441	acttgagagatcagagggttagaggactagaatttatagagggtgtttttttgtttgttt	4500
4501	atttttgttgcagttgcccaggctggagtgacgtggcgcaatctcggtcactgcaacct	4560
4561	ctgcctcccaggttcaagcgattcttcggcctcagcctcctgagtagctggaactacagg	4620
4621	cgccgcaccacaccagctaatttttgtattttcagtagagatgggatttcaccata	4680
4681	ttgggtcaagctggcctcgaactcctgacctcgtgatccaccgcctcagtttcccaaagt	4740
4741	gctgggagtagaggcgtgagccgcctgcccggcctttttgtgtttttgtgttttgaga	4800
4801	ggagctcattgttttttaggttccctagcgtgagaaaatctggggatccatgctctagt	4860
4861	ttacttcttt	4920
4921	tcattgcaacttctgcctccgggttcaagggttctcgtgtctcagcctcctgggtagc	4980
4981	taggatacgggcaccgcctaccatgcctggctaatttttgtacttttagtagagacagggt	5040
5041	ttcgccacgttggccaggctgggtctcgaactcctgacctcaggtgagccgcctgccttg	5100
5101	cctcccaaagtgtgagattacaggcgtgagccaccgcgttggcctaatttgcctttcc	5160
5161	tgaattcaaatggtctaataatgaaaaacgccaaccttgcctgaaagaataagaaagagg	5220
5221	tgcggtttctgttgggcccgttgatgttttggaaacaggactggttttgtccccttgcctggaa	5280
5281	agggcgcaactgtgaggacagctccctgacgtgctcactcagcactgttccgttccct	5340
5341	gagcactgtcccactagctaggccaaggagctcatttggcaggcaactgctgtctggc	5400
5401	tgcgcctgtggcagtaaaatctgcctttatttttttggaggcagggtcttgcctgtcgt	5460
5461	caggctgaagtgtgcagttatagctcactgcagcctccagcttctgtactcaactgatcc	5520
5521	tcctctctcagcctcctgagtagctgggactatacgcacgtgttaccactcccacctcag	5580
5581	tttgtttgttttatt	5640
5641	aggctggagtgcaatggcgcatctcggtcaccgcaacctccacctcctgggtcaagcg	5700
5701	attctcctgcctcagcctcctgagtagctgggattacaggcatgcaccaccacgcccggc	5760
5761	taattttgtatttttctgtagagatggggtttctccacattgggttcaggctgttctcgaa	5820
5821	tcccaacctcaggtgatccaccgcctcagcctcccaaagtgtgggattataggcgtga	5880
5881	gccccgaaccgcgcactcccagctaagtttaattttttgtttgtttgttctgtttgtt	5940
5941	tttatttttttgagacagagtctcccgcaccaggctggagcgcagatcactgcatccttgac	6000
6001	ctcccaggcttaagccatcctcccactcagcctcccaagtagctgggattacaggtgtg	6060
6061	tgcactatgcttggctaagttgtgtattttttgttagagatggggttcaagggttctcg	6120
6121	ctttgttgcctcggttgggtctcaaaactcctgggctcaagcagtcctccctcctcagcctc	6180
6181	ccaaggtgtggggaaaatccacttttgaacattgtctggagagttgccagggtggtaga	6240
6241	tcacagaaataggtcatcgtggggtccttcccattgggtgcagctcttgagccacctgtggc	6300
6301	cagcaaatatttggagaataatagttaggggagagcttgagggtccagggaagggttttgt	6360
6361	ttttcttcagggaagggtttttattgttctttatccctccctaaaggaccttcaggtgtt	6420
6421	actgacattcccggctcaccagtggtcacatttagtttgaagctgggcccctcgtacaga	6480
6481	ggtagggaggtgagagcattggattagtgggtcaccaaagctgcggtcacctagtggggtg	6540
6541	atcagaggctcctcccttaagatcttgattgccaacgcctctggcccaactttccttttt	6600
6601	atztatcgcaagcctcctggaatctcaattgctttttgccaccgccgtgtgtcagcaciaa	6660
6661	gaaatgagtcattttctccttttaagcacagttgaaattgagctgtgagtcagtgagggtg	6720
6721	gtacgattatgtcaaagcgggtgtgtacagttatgacagatctgtagttgggcaagaga	6780
6781	attatcagagtttgtgaccacagcagattccaaagctcgactcattttcttctctctcc	6840
6841	ttcccttttttcttttcttt	6900
6901	ctggagtgagtgccacaatctgggctcactgcagccctgcctcctgggttcaaagat	6960
6961	tctcatgtttcagcctcccagtagctgcaattacaggcattcgggttcaagtgattctc	7020
7021	ctgcctcagccacctgagcagctgggattacaggcgcccgccaccacgcccggctaattt	7080
7081	ttgtatttttagtagagacgggtttcaccatgttggccaggctgggtctcgaactcctga	7140
7141	actcaggtgatccgcccacttcggcctcccaaagtgtgagattacagacgtgagtcacc	7200
7201	gcgcccagcctgttctgttcttttaattctcaaaacacctctaggaagtagagactgcca	7260
7261	ttctccccattttacagatcaggaaactgagtcacagaaggatttagtcagttacccaa	7320
7321	gttgttctagttaaatggcctggaaagccagtgaaagccaggattgtctatctaaccctcc	7380
7381	ttactactctaactttcagggaattccacatgaatgtgctgggtcaaccatcaaagttgaa	7440
7441	atggataaaggggtgagtcgggtggtgagtcgtgtaactcctagcacttgggagggcc	7500
7501	gagatgggtgggtggattgcttgagcccaagagtttgagaccagcctgggcaacatagtg	7560
7561	agacacctgtctctgcaaaaaataaataaaaaagttagctgagtgatgggtgcaccctc	7620
7621	tagtcacagctgttgagttaggcttaggcaggaggatcgcatgaacctgggaggtggagg	7680
7681	cggcgtgagcctcagtcagtcgactgcaactccaacctgggcaacagagtgaaagccggt	7740
7741	gtccgaaagagaaagaaaaaagacatagatacatcttttaagtttaggttgtatgttaa	7800
7801	ttacctaacaactcagtttcaactgtgcttaagaggagaaatgactcatttcttgcatac	7860
7861	atcaaatttagcccaaaatgtagtggtttaaacaacacatttatgatttctcagtttttg	7920
7921	cgtgtcaggaatttgggaagcagcacagctagacggttccagctcagggtctctcatgaag	7980

7981	ttgcaatcaaaatattggcaggagagaaaaacatatTTTTcagaagctgcaggcataggaa	8040
8041	gacttggctggggttgaaggatccactccaagatggcgactcagtggtctctggctgg	8100
8101	aggcctcagttccctgctgctggagctctccctccagctgcttgagtggactcatgaca	8160
8161	tgcagctggcctcccctggagcagtcgatccaacaatgagcatggccatgaactaggctc	8220
8221	agaagccactccctgtcgtctctacattttcctatcagaagcaagtcattaaaagtcag	8280
8281	tgccactccaggggagacgaattaggctctgccttctgaaaggattatcacagaagatgc	8340
8341	ggtcctatatattctTTTTTaaattattctTTTTTTattttgtagagatggggtcttgg	8400
8401	tatgttgcctaggccagctctggaattcctgggctcaaaccaatcctgtctctgccctccaa	8460
8461	agtgttgggattacaggcatgagccactgcacctgggtcatgtggtcatattttctTTTTc	8520
8521	TTTTTTTTTTTTTTTTgagacagagtctctgtcgcccaggctggagtatggtggcgtgat	8580
8581	ctcagttcactgcagcctccgcctcccggttcaagcgattctcctgccctcagcctcctg	8640
8641	agtagctgggattacaggcgcccgccaacatgccagctaatTTTTTTtagtagagatggg	8700
8701	gtttcaccatgtttagccaggatgggtctcgatctcctgattttgggtgatccgccaccttgg	8760
8761	cctcccaaagtttcaaccatcgatcagaacttattgatgtacttatgtagctaggcacgg	8820
8821	tggcgcgctgctgtaatcccagctacttgggaagggttaaggcaggagaaatcgcttgaacc	8880
8881	tgggaggcagaggttacagtgagtcagatcataccattgcactccagctctgggcaacag	8940
8941	aatgagactctgtctcaaaaacaaaaaacaacccttgtatgtgattttcctggatagca	9000
9001	tctgttacatcttcacaaagataaaaaagtgcagcttgggtgggcatggtggctcacacct	9060
9061	gtaatcccagcactgagaggtcaggcaggcagatccttgaggtcaggaatttgagacc	9120
9121	aggctgggcagcatggtgaaacccgctctcacaacaaatacaaaaattagccgggtgtg	9180
9181	gtgtcacgcacctgtattcccaagctactcaggaagctaaaggcaggagaaatcacttgaac	9240
9241	ccagaggtggaggtttgcagtgagttgagattgtgccattgcactccagcctgggcgaca	9300
9301	gagtgagactctgtgtcaaaaataaaaataaaaataaaaattttaaaaaaggcagatttttt	9360
9361	ttcttcttgggtattgttaccttattatagtaataataagtgcatagtgcattgagata	9420
9421	agcaatcataaatttggatttatttgcggcgccgcatgggtgctccagcctataatccagcact	9480
9481	ttgggtcaggagtccaaggccagcctggccaatatagtgaaactccatctctactaaaata	9540
9541	caagaaattacctgggcatggtggcagttgctggtgatccccagctacttgggaggctga	9600
9601	ggcaggagaaatcgcttgaacctgggaagcagaggttgcatgagccaagattgcaccact	9660
9661	gcactccagcctgggtgacagagtgcagctctgtctgaaaataataataataaatttg	9720
9721	ttattgctttttattgcctttagtttacatagggaaatcaaagtttatactttgatttataaa	9780
9781	agttgcttttgattctagttcagacaaccagaatccttcatataaagggtattagagggccc	9840
9841	agtgtggtggctcatgcctgtaatcccagcatattgggagggtgaggaggaggatcact	9900
9901	ttaggagtttgaggccagcctaggcaacatagtgagaccttgtctctacaaaaaattcca	9960
9961	acattagctgggcatggtggcatgtgcctgtagtcccattttatttgggggggtgaggcag	10020
10021	gaggatcacttgagcccacgaggttcaatccaggttgcatgaagccatgatcctgccact	10080
10081	gcactccagtttgggtaacagagcgaagctatgtctcaaaaaagaaaaaaaagtattc	10140
10141	taaatccaaatttaatatataaaaactaaatgcaggccaagtgtggtggcatataacctata	10200
10201	atcacacactttgggagggtgaggtgggaggattgcttgagcccaagagttcaagacca	10260
10261	gcctaggtaacacagtaagaccccatctctacaaaaagtagaaaaattagcctggcatgg	10320
10321	tgggtgagtgttttaatcccaactacttaggggggtgagatgggaagattgcttgagcct	10380
10381	cagagtttgaggctgcagtgggccgtgatcgctccactgatcgctctaaagtgcagacct	10440
10441	gtctcaaaaaaaaagaaaatagaagaaaactaaatacattcaataagactttgatctctt	10500
10501	ttccaagggtgtaatatatttttgggaaattttccagttactttgttctcatttttaagtta	10560
10561	ataatctaagtccttggttttctaaggaaaagttttctcttattatatcttttgtaatgt	10620
10621	ttctctcccattttcttttgatctgatcttcagatacatgattatcttccactgctaaattt	10680
10681	gtgttctctggcctctacattttataattttctcataattctttatctaagtatttcttccc	10740
10741	tacctactgaagaaaaactcaagttttcttccaccttaatgattatgctgtgtctgtgagt	10800
10801	ttcttctactgactctttacagtacaagttttttgtttttgttttttaattggtcagatgg	10860
10861	atagaacaacacaggttttggttttgttttaacttttaaaaaaattataatagataa	10920
10921	agggtctcactacgttgtccagctgatctcatactcctgggctcaagcaatccacccac	10980
10981	ctctgcctcccaaagtgtctgggattacagtcagtgccaacatgcctgggcagtacaggt	11040
11041	tttttttgagacggagttttgttcttgttgccgaggtggagtgcaatggcacaatcttg	11100
11101	gctcaccacaaaagtctgcctcccaggttcaagtgattctcctgcctcagcctcctgagta	11160
11161	gctgggattacaggcatgtgccaccacgccagctaattttgtatttttagtagagacgg	11220
11221	ggtttcaccatgttggccaggctgggttcgaactgctgacctcaggtgatctgccacact	11280
11281	cggcctcccaaagtgtctgggattacaggcatgagccaccatgccagctgtagtacaggt	11340
11341	tttaatatgtctaaatactcttctttcttttattaatgtgcatggaagttctaatattttt	11400
11401	ttcccataccccagagagtcctaattttgggaatcaacaacactagcctttgttgacaagt	11460
11461	gtctctcttgggttcttcttttgtgtcctccactgaatttttgggggttcataaaaatttcat	11520
11521	ttgttgtgcttgcttaattccctgggaatcagactgttccctgatcggatgacatttctgg	11580
11581	ttaattcttttagttggcaggaaatagacacagggaacgtggtcagtttctgattctggcg	11640
24	G D R C E R N E	
11641	ttgagagacccttttctcttttctctctcagTGGGCGACAGATGCGAAAGAAACGAG	11700
32	F Q C Q D G K C I S Y K W V C D G S A E	
11701	TTCCAGTGGCAAGACGGGAAATGCATCTCCTACAAGTGGGTCTGCGATGGCAGCGCTGAG	11760
52	C Q D G S D E S Q E T C L	
11761	TGCCAGGATGGCTCTGATGAGTCCAGGAGACGTGCTgtgagtcaccttttgggcatgata	11820
11821	tgcattttatttttgaatagagacaggggtctcgccatgttggccagggtggtcttgaatt	11880
11881	tctggtctcaagtgatccgctggcctcgccctcccaaagtgtctgggattacaggcaccac	11940

Exon 2

Exon 3

15901 agtctcactctgtttgccaggtgaggttcagtgggtgcaatctcagctcactgcaacct 15960
 15961 ctacctactgggttcaagcgattctcctgcctcagcttcccagtagctgggttacagg 16020
 16021 cgtgcaccagcagcgaggctaattttttgtatttttagtagagacggggtttaccatgtt 16080
 16081 ggccaaggtggtcttgaactcctgacctcaagtgatcctccacctcagcctcccaaagc 16140
 16141 gctaggattacggccatgagccactgagggcgggtgcacctacaactgtcttgataaatt 16200
 16201 cttacccccacaccactgggtccagatagtcagtgtcaccacacaacattaaggatattcc 16260
 16261 aaatttgaacattccaaaatcagaaaaatattccaactctgaaaatattccaaaatcca 16320
 16321 aaaaaattcaaaatccaaaacacttctgggtcccaagcatttttagagaagggataactcaac 16380
 16381 ccaaaataaggacagcaattctataaattgtgctaccatcttgcaggtctcagtttaaca 16440
 16441 gctttacacctatttagcgcaccagtgtcatagcagtgtgggaaatgtgtacagatgag 16500
 16501 gaaactgaggcaccgagaggggcagtgggttcagagtcctatggccctgactgctccccagc 16560
 16561 ccgcctttccaggggctggcctcactgcccgcagcgtccccggctatagaatgggtgggt 16620
 106 P K T
 16621 gttgggagacttcacacggtgatgggtggtctcgcccattccatccctgcagCCCCAAGA 16680
 109 C S Q D E F R C H D G K C I S R Q F V C
 16681 CGTGCTCCCAGGACGAGTTTCGTGCCACGATGGGAAGTGCATCTCTCGGCAGTTCGTCT 16740
 129 D S D R D C L D G S D E A S C P V L T C
 16741 GTGACTCAGACCGGGACTGCTTGGACGGCTCAGACGAGGCCTCCTGCCCGGTGCTCACCT 16800
 149 G P A S F Q C N S T C I P Q L W A C D
 16801 GTGGTCCCGCCAGCTTCCAGTGCAACAGCTCCACCTGCATCCCCCAGCTGTGGGCCTGCG 16860
 169 N D P D C E D G S D E W P Q R C R G L Y
 16861 ACAACGACCCCGACTGCGAAGATGGCTCGGATGAGTGGCCGCAGCGCTGTAGGGGTCTTT 16920
 189 V F Q G D S S P C S A F E F H C L S G E
 16921 ACGTGTTCGAAGGGGACGTAGCCCCCTGCTCGGCCTTCGAGTTCCTACTGCCTAAGTGGCG 16980
 209 C I H S S W R C D G G P D C K D K S D E
 16981 AGTGCATCCACTCCAGCTGGCGCTGTGATGGTGGCCCCGACTGCAAGGACAAATCTGACG 17040
 229 E N C A
 17041 AGGAAACTGCGgtatgggcgggggccaggggtggggggcgggcggtcctatcacctgtccct 17100
 17101 gggctccccaggtgtgggacatgcagtgatttaggtgccgaagtggatttccaacaaca 17160
 17161 tgccaagaaagtattcccatttcatgtttgtttctttttttcttttcttttctttatttt 17220
 17221 gtttttgagatggagtctcactgtgtatttttttcatctctaaatttctacatcata 17280
 17281 tggccaccatgaggccccaggtggtggcgatggttgcgtgttagcttattgggaaatcactg 17340
 17341 tttggaaggtgctggttgtttttgttgtttgttgtttttgtttttgtttttgttttgag 17400
 17401 acggagtctcgctctgtcgccaggggtggagtgcagtggcgcgatcagctcactgcaacct 17460
 17461 ccgcttccctgggttcaagccattctcctgcctcagcctcccaagtagcgcggttacagg 17520
 17521 catgtgccaccacctccggctatttttttttctatttagtagagatggggtttcaccatg 17580
 17581 ttagtcaggctgggtcatgaactcttgacctcaggtgatccaccgcctcggcctcccaaa 17640
 17641 gtgctgggattacaggcggtgcactgctgcaccagcctttttttgtttttttgagacagg 17700
 17701 gtcttgcgtgtcaccaggttgaagtaaggtggcacgattatggctcactgcggccttgat 17760
 17761 ctcccttggtcgaagcgatcctctcacttcagcctctcaagcagttggaaccacaggctgt 17820
 17821 accaccaagcctggccaattttttgtacagacacaggctgggtcttgaactcctgggctc 17880
 17881 aagcaatcctcctgcttggcctcccaaagtgtggtgattccaggcatgagccgctgcac 17940
 17941 ccggcaaaaggccctgcttctttttctctggttgcctcttcttgagaaaatcaacacact 18000
 233 V A T C R P D E F Q C S D G
 18001 ctgtcctgttttccagCTGTGGCCACCTGTGCGCCTGACGAATTCAGTGCTCTGATGGA 18060
 247 N C I H G S R Q C D R E Y D C K D M S D
 18061 AACTGCATCCATGGCAGCCGGCAGTGTGACCGGGAATATGACTGCAAGGACATGAGCGAT 18120
 267 E V G C V N V
 18121 GAAGTTGGCTGCGTTAATGgtgagcgctggccatctgggttttccatccccatttctctgt 18180
 18181 gccttgcgtgcttgcaaatgatttgtgaagccagagggcgcttccctgggtcagctctgcac 18240
 18241 cagctgtgctgctgtgggcaagtgcattgacttctcagagcctcacttccctttgttttg 18300
 18301 agacggagtctcgctctgacacccaggtggtgagtgctgtggcacaatcacagctcacggc 18360
 18361 agcctctgcctctgatgtccagtgcatttctcctgcctcagcctcccagtagctgagatta 18420
 18421 aaggcgtataaccaccagccccggctaattttttgtatttttatttagagacaggggtttctc 18480
 18481 catgttggccaggtggtcttgaactcctgggtcaggtgatccaccgcctcggcctcc 18540
 18541 caaagtgcctaggattacaggtgtgagccactgcgccagggcctaattttttgtattttta 18600
 18601 gtagagatgcggttttgccatattgccaggtggtctcgaactcctgggctcaagcgat 18660
 18661 ctgcctgccttggcctcccaaagtgtgggattacaggcacaaccacgtgcccgcagcg 18720
 18721 gttttcttaataatgaatccatttgcagtgcgttcttatgtgaataaaactattatatgaatgag 18780
 18781 tgccaagcaaacctgaggtcagacacacctgaccttctcctcctctctctggtctca 18840
 274 T L C E G P N K F K C H S G E C I T L
 18841 cagTGACACTCTGCGAGGGACCCAACAAGTTCAAGTGTACAGCGGCGAATGCATCACCC 18900
 293 D K V C N M A R D C R D W S D E P I K E
 18901 TGGACAAAGTCTGCAACATGGCTAGAGACTGCCGGGACTGGTCAGATGAACCCATCAAAG 18960
 313 C G
 18961 AGTGCggtgagtctcggtgcaggcggttgcagagtttgtggggagccaggaaaggagact 19020
 19021 gagacatgagtgtgtagggttttgggaactccactctgccaccctgtgcaaaagggtc 19080
 19081 cttttttcatttttgagacagctctgcacgggtcgccaggtggagcgcaatggcgcgatc 19140
 19141 tcggctcactgcaacctctgcctcccaggttcaagtgatttctcctgcctcagcctcctga 19200

Exon 4

Exon 5

Exon 6

IVS6+36G>A

19201	gtagctgggattacaggcgccaccaccaagcccggttaatTTTTTgtatgtttagtaga	19260
19261	gatggggtttcactatgttggccaggctggtgttgaactcctgaacctcatgatccgcca	IVS6+171G>A
19321	cctcggcctcccaaagtgtctgggattacaggcggtgacccaccccatgaaaaaaaaattaaa	19380
19381	aaatgaagcgatgtctgggcgcggtggatcacgcctgtaatcccagcactttgggaagctg	19440
19441	aggcaggcagatcacgaggggcaggagattgagaccatcctggctaatacggtgaaacccc	19500
19501	atctctactaaaactacaaaaaattagccgggtgtggtggcaggcacctgtgatcccagc	19560
19561	tactcaggaggctgaggcaggagaatcgcttgaacccaggaggtggaggttgagtgagc	19620
19621	cgggatcacaccattgcactccagcctgggtgacagagtgagactctgtctcaaaaaaaa	19680
19681	aaaaaaaaaaaaaagcgaattctgaaatacatgaattcttttccttagatgcctgcttct	19740
19741	gtcttgaggtttgttgttgttatttctgaacacagagtcttgcctctgtcgctcaggctggag	19800
19801	tgcagtggtcatgatcttggctcaccacaacctccggctcccagggtcaagcgattcttct	19860
19861	gcctcagcctcctgagtagctgggattacagctgaatgccaccttgcctgggctaattttt	19920
19921	gtatttttagtagagatggggtttcaccatgttggccaggctggcctcgaacctcctgacc	19980
19981	tcgagtgatctgcccgcctcctgaagtgtgggttaccaggcgtgagccacctcgctcctg	20040
20041	gtgaggggtttttttttttttttccccaaacctctgtggtggatactgaaagaccatattagat	20100
20101	aactgtacagtatagagaaggcagtggaagtgttctctgtcatataccagagtgggctt	20160
20161	gggcatggtggcatactcctgtagtctcagctaatacaggaggctgaggaaggaggatcgc	20220
20221	ttggggccaggagttggagactgtagtgcctgtgatcacaccaccacacttcaatctgg	20280
20281	gcaacagagcagagaccctatctctaaaaaaaagtaagtatttcggacactgtgggcca	20340
20341	tacggtctctggtgcagtttctcaacatggctgttgggtgaacacacacgcagacaac	20400
20401	gcaaaccaatacacgtggctgtggggccagaaaaatgttattttatggacacaaaaattgga	20460
20461	atttcatataactgttttgtgtcatgaaaatgatttccctttttattttttatttttcttc	20520
20521	tcaagtattttaatatgtaaaagccatttttaggcctggcaggatggttcacagctgtaa	20580
20581	tcccagcactttgggaggctcaggcgaggaggatcacgaggtcaggagatcgagaccatcc	20640
20641	tgccaacacagtgaaaccccgctctactaaaaatacaaaaaatttaaccaggcttggtg	20700
20701	gcgcgcgtctgtagtcccagctgctcaggaggctgaggcaggagaatcgcttgaatgcag	20760
20761	gaggcggaggttgtagtgcgcgaggttgcaccactgcactccagcctgagcgacagagt	20820
20821	gagagtccgcctcaaacaaaaaaatgtttgccatgctggctcttgaactcctgggctcaa	20880
20881	gctatctgcctgccttggctctcccaaagttctgggattacaggcatgagctacagcgccc	20940
20941	ggacttttgttgttttatatctatatatctatatataacttgttttatgtatatataata	21000
21001	cttgttttatatatatacaataactcagtgcaaaaaacatgtaacataaaaatttacctct	21060
21061	caaaccttattaagtgcacagttctgtgccattagcaaaattcacactgttgtacaacatc	21120
21121	acaaccaccatctccagaacttttttttttttttttattcttttttgagacagagtctcac	21180
21181	tcgtcgcacgggctggagtgcagtggtgcgatctcgggtcactgcaacctccacctacca	21240
21241	ggttcaagcaattctcctgcctcagcccccctcagtagctgggattacagggtgcccgctcct	21300
21301	accacgcccagctaattttttgtatttttcagtagagactgactgggtttcaccatgttggc	21360
21361	caggctgggtctcgaactcctgacctcaagtgatectcccacctcagcctcccaaagtgc	21420
21421	gggaatacaggcatgagccactgcgcgccggccccagaactcttttatcttcccaaaactga	21480
21481	agctctgtccccatgaaacactcactctccatccccctccccaaactcctggcaccaccat	21540
21541	tctactttctgtccctatgaatgtgatggctctagggacctcctctgagtggaaatcagac	21600
21601	agcattttccttttttgactggcttatttctactgagccaagtgcgggtggcacacgcctgt	21660
21661	aatcccaaaaactttgggagaccgaggcgggcgcatcacctgagggtcaggagttcgagacc	21720
21721	agcccgcccaacatgggtgaaacccccctctctagtaaaaaatacaaaaaattagcctgtcat	21780
21781	ggctgtgggtgcctgtaatcccagctaagtgggaggctgaggcaggagaatcgcttgtac	21840
21841	ccaggaggcggaggtcgcagtgcgcgagatcgtgccattacactccagcctgggcaaca	21900
21901	agagtgaaactccgtctctcctaaaaatacaaaaaaattagctgggcatggtggcacatg	21960
21961	cctgtagtcccagctacttgggaggctgaggcaggagaatcacttgaacccgggaggtgg	22020
22021	aggttgtaatgagccaaggttggcgccgaaggatgggtaggggccccgagagtgcaccgt	22080
315	T N E C L D N N G G C S	
22081	ctgcatcccctggccctgcgcagGGACCAACGAATGCTTGGACAACAACGGCGGCTGTTC	22140
327	H V C N D L K I G Y E C L C P D G F Q L	
22141	CCACGTCTGCAATGACCTTAAGATCGGCTACGAGTGCCTGTGCCCCGACGGCTTCCAGCT	22200
347	V A Q R R C E D	
22201	GGTGGCCACGCAAGATGCGAAGgtgatttccgggtgggactgagccctgggccccctct	22260
22261	gcgcttcctgacatggcaacaaacccctcatgcctcagtttccccatctgttaagtgtg	22320
22321	cttgaaagcagtttaggaggggttcatgagattccacctgcattggaaaaactatcattggct	22380
22381	ggccagagtttcttgcctctggggattagtaattaagaaatttcaggccgggtgcgtaaat	22440
22441	ccctgtaatcccaacaccttgggacgcgaggcgggcagatcacctgaggtcgggagttc	22500
22501	cagaccagcctgaccaacatggagaaaccccgctctctactaaaaatacaaaatttagccgg	22560
22561	gcttgggtgggtgatgcctataattcccagctactcaggaggtgaggcaggagaatcactt	22620
22621	gaacctgggaggtggaggttgtggtgagccaagatcgtgccattgcactccagcctgggc	22680
22681	aacaagagtgaactccatcaaaaaaaaaaagaaaaagaaaaaagaaaaaagaaaaaat	22740
22741	ttcagctgacacagcttcacactcttgggttgggttcccgtggatgatgaggtcaggt	22800
22801	gatgactggggatgacacctggctgtttccttgattacatctcccagaggtcgggctgt	22860
22861	ctcctggctgccttcgaaggtgtgggttttggcctgggcccccatcgctccgtctctagcc	22920
355	I D E C Q	
22921	attggggaagagcctcccaccaagcctctttctctctcttccagATATCGATGAGTGTC	22980
360	D P D T C S Q L C V N L E G G Y K C Q C	
22981	AGGATCCCGACACCTGCAGCCAGCTCTGCGTGAACCTGGAGGGTGGCTACAAGTGCCAGT	23040

Exon 7

Exon 8

380	E E G F Q L D P H T K A C K A V G	
23041	GTGAGGAAGGCTTCCAGCTGGACCCCCACACGAAGGCTGCAAGGCTGTGGgtgagcacg	23100
23101	ggaaggcggcggggtggggcgggcctcacccttgcaggcagcagtggtgggggagtttca	23160
23161	tcctctgaactttgcacagactcatatcccctgaccgggaggtgtttgctcctgagggc	23220
23221	tctggcaggggagtgctgccgcctgttaggacttgggcttgccagggggatgcctgcata	23280
23281	tgtcctagtttttgggaatatccagttaacggaaccctcagccctactggtggaacagga	23340
23341	accggctttcctttcagggacaacctggggagtgacttcaaggggttaaagaaaaaaat	23400
23401	tagctgggcatggtgccacacacctgtggtcccagctactcagaaggctgaggcgggagg	23460
23461	attgcttgagggcaggaggatttggtgatcctcccacctcagcctccggagtagctggga	23520
23521	cctcaggtgcatgccactatgcctggctaattttctttttttcttttttttttttttgcga	23580
23581	gacggagtctcgctctgttgcccaggctggagtgacgtggcaggatctcggtcactgca	23640
23641	agctccgcctcccggttcacgccattctcctgcctcagcctccccagtagctgggacta	23700
23701	caggagcccgccactgcaccaggccaattttttgtatttttagtagagacggggtttca	23760
23761	ctgtgttagccaggatggtctcgatctcctgacttcgtgatccgccacctcggccttcc	23820
23821	aaagtgcctcggttacaggcggtgagccactgcgcccagccgctaattttcatatttttag	23880
23881	taaaaacagggtttcaccatgttggccaggctagctctgaactcctgaaccaagtgatc	23940
23941	ctcctgccttggcctcccaaagtgcctgggattacagacaccacacctggctattattatt	24000
24001	tttttagagacagggtgctgctctatcttccagcctgtagtgcagtgcagcctccatcata	24060
24061	gctcgctgcagccttgacctcctgggttcacgtgatcgtcccgccaaagcctctggagg	24120
24121	gctgggagtagtggcatgtgccacctgcctgggttaatttttttttttttttttttgaga	24180
24181	cagagtctcattctgtcaccacaggctggagtgcggtggtgcatcttggttactgaaac	24240
24241	ctccacctcccagggtccagcaattctcctgcctcacccttctgagtagctgggattaca	24300
24301	ggttccggctaccaaacctggctagtttttgatgttttagtagagacagggtttcaccat	24360
24361	gttggtagaggctggtctcgattctccgcctcagcctcccaaagtgcctgggattacaggc	24420
24421	tttagccaccgtgcctggctttttttttttttttttttttttttttgtggcaataaggctcatt	24480
24481	gtcttggccaggctagccttatgtccttagcctcaagtgatcctcctccctcagcctccc	24540
24541	aaagtgcctgggattacagggtggcgccactgtgcctgttcccggtgggaggtcttttcca	24600
24601	ccctctttttctgggtgcctcctctggctcagccgcaccctgcaggatgacacaagggga	24660
24661	tggggaggcactcttggttccatcgacgggtcccctctgacccccctgacctcgctccccg	24720
397	S I A Y L F F T N R H E V R K M T	
24721	gacccccagGCTCCATCGCCTACCTTCTTCTTACCAACCGGCACGAGCTCAGGAAGATGA	24780
414	L D R S E Y T S L I P N L R N V V A L D	
24781	CGCTGGACCGGAGCGAGTACACCAGCCTCATCCCCAACCTGAGGAACGTGGTCTGCTCTGG	24840
434	T E V A S N R I Y W S D L S Q R M I C S	
24841	ACACGGAGGTGGCCAGCAATAGAATCTACTGGTCTGACCTGTCCCAGAGAATGATCTGCA	24900
454		
24901	Ggtgagcgtcgccccctgcctgcagccttggcccgaggtgagatgagggctcctggcgct	24960
454	T Q L D R A H G V S S	
24961	gatgcccttctctcctcctgcctcagCACCCAGCTTGACAGAGCCACGGCGTCTCTTCC	25020
465	Y D T V I S R D I Q A P D G L A V D W I	
25021	TATGACACCGTCATCAGCAGAGACATCCAGGCCCCGACGGGCTGGCTGTGGACTGGATC	25080
485	H S N I Y W T D S V L G T V S V A D T K	
25081	CACAGCAACATCTACTGGACCGACTCTGTCTGGGCACTGTCTCTGTTGCGGATACCAAG	25140
505	G V K R K T L F R E N G S K P R A I V V	
25141	GGCGTGAAGAGGAAAACGTTATTTCAGGGAGAACGGCTCCAAGCCAAGGGCCATCGTGGTG	25200
525	D P V H G	
25201	GATCCTGTTCATGGgtgcgtatccacgacgctgagggctgcagaggggaatggagggagca	25260
25261	ggaaggagcttcaggaactggttagtgggtgggcatggtggctcaaagcacctgtaatc	25320
25321	ccagcactttgggagggccaaggtgggtgatcatcaagaccagcctgaccaacatggtga	25380
25381	aacctcgtctctactaaaaataaaaaattagccgggtgtggtgggtgggcacctgtaatc	25440
25441	ccagctgctcgggaggtgagggcaggagaatcacttgaacctgggagatggaggttgacg	25500
25501	tgagccaagacagccccactgcactccagcctgggtgacagagtgcagactccgtctcaaa	25560
25561	aaaaaaaaaaaaaaaaactaaacaaaaaaactggttagtggctagacaacaggatggtatcttc	25620
25621	caagcccattggctgactcagcagctcctgggtcaagacactgtgacctgtgtcccctggc	25680
25681	aggaagcatcgccccctgccacctgcccgggtgtactctgtacctgtcaggtgacatctgct	25740
25741	acctaagcacgtgagaggtggcattttcacagtttcagtggtgctgacaacccggggacg	25800
25801	cacactgtccttgacgtacaatcaggaggtgaatgttgggtttccagcagagaacactg	25860
25861	gagaaggcacacttgggtgtctggaagggaaaagcaggggaagagagcatcatcagatgcct	25920
25921	gcgggtgaaggtgggcccgtatggccagcgtccctttttattttttattttttattttat	25980
25981	ttgagatggaatctcgctctgtcgcccagactgtagtgcagtggtgcatcacggctcac	26040
26041	tgcaagctccgcctcacaggttcacgccattctcctgcctcagcctcccgagtagctggg	26100
26101	actacaggcacccgccaccacgcgccgttaattttttgcatttttatttagagacgggggtt	26160
26161	tcaccgcgttagccaggatggtctaaatctcctgacctgtgatccaccgcctcggcct	26220
26221	ccctaagtgccttgattacaagcgtgagccaccacgcgccggccccctttttattttttat	26280
26281	tttttgagacggagtgctcgctctgtcgcccaggctagattgcagtggtgctgatctcggt	26340
26341	cactgcagcctccgcctccaggttcaagtgtattctcctgcctcaacctcccaactaatt	26400
26401	aggattacaagcatgtaccacctgcctgactaattttttgtatttttagtagactgg	26460
26461	gtttcaccatgttggctaggctggtctcgaaccttagcctcaagtaatctgcctgcctc	26520
26521	agcctcccaaacagcggggattacaggcatgagccactgtgcccaaccaacctggatc	26580

Exon 9

Exon 10

Exon 12

30301 aacacggtgaaaccccgctctctactaaaaatacaaaaaacaaattagccgggtgtggtgg 30360
30361 caggcgctgtagctccagctactcgggaggctgaggcgggagaatggcgtgaacccggg 30420
30421 aggcggagcttgacgtgagccaagatcgcgccactgcaactccagcctgggtgaccgagtt 30480
30481 gagactccgtctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaatacaaaaagtagccaggtgtggtg 30540
30541 gcaggcacctgtaatcctgggttctcgagaccgagggcatgagaattgcctgaccccgagga 30600
30601 ggtggagggtgcagtgagccaagatcatgccactgcaactccagcctgggcgacagagtgg 30660
30661 gactctgtctcaaaaaacaacaaaaaaaagttctggaatggatgggtggatggatggatgg 30720
30721 acttcacaacacgctgaatctgcttaaggccaccgaactgtgcaactcacaatatgtcga 30780
30781 gatgggtacatttttatgttatgtgtatttcaccacaattaaaaactagtgtgggccaggt 30840
30841 gtgggtgggttcatgcctgtaatccagcactttgggagggtcagagggaggtggatcatgag 30900
30901 gtcagcagttcgagaccagccaggccaacatggtgaaaccccatctctactaaaaataca 30960
30961 aaaattagccaggcggtgggtggcacatgcctgtagtccagctacttgagagggtgaagca 31020
31021 ggagaatcgcttgaacctgggaggctaagattgcagtgagccgagatcgtgccactgcac 31080
31081 tccagcctggacgacagagtgcagacttctgtctcaaaaaaaacaaaaaaaatttagc 31140
31141 tgtgggtcaggcactgtgggtcacgcctgtaatccagcactttgggagaccgaggtagg 31200
31201 tggatggcctgaggtcaggagttcgaatccagcctggccaacatggtgaaagcccgtctc 31260
31261 tactaaaaatacaaaaaatttagtcaggtatgttggcacacctgtaatccagctactcgg 31320
31321 gaggtgaaagcaagagaatcgtttgaacccaggaggtggacgttgcagtgcagccgagatt 31380
31381 gggccactgtactccagcctgggcaacaaaagtgaactctgtctgaaacaaacaaacaa 31440
31441 acaacaaacagacaaacaaaaaaaactagtgtggagagaggggtggcctgtgtctcatcc 31500
616 D K V F W T
31501 cagtgtttaacgggatttgtcatcttccttgcctgctgctgttagGACAAAGTATTTTGGAC 31560
622 D I I N E A I F T S A N R L T C G S D V N L
31561 AGATATCATCAACGAAGCCATTTTTCAGTGCCAACCGCCTCAGAGGTTCGGATGTCAACTT 31620
642 L A E N L L S P E D M V L F H N L T Q P
31621 GTTGGCTGAAAACCTACTGTCCCCAGAGGATATGGTTCTCTTCCACAACCTCACCCAGCC 31680
662 R G
31681 AAGAGgtaaggggtgggtcagccccaccccccaaccttgaaacctccttgtggaaactct 31740
31741 ggaatgttctggaatttctggaatcttctggtatagctgatgatctcgttcctgccctg 31800
664 V N W C E R T T L S N G G
31801 actccgcttcttctgccccagGAGTGAACCTGGTGTGAGAGACCACCTGAGCAATGGCG 31860
677 C Q Y L C L P A P Q I N P H S P K F T C
31861 GCTGCCAGTATCTGTGCCTCCCTGCCCCGAGATCAACCCCCACTCGCCCAAGTTTACCT 31920
697 A C P D G M L L A R D M R S C L T E
31921 GCGCCTGCCCCGACGGCATGCTGCTGGCCAGGGACATGAGGAGCTGCCTCACAGgtgtgg 31980
31981 cacacgccttgtttctgcgtcctgtgtcctccaactgccccctcctgagcctctctctgc 32040
32041 tcatctgtcaaatgggtacctcaaggtcggttgaaggactcatgagtcgggataaccata 32100
32101 cttttcttggatggacacatcagcagccgggcttgacattttaccaggttcccccttgcagc 32160
32161 ctgggttctctcttccggccccctgaagaggtgatctgatttctgacaggagccctgag 32220
32221 ggaggaaatgggtccccttgggtgacttttcttttctttattttttcttttgagatttg 32280
32281 ctgtcaccagcctggaatgcagtggtgccaatcttgggtcactgctacctctcccactgg 32340
32341 gttcaagcaattctcctgcctcagcctcccaagtagctgggattacaagcatgcgccacc 32400
32401 atgcctggcgaattttgtatttttagtacagacaggggttctccatgggtggccagctg 32460
32461 gtcttgaactcctgacctcaggtgatcctccacctctgcctcccgaagtgctacgatta 32520
32521 caggcatgagccaccgcgcccatcccccttgggtgacttttctcatcctctgagaaagtc 32580
32581 tcagttgaggccagcacctccctcaagtgaattgaatctcccttttgaacaacaacaaat 32640
32641 aacaatatgaccagacgtggtgggtcacacctgtggtcccagctactcgggaggtgag 32700
32701 gtgtgaggattgcttgagccaggaggtcaaggctacagagagctataatcacaccactt 32760
32761 cactccagcctggggacaaaagtgaacctgtctgtaaaaaacaaaaaaagaaaaggga 32820
32821 aaaagaacaaatagatcacaaagtagatattcatagtggtttatttttagtactcttttt 32880
32881 ttt 32940
32941 gcacgatcttgggtcactgcagcctctgcctcccaggttcaagcgttgggtcactgcaa 33000
33001 cctccgcctcctgggttcaagcgttcttctgcctcagcctcccagtagctgggactcat 33060
33061 aggcacgtcccactacgcccagctaattttttgtatttttttagtagagatggggtttcac 33120
33121 tatgttagccaggatggtctcgatctcctgacctcgtgatctgcctgccttgggtccca 33180
33181 aagtgttgggattatgggcatgagccactgcacctggccttttttttttttttttttttt 33240
33241 atggagtttctgctcttgggtggccaggtggagtgcaatgggtgtgatctcggtcactgca 33300
33301 acctctgcctcctgggttcaagcaattctcctgcctcagcctcccagtagctgggatta 33360
33361 caggcacctgccaccagcctggctaattttttgtacttttagtagagacggggtttctcc 33420
33421 atgttggtcaggctggtctcaactcctgacctcaggtgatccaccacctcggcctccc 33480
33481 aaagttctgggattacagacatgagccaccgcgcctggcgtgtctggccttttttagtt 33540
33541 atttcttt 33600
33601 gtgcagcgggtgcgatgtctgcgcactgcaagctccgccccctgggttcatgccattctcc 33660
33661 tgcctcagccttctgagtagctgggactgcaggcgcctgccactacgcccgggtactttt 33720
33721 ttgtatatatttagtagagatggagtttactgtgttagccaggatgggtctcgatctcctga 33780
33781 ctttgtgatccgcccgcctcggcctcccaaagtgtgggattacaggcgtgagccacct 33840
33841 gccagcttt 33900
33901 gagtgcagtgccatgatctcagctcactgcaagctccacttcccaggtcacgccattct 33960
33961 ccagcctcagcctcccaagtagctgagactacagggggccgccaccacactcggctaatt 34020

34021 tttttgtattttttagtagagacgggggtttcaccatggttagccagggtggtcttgaactcc 34080
 34081 taacctcaggcgattcacctgcctcggcctcccaaagtgtctgggattaaagggtatgagcc 34140
 34141 acctcgctggtgtgagccacctcgccagcctgagccacctcaccagcctaagccact 34200
 34201 gtgcctggcctgattttggactttttaaaaattttattaataatttttttgggttctt 34260
 34261 ttttttgagacagggtcttactctgtcatccaggccatcctgtctgtctgtcatcccagt 34320
 34321 gatgggatcataccttgcctgcagcctctacctcctgggctcaagcgatcctccccctca 34380
 34381 gcctcctgagtagctgggagtagcaggtgtgcaccaccacacctggctaatttttttttt 34440
 34441 ttttttgatatagagatgggtattttgccatggtgaccagggtagtcttaaactcctgga 34500
 34501 ctactcaagagatcctcctgccttggcctcccaagggtcatttgagactttcgtcattag 34560
 34561 gcgcacacctatgagaagggcctgcaggcacgtggcactcagaagacgtttattttattct 34620
 715 A E A A V A T Q E T S T V R L K V S
 34621 ttacagAGGCTGAGGCTGCAGTGGCCACCCAGGAGACATCCACCGTCAGGCTAAAGGTCAG 34680
 733 S T A V R T Q H T T T R P V P D T S R L
 34681 CTCCACAGCCGTAAGGACACAGCACACAACCACCCGACCTGTTCCCGAACCTCCCGGCT 34740
 753 P G A T P G L T T V E I V T M S H Q A
 34741 GCCTGGGGCCACCCCTGGGCTCACACGGTGGAGATAGTGACAATGTCTCACCAAGGtaa 34800
 34801 agactggggccctccctaggccctcttccaccagagacgggtcccttcagtggccacgaa 34860
 34861 cattttggtcagagatggagtccagggtgtcgtcctcactcccttgcctgaccttctctca 34920
 34921 cttgggcccgtgtgtctctgggcccctcagtttccctatctgtaaagtgggtctaataacag 34980
 34981 ttcttggcctctttgcaaggattaaatgggcccattcatatgaggggcccagggtccttcag 35040
 35041 gctcctgggttcccaaagtgcagccacgcaccgtgtgggtcccaaaattttatcaaggcaca 35100
 35101 ttcggtgcctcagcttcaggcatctgccccaaaaggccaggactaaggcaaggagaggga 35160
 35161 gggattcctcagtaactcagcttttcacagagggtccaaaagggttaagggaatccagtaacg 35220
 35221 ttttaacacaaattttacaaatttttttttttttgagacggagttttgccttgcctgcccaggc 35280
 35281 tggagtgcagtggcagcatctcggtcactgcacacctctgggtcccggttcaagcgatt 35340
 35341 ctccctgcctcagctctcccgagtgcgtgggattacaggcatgcgccaccacgctcgggtaa 35400
 35401 ttttgatatttttagtagagaaggggcttctctgttgggtcagggtggtcgtgaactctcaa 35460
 35461 cctcagggtgagccaccgcctgagcctcccaaagtgtctgggattacagggtgtgagccacc 35520
 35521 acgcctggccttttttttgagacagagtctcgtctcgcctcatgctgactgcagtgcagc 35580
 35581 cagctctgggctcactgtaacctccgcttcccagggttcaagtgattcttctgccgcagcct 35640
 35641 cccatgtagagtgcgtgggattacaggcaccgcaccatgctgggttaattcttgcatt 35700
 35701 ttttagtagagatgggggtttcacagtggtggccagggtggtctcaaaacttctgacctcaag 35760
 35761 tcatctgcctgccttggccctgcccagggtgtctgggattatagatgtgagccaccgcgct 35820
 35821 ggcctacagtttattcttgggtgggtcacacctgtaattctcagcactttgggaggccaag 35880
 35881 gtggggagaatggcttgagcccaggaggttcaagtcacagcctgggcaacatagcaagacct 35940
 35941 atctctactacaaaataaataaataaataaactaattttttttcttttaaaacccaactat 36000
 36001 tcaacatggcaatgcaatatattaaaaaaattttttttttctttgaaacggagctctca 36060
 36061 ctgtcaccgggggtggagtgcagtgctgcacctcttgggtcactgcaacctccgctccca 36120
 36121 ggtccaagtgttctcctgcttcagcctcccgagtagctgggattacaggcaccaccac 36180
 36181 catacccagctaataatttttgatatttttagtagagatgggggttccactatgttgggcagg 36240
 36241 ctgggtctggaactcctgacctcgtgatctgcccaggagatcggcgggcctcccaaagtgtctg 36300
 36301 gggattgcaggcatgagccaccgtgcccagccaaaacttttttatttttatttttttggg 36360
 36361 acacgggtcactgtgtaccccagactggagtgatagagtgcgtgcaggtcactgcag 36420
 36421 cctcaacctccctgggctcagggtgatcttccctgcttcagctctccagggtagctgggacta 36480
 36481 caggcatgagccaccacaccagctaatttttgatttttttgtagagacagggtttcac 36540
 36541 cttgtggcccagacttgtcttaactccagggtcgaagcagatctgccaccttggcctcc 36600
 36601 caaagtgtgagattaatgcaatttaaaaaatttttttggccaggcctggtgggtcatgcc 36660
 36661 tgtattcacaacaccttgggaggcgaagggtgggcagatcacttgagggtcaggagttcag 36720
 36721 actagctggccaacatggtgaaacccccctgtctactaaaaatacaaaaattacctgg 36780
 36781 gcacagtggtgggtgcctgtaatcccagctacttgggatgctgaggggtggagaattgctt 36840
 36841 gaacctgggaggcagaagttgcagtaagccaagatcatgccactggactccagcctcagt 36900
 36901 gacagagcaaaactctgtctccaaaaaaattgttttttttttttttttcaaatacatca 36960
 36961 cactacagccaaggcctggccacttacttttgtaataaagtttttattggagccagtgga 37020
 37021 ccagtgaggccgaatcttgcagggtgaagatcacagctctatccttgaaaattttgatatt 37080
 37081 ttgttcattgggtggttttttcatttaatttaatttttaaaaaataacataattaaaggctgg 37140
 37141 tgtggagggtgcacgcctgcagtcctagctactcccaggaggtgaggcgaggagacttgctt 37200
 37201 gagcccaagagttgaagtccagcctgggcaacatagcgagacccccatctctaaaaataa 37260
 37261 aaataatgcattagaatattattggattcctgggcaggggcacagtggtcacacctgtaa 37320
 37321 tcccagcactttgggagggtcagggtgggtggatcacctgagggtcaggagtttgagaccag 37380
 37381 cctggccaacatggtgaaacccccctctctactaaaaatacaaaaattagccaggcgtggt 37440
 37441 ggcaggtgcctgtaatccagctcctcgggagggtgaagcacgagaatcgcttgaaatcca 37500
 37501 ggaggcgagggttgagtgagctgagattgcgccattgcactccagcctggaggacaaga 37560
 37561 gtgaaactccattcccctctgcaaagaaaagggaatattatcagattcctaagctttttgg 37620
 37621 ctcccccttttagtttgggggctgggggtggtgagtgctgacctggcctcactgtcctccc 37680
 37681 tggatgtgatgagaccagggtgtgggtcaggatgtcattcgtttgtccaccagaggggcg 37740
 37741 ccaaactgctttgagctgtctgggaattggtgctcctagacttttagcaaaacaaacaaaa 37800
 37801 aaaatggcacatcggaatttcagaccattcttttttttttttttttttgggttccagagt 37860
 37861 agctgaaatctttgttcagttacaagcaggataaaaatggaaactgcctgggagagggtga 37920
 37921 gaaaccttcttgccttggggggagggtggggcactgctagaattaatcgcttcacagaccagc 37980

Exon 15

37981	ccatccaggactcctcaaatttggcaaaaaagccattcattcattcattcattttagtag	38040
38041	agacgaggggatctggctatatattgcctagattgggtctcaaattcctggcctcaagtgat	38100
38101	cctcctgccttgggtctactaatgtgctgagattacagggcatgagccaccgtgcctagctc	38160
38161	tagtggacttgaaatgttgcccttggccagggcccttatgttgaaatggccaggtccactt	38220
38221	gtatggttctgtaccaaggttaacccccatcccataatgcctgggacagttgatgcaggac	38280
38281	aatcagcttctgtgccattcaacctcaggactgagcatgctgggcattgtggggccgaa	38340
38341	ggtagctccctgtccccttcaaaataccctcttttcttttcttttcttttcttttctttt	38400
38401	ttttttttgagacgaagtcttgctctgttgccccagctagagtgagtggtgcatctca	38460
38461	gctccccgcaacctctgcttccgggttcaggcgattctcctgcctcagcctcctgagta	38520
38521	gctgggattacaggtgccaccgccacagctggctaattttttagttagtagagaca	38580
38581	gggtttcaccgtgttgccaggtggtcttgaactcctgacctcaggcaacctgccacc	38640
38641	tcagcctcccaaagtgtgggattacaggtttgagccactgggcctggcctttttttttt	38700
38701	ttttttgagagggagtcctcactctgttgcccaggtggagtgcaatggcgcatcttgac	38760
38761	tcactgcaactccatttccgggttcaagtgttctcctccctcagcctcccaagtagct	38820
38821	gggattacaggtgcatgccaccacggccagctaatttttagttagtagagacaggt	38880
38881	ttcactatgttgatcatgctgggtctcaaactcctgaccttaggtgatctgccgccttag	38940
38941	cctcccaaagtgttggtgattacaggtgtgagccaccgcgccagaccaaaatatgctcat	39000
39001	tttaataaaaatgcacaagttaggttgacaagaatttcacctgcaacctgtcaaccaccta	39060
39061	gaataaaaagcctctgcagccctcccccttggaggtcaagaaccttc	39120
39121	ttaggtctgggtcgttggtctatttc	39180
39181	ggatctcttgaggccaggagttcaagacaagcctgggcaacatagccagacctctgtttc	39240
39241	tatccccacaaaaagaaccttcttaaacgggaattgagtcctacaacctcgataactca	39300
39301	caaataagcccgtgtggcctctc	39360
39361	tgccagggcgctttcctgccgtgaccaccgtcctctgctcctcatttcttggtggcctt	39420
772	L G D V A G R	
39421	ccttttagacctgggcctcactcttgcttctcctgcagCTCTGGGCGACGTTGCTGGCA	39480
779	G N E K K P S S V R A L S I V L P I V	
39481	GAGGAAATGAGAAGAAGCCAGTAGCGTGAGGGCTCTGTCCATTGTCTCTCCCATCGGta	39540
39541	agcgcgggccgggtccccagcgtccccaggtcacagcctcc	39600
39601	ctggctggttgggcctgttcactttttctcctggacaggggaacagcccactggtgtcct	39660
39661	ttatcacccccacggcctctcctggctggggtgacagtgacaagatcagacagcttaag	39720
39721	gggtcagatggaggatgtggagctgggtcccgctgctgtggaat	39780
39781	agtgccttctggggaaactggttcccttgcagggggctgtgtgg	39840
9841	gcctcaccatgctcatcctaactcgggtaccatcacatctct	39900
39901	aattttaagaaaaaagaaattttaatttttttgagagacagagtccttgcctctgtcaccag	39960
39961	gctggagtgcagtgccaccatcatgcctcgtgcagcctcaatgtctgggtcaagcgat	40020
40021	cctcccacctcagcctcctgagtagctggtgcaagccactatacccacttctatttct	40080
40081	taaaaagtacagccctgtgtgtggctaatacctggacagaaatctagaagaagtcagcta	40140
40141	cttctggggcggtggctcaccagtggttccaggttagatatttcttatacttatgaggc	40200
40201	tgggtgtggtggcttatgcctgtaatcccagcactttgggaggtgaagtgggtggattg	40260
40261	cttgggtcaggagttcgagaccaacctgggcaacatggcgaaacctgtttctagaaaa	40320
40321	ggtacaaaaatttagctgggcaggtggcacgtgcctgtggtaccagctacttgagggcctg	40380
40381	aggcaggagatcgcttgaacctggaggtcgaggttgcagtgaaactgagatcatgtcac	40440
40441	tgactccagcctggtgacagagcaagaccccgctcaaaaaaaaaaaaaagaaagaaaa	40500
40501	aattcttatgcatagatttgccctcttttctgtttgtttgttttgagatggagtctcgctc	40560
40561	tgtcgccaggtgagtagacagtggtcaacctcggtcactgcaacctctgcctcccg	40620
40621	gttcaagcaattctcctgcctcagcctcctgagtagctgggactacaggcgcccgccacc	40680
40681	atgccagctaatttttgtatttttagtagagactgactgggtttcatcatgttgccag	40740
40741	gctggtctgaactcttgacctcatgacgcgcgcctcagcctcccaaatgtggtggat	40800
40801	tacaggcgtgagccaccagggccagggcgcaaggcgatctctaacaacataaaagacc	40860
40861	aggagtcaaggttatggtacgatgcccggtgttttctcctcagccacggagctgggtctct	40920
798	L L V F L	
40921	ggctctgggggagctgtgtgacagagcgtgcctctccctacagTGCTCCTCGTCTTCCT	40980
803	C L G V F L L W K N W R L K N I N S I N	
40981	TGCTGGGGGTCTTCTTCTATGGAAGAACTGGCGGCTTAAGAACATCAACACATCAA	41040
823	F D N P V Y Q K T T E D E V H I C H N Q	
41041	CTTTGACAACCCCGTCTATCAGAAGACCACAGAGGATGAGGTCCACATTTGCCACAACCA	41100
843	D G Y S Y P S	
41101	GGACGGCTACAGCTACCCCTCGgtgagtgacctctctagaaagccagagcccattggcgg	41160
41161	ccccctccagctggaggcatatgatcctcaagggaccagggccttccccagcct	41220
41221	ccagatcgaggacagcattagtggaatggtctgtgcgtcattcagaatgtcagcggac	41280
41281	aatggccttgggtggtgtagaggaatgttggaataagcaaatagagagctccatcagatggt	41340
41341	gacaggggcaaaagaaagtcaaaaggagttcagaggccgggcgcggtggctcatgcctgtaa	41400
41401	tcccaggactttgggaggccgaggtggcggtacacctgaagttaggagtttagaccag	41460
41461	cttggccatcatgacaaaaccccgctctctattaaaaatacaaaaaatttagccaggcggtg	41520
41521	gagtgggcgctgtaatcccagctactcgggagggcagggtagaaaaatcgcttgaacct	41580
41581	aggaggcagaggttgagtgagcggagatcgcgccactgattccagcccggaag	41640
41641	agcaaaactccatctaaaaaaaaaaaaaaaaaggagttcagaggcccggtggtggttc	41700
41701	acacatgtgatccagaacttggggaggttgaggcaggagaatcacctgagctcagagtt	41760

Exon 16

Exon 17

41761 caagaccagcctgggcagcacagcaagaccccatctctgcaaaaaataaaaaatttagccc 41820
 41821 agtgtggtgatgagcgctagttccagctactagggaggctaaggcaggaggattgcttg 41880
 41881 aggctaaggtaggagattgagactgcagtgaacttgtgattgcgtcaactgcgctccagcct 41940
 41941 ggggtgacagagcaagcccttgtctcttaaaaaaaaaaaaaaaaaattcaagaagggtttcca 42000
 42001 gagggccaggaggaggaggaaggaggaggtgttttttttttttgccttttttttttttatt 42060
 42061 ttgagacagagtctctctctgtcaccaggttggagtgcagtgtctgtgatcttggtcac 42120
 42121 tgcacttctgcctcctgggttcaagcaattcttatgcctcagcctcagcctcctgagta 42180
 42181 gctgggattacaacactatgccgggtaattttttgtatttttagtagagacgaggtttcg 42240
 42241 ccatgttgcccagactggtctcgaactcctgacctcaagtgatccaccgccttggcctc 42300
 42301 ccacgtgctgggattgcaggcctgagccactgcgcccgccttgatctttacacaagggg 42360
 42361 tttagggtaggtagc **IVS17-42A>G** gagaacagcctgtgcgaaggccctgaggctg 42420
 42421 gaccgtgctgttgggtttgaggctgtttagctggagcaaacagagagagggttaaaaa 42480
 42481 ggcaggaggctaccaggcaggttgtgcagagccttgtgggccactggggaggactttggc 42540
 42541 ttttgcctgagagcgggtgggaagtgaatccggtaactgcgcgg 42600
 42601 ctcttgggggaacatgcttggggatcaggtctgggggaggctg ***52G>A** gag 42660
 42661 aagtaggtggcctccagcctgtttcctgaatgctggactgatagttccgctgtttacc 42720
 850 R Q M V S L E D D V A *
 42721 atttgttggcagAGACAGATGGTCAGTCTGGAGGATGACGTGGCGTGAacatctgcctgg 42780
 42781 agtcccgtccctgccagaacccttctgagacctgcgcggccttgtttttattcaagac 42840
 42841 agagaagaccaaagcattgcctgccagagctttgttttatatatttattcatctgggagg 42900
 42901 cagaacaggtcttcggacagtgcccatgcaatgggttgggtttgggttttcttctcct 42960
 42961 ttctctctgaaggataagagaaacaggcccggggggaccaggatgacacctccatttctc 43020
 43021 tccaggaagttttgagtttctctccacgtgacacactctcaaatggaagatgaaag 43080
 43081 gggaggggatgtcaggccacagagaagcaagtgc ***105T>G** acagcagatggcac 43140
 43141 caacggggccccctggcctgcctcatccacctcttcaagccadaccctaaactcag 43200
 43201 ***141G>A** gtgtttacctcttctatgcaagccttgcctagacagccaggttagcctttgcc 43260
 43261 ctgtcaccctccgaatcatgaccacccacgtgtctttcagaggtgggtttgtaccttctta 43320
 43321 agccaggaaagggttcatggcgtcggaaatgatctggctgaatccgtggtggcaccgag 43380
 43381 accaaactcattcaccaaattgatgccacttcccagaggcagagcctgagtcactggtcac 43440
 43441 ccttaatatatttaagtgcctgagacaccgggttaccttggccgtgaggacacgtggcc 43500
 43501 tgcaccaggtgtggctgtcaggacaccagcctgggtgccactctcccagaccctacca 43560
 43561 ctctcattcccggtggtctccttgcactttctcagttcagagttgtacactgtgtacattt 43620
 43621 ggcatttgtgttattatttttgcactgttttctgtcgtgtgtgttgggatgggatcccagg 43680
 43681 ccagggaagcccgtgtcaatgaatgccggggacagagaggggcagggttgaccgggactt 43740
 43741 caaagccgtgatcgtgaatatcgagaactgccattgtcgtctttatgtccgcccacctag 43800
 43801 tgcctccacttctatgcaaatgcctccaagccattcacttccccaatcttgcgttgatg 43860
 43861 ggtatgtgttttaaacatgcacggtgagggcgggcaggtgggtcagcctgtaatccca 43920
 43921 gcactttgggaggccgaggcgggtggatcatgaggtcaggagatcgagaccatcctggct 43980
 43981 aacacgtgaaaccccgtctctactaaaaatacaaaaaatttagccgggcgtggtggcgggc 44040
 44041 acctgtagtcccagctactcgggagggtgaggcaggagaatggtgtgaaccgggaagcg 44100
 44101 gagcttgcaagtgcgcgagattgcgccactgcagtcgcagctctggcctgggcgacagag 44160
 44161 cgagactccgtctcaaaaaaaaaaaaaacaaaaaaaaaccatgcatggtgcatcagcagccc 44220
 44221 atggcctctggccaggcatggcgaggctgaggtgggaggtggtttagctcaggtcattt 44280
 44281 gaggtgtcgtgagctatgattatgccactgctttccagcctgggcaacatagtaagacc 44340
 44341 ccatctcttaaaaaatgaatttggccagacacaggtgcctcagcctgtaatcccagcac 44400
 44401 tttgggaggctgagctggatcacttgagttcaggagttggagaccaggcctgagcaacaa 44460
 44461 agcgagatcccattctacaaaaacaaaaagttaaaaatcagctgggtacggtggcacg 44520
 44521 tgctgtgatcccagctacttgggaggctgaggcaggaggtgcctgagcccaggaggt 44580
 44581 gtaggttgagtgagccatgatcgagccactgcactcagcctgggcaacagatgaagac 44640
 44641 cctatttcagaaatacaactataaaaaataaataaatcctccagctcggatcgtttgac 44700
 44701 gggacttcagggttctttctgaaatcgccgtgttactgttgcactgatgtccggagagaca 44760
 44761 gtgacagcctccgtcagactcccgcgtgaagatgtcacaagggttggcaattgtcccca 44820
 44821 gggacaaaacactgtgtccccccagtgaggggaaccgtgataagcctttctgggttcgg 44880
 44881 agcacgtaaatgcgtccctgtacagatagtggggattttttgttatgtttgcactttgta 44940
 44941 tattgggtgaaactgttatcacttatatatatatataacacacatatataaaaatcta 45000
 45001 tttattttttgcaaacctggttgcgtgtattttgttcagtgaactattctcggggccctgtgt 45060
 45061 aggggggttattgcctctgaaatgcctcttctttatgtacaaagattatttgcacgaactg 45120
 45121 gactgtgtgcaacgctttttgggagaatgatgtcccgttgtatgtatgagtggtctctg 45180
 45181 ggagatgggtgtcactttttaaacactgtatagaagggttttttagcctgaatgtctta 45240
 45241 ctgtgatcaattaaatttcttaaatgaaccaatttgcctaaactcgatgcacgttcttct 45300
 45301 gttcgcgcgtcttttttttttttttttttctgagatggagcctggctcgtcacc 45360
 45361 ctggctggagtgagtggtgatctcggcttactgcaagctccgcctcccagggttcaag 45420
 45421 caattctcctgcctcagcctccctagtagctaggattacagggtgagtgccaccacgcctg 45480
 45481 gccaattttttttttttttttttttttgagacagagctctcgtctgtcaccacaggctgga 45540
 45541 gtgcagtggtgtgatctcggctcactgcaagctcgtgcctcccagggttaatgccattctcc 45600
 45601 tgtctcagcctcctgagtgcgtggggccacaggccctgccaccacgcccggctaatttt 45660
 45661 tttttgacttcttttagtacagacggggtttccactgttagccaggatggtctcgatc 45720
 45721 tccctgaccttgtgatccacctgcttcggcctcccaagtgctgagattacaggcgtgagc 45780
 45781 caccgcgggtggccaacgctaattttttttgttttttttagatggagttctgtctgtcgcc 45840

Exon 18

45841	caggctggagtgacagtggcgtgatctctgcctactgcaagctccgcctcccgggttcacg	45900
45901	ccattctcctgcctcagcctcctgagtaactgggactacaggcaccgcaccacgcccg	45960
45961	gctaattttttgtatttttagtagagacagggtttcaccgtgttagccaggatggtcttg	46020
46021	atctcctgaccttgatccaccgtctcggcctcccaaagtgctgggattagaggtgtg	46080
46081	agccaccacacctggcctagcctggctaattttgtatttttggtagagacggggtttca	46140
46141	ccatgttggtcaggctggtcttgaacttctgacctcaggtaatctgcctgcctcagtcctc	46200
46201	ccaaagtgctgggattacagggtgtgagccaccgcgcctggcctcacttccttctgtcatc	46260
46261	tgtttg	46266

CLÍNICA						MUTAÇÕES															
sDAC3***	CT*	Pacientes	Sexo	Idade	Etnia	Exon 4	Intron 6		Exon 11	Intron 11			Exon 12	Exon 15	Intron 15	Intron 16	Intron 17	3'UTR (Untranslated Region)			
						D115D	IVS6+36G>A	IVS6+171G>A	P518L	IVS11+56C>T	IVS11-69G>T	IVS11-55A>C	N570N	D727G	IVS15-136A>G	IVS16+46C>T	IVS17-42A>G	*52G>A	*105T>G	*141G>A	TOTAL
+	307**	1	F	83	Port							A/C	C/T	G/A	G/G		A/G				5
-	680	2	F	60	Port							A/C		G/G	G/G			G/A			4
-	290	3	F	77	Espa					C/T	G/T	A/C		G/A	G/G	C/T		G/A			7
+	328**	4	M	56	Port																0
-	280	5	M	51	Ital				C/T	C/T	G/T				G/G		A/G	A/G	T/G		7
+	314**	6	M	52	Port									G/G	G/G				T/G		3
+	306**	7	M	70	Alem								C/T		G/G				T/G		3
+	293**	8	M	53	Port									A/G	A/G		A/G		T/G		4
-	400	9	F	34	Polo							A/A	C/T		G/G	C/T		A/G	T/G		6
-	290	10	M	44	Polo									A/G	G/G		A/G		T/G		4
-	311	11	M	53	Port		G/A	G/A		C/T	G/T	A/A			G/G	C/T	A/G	A/G		G/A	10
+	286	12	F	74	Espa					C/T	G/T		C/T		G/G		G/G				5
+	360	13	M	71	Alem								T/T		G/G		G/G				3
-	307	14	M	56	Polo								T/T	G/G							2
-	287	15	F	19	Alem							A/A		G/A			A/G				3
+	603**	16	M	52	Port							A/A			G/G	T/T		A/A	T/G		5
-	320	17	M	57	Ital							A/C	C/T		G/G		A/G				4
+	305	18	M	56	Port								T/T		G/G				T/G		3
+	336**	19	M	55	Alem		G/A			C/T	T/T		C/T		G/G		G/G				6
+	348**	20	F	70	Ital					C/T	G/T		C/T	A/G				A/G	T/G		6
+	363**	21	F	76	Port				C/T	C/T	G/T		C/T		G/G		A/G				6
-	290	22	M	50	Polo	C/T				C/T	G/T		C/T				A/G				5
+	304	23	F	55	Ital	T/T	A/A	A/A		C/T	T/T			G/G	G/G		G/G		T/G	G/A	10
-	287	24	M	48	Espa					C/T					A/G				T/G		3
+	297	25	F	68	Alem										G/G	C/T		A/G	T/G		4
+	250**	26	F	62	Port							A/C	C/T		G/G		A/G				4
+	310**	27	F	56	Leto								T/T		G/G		G/G		T/G		4
+	350**	28	F	76	Port		G/A	G/A			G/T	A/C					A/G			G/A	6
+	271**	29	F	70	Alem								T/T				G/G				2
+	370**	30	M	59	Ital												G/G				1
+	290	31	F	69	Alem								T/T		G/G						2
+	363**	32	F		Port							A/A		G/G	G/G	T/T		A/A			5
-	290	33	M	47	Espa									G/G			G/A	G/A			3
+	270**	34	F	71	Leto								C/T		G/G		G/G		T/G		4
+	302**	35	M	72	Ital				C/T	C/T	G/T	A/C		G/G	G/G		C/T				7
-	408	36	F	61	Ital											T/T					1
-	310	37	F	46	Espa									G/G							1
-	340	38	F	54	Ital										G/G		A/G				2
-	290**	39	M	49	Polo																0
+	365	40	F	78	Leto										G/G						1

*Colesterol total
** Com uso de estatinas
***Sintomas de doença arterial coronariana

Inauguração do Monumento ao Imigrante, na cidade de Caxias/RS, em 28 de fevereiro de 1954.

Homenagem aos Imigrantes de todas as etnias.

Fonte: Enciclopédia Riograndense