**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

KARINA ALVES DA SILVA VASCONCELOS

**Identificação de mutações no gene do receptor da lipoproteína de baixa densidade
(*LDLR*) em pacientes com hipercolesterolemia familiar**

Ribeirão Preto

2015

KARINA ALVES DA SILVA VASCONCELOS

**Identificação de mutações no gene do receptor da lipoproteína de baixa densidade
(*LDLR*) em pacientes com hipercolesterolemia familiar**

Tese de doutorado apresentada ao Departamento de
Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Clínica Médica.

Área de Concentração: Investigação Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior

Versão Corrigida
(versão original disponível na secretaria da CCP-CM)

Ribeirão Preto

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Vasconcelos, Karina Alves da Silva

Identificação de mutações no gene do receptor da lipoproteína de baixa densidade (*LDLR*) em pacientes com hipercolesterolemia familiar. Ribeirão Preto, 2015.

84p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Clínica Médica. Faculdade de medicina de Ribeirão Preto/USP.

Orientador: Silva Junior, Wilson Araújo.

1. *LDLR*. 2. Mutações. 3. Estudos funcionais

FOLHA DE APROVAÇÃO

VASCONCELOS, Karina Alves da Silva

Identificação de mutações no gene do receptor da lipoproteína de baixa densidade (*LDLR*) em pacientes com hipercolesterolemia familiar

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em Clínica Médica

Área de Concentração: Investigação Biomédica

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Agradecimentos

Agradeço...

A Deus que me deu serenidade para suportar as etapas mais difíceis

Ao meu tão amado filho Pedro Vasconcelos, por ter me confiado a honra de ser a sua mãe

À minha mãe Vera Alves, por ser minha fortaleza; ao meu marido Flávio Vasconcelos, pelo amor e companheirismo e à minha família, em especial, à minha saudosa tia Maria Edith Azevêdo, pelas orações e proteção

Às amigas de Recife: Vanessa Faria, Máira Mafra, Jaqueline Azevêdo, Andrezza Barros, Vanessa Cavalcanti e Renata Cavalcanti, pela motivação

Ao Dr. Edgard Pessoa de Melo Junior, por ser meu grande mentor nesta vida

Ao Prof. Dr. José Ernesto dos Santos, pela confiança e oportunidade de realizar um grande sonho

Ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior, pela orientação, apoio e compreensão

Ao Prof. Dr. Raul Dias, pela inestimável ajuda no projeto

Às amigas do laboratório de Lípidos: Sônia, Luísa e, em especial, à Júlia Keiko pelo carinhoso acolhimento e exemplo de determinação

Aos amigos do laboratório de Genética Molecular: Rafaela Bueno, Aline Simoneti Fonseca, Bruna Ferreira, Bruna Muys, Carolina Arruda, Daniel Fantozzi, Eduarda Morgana, Isabela Ichiara, Júlio Lorenzi, Nathália Cury, Willys Tristão, Dalila Zanette, Adriana Marques, Ana Júlia Machry, Anemari Dinarte, Cristiane Ayres, Greice Molfetta e Kamila Perroni, pela maravilhosa convivência e ajuda que recebi desde o início do doutorado

À Luíza Araújo pela amizade dentro e fora do laboratório e que será por toda a vida

Aos meninos do BIT Daniel Guariz, David Marco Antonio, Jorge Estefano Santana de Souza, Marcelo Gomes, Matheus Carvalho Bürguer, pela constante disposição em ajudar

Aos amigos da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto: Meire Tarlá, Dalvinha, D. Alice, Everton Brito, Lilian Figueiredo, Hudson Bezerra e Maristela Delgado, pelo carinho e por me amparar em diversas situações

Aos amigos do InCor: Carol Watanabe, Luciana Turolla e Viviane Rocha, pela incrível dedicação.

Ao Prof. Dr. Alexandre Pereira e Profa. Dra. Cinthia Ellin, pela colaboração na pesquisa

Ao Emerson Quirino, por todos os anos de ajuda e conselhos

Ao Departamento de Clínica Médica e à Fundação Hemocentro, pela excelente infraestrutura

À Dayane Scandiusse, Gabriela Carvalho, Júlia Sanches, Lilian Villas Boas, Ana, Lúcia e Shirlene, por serem minha família em Ribeirão Preto

Aos queridos pacientes de hipercolesterolemia familiar e ao grupo controle, pela participação no projeto

À CAPES pelo auxílio financeiro e incentivo à pesquisa

RESUMO

VASCONCELOS, K. A. S. **Identificação de mutações no gene do receptor da lipoproteína de baixa densidade (*LDLR*) em pacientes com hipercolesterolemia familiar**. 2015. 84f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2015.

Hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença autossômica dominante, caracterizada por elevados níveis plasmáticos da lipoproteína de baixa densidade (LDL), desenvolvimento de xantoma tendíneo e arco corneal, além do aumento do risco de doença coronariana e acidente vascular cerebral prematuros. Frequentemente subdiagnosticada, estima-se que apenas 10% dos 400.000 indivíduos com HF no Brasil têm conhecimento da própria doença; afetando, desta forma, a qualidade e a expectativa de vida dos pacientes. Mutações no gene do receptor da LDL (*LDLR*) são consideradas as alterações genéticas mais frequentes para o desenvolvimento da hipercolesterolemia familiar, pois comprometem a capacidade de remoção das partículas de LDL circulantes, promovendo seu aumento em níveis plasmáticos. Já foram descritas mais de 1600 mutações diferentes no gene *LDLR* associadas ao fenótipo da HF; entretanto, ainda é difícil determinar em muitas delas o efeito deletério na atividade do receptor. O objetivo desse estudo foi identificar e caracterizar funcionalmente mutações no gene *LDLR* não descritas na literatura para determinar sua patogenicidade na hipercolesterolemia familiar. Foi avaliada a atividade residual de *LDLR* através da captação de LDL marcado com fluoróforo lipofílico em cultura de linfócitos T dos pacientes portadores das mutações analisadas após estimulação dos linfócitos T por mitógenos específicos. A mutação Asp168Ala foi identificada pela primeira vez neste estudo. As mutações Cys82Ser, Thr404Ser, Gly529Arg e His285Tyr acarretaram diminuição da atividade residual do receptor de LDL. As mutações Glu 602X e His388ProfsX53 confirmaram sua patogenicidade e podem ser considerados como controle positivo para futuros ensaios funcionais. Estudos que esclareçam os mecanismos moleculares da HF e da relação genótipo/fenótipo abrem perspectivas para o desenvolvimento de terapias mais específicas na redução dos níveis de colesterol e, consequentemente, da morbidade e mortalidade associadas às doenças cardiovasculares.

Palavras-Chave: *LDLR*, mutações, Hipercolesterolemia familiar, estudos funcionais, patogenicidade.

ABSTRACT

VASCONCELOS, K. A. S. **Identification of mutation in the low density lipoprotein receptor gene (*LDLR*) in familial hypercholesterolemia patients.** 2015. 84f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2015.

Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant disorder characterized by elevated plasma levels of low-density lipoprotein (LDL), and development of corneal arcus tendinous xanthoma, and increased risk of coronary heart disease and premature stroke. Often misdiagnosed, it is estimated that only 10% of the 400.000 patients with FH in Brazil has knowledge of the disease itself, affecting in this way the quality and life expectancy of patients. Mutations in the LDL receptor (*LDLR*) are considered the most frequent genetic alterations for the development of familial hypercholesterolemia because compromise the ability of removal of circulating LDL particles, promoting its increase in plasma levels. Have been described over 1600 different mutations in the *LDLR* gene associated with the phenotype of FH, however, it is still difficult to determine in many of the deleterious effects on receptor activity. The aim of this study was to identify mutations in the *LDLR* gene and functionally characterize mutations not described in the literature to determine its pathogenicity in familial hypercholesterolemia. The residual activity of LDLR was evaluated by raising LDL labeled with lipophilic fluorophore in cultured T lymphocytes of patients with the analyzed mutations after stimulation of T lymphocytes by specific mitogen. The Asp168Ala mutation was first identified in this study. The substitution mutations Cys82Ser, Thr404Ser, Gly529Arg e His285Tyr caused decreased of the residual activity of the LDL receptor in T lymphocytes. The His388ProfsX53 and Glu602X mutations confirmed their pathogenicity and can be considered as positive control for future functional assays. Studies to clarify the molecular mechanisms of HF and genotype/phenotype open perspectives for the development of more specific therapies for reducing cholesterol levels, and therefore the morbidity and mortality associated with cardiovascular diseases.

Keywords: *LDLR* mutations, familial hypercholesterolemia, functional studies, pathogenicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Xantoma no tendão de Aquiles em portador de HF homozigótica	18
Figura 2-	Xantelasmas extensos nas quatro pálpebras	18
Figura 3-	Representação esquemática do LDLR com seus 18 éxons e 5 domínios	20
Figura 4-	Representação esquemática da Via Receptor LDL	21
Figura 5-	Gel de agarose representativo da qualidade dos produtos da PCR referentes à amplificação do fragmento de 179 bp do éxon 6 do gene LDLR	32
Figura 6-	Esquema ilustrando a temperatura de <i>melting</i> de uma sequência normal e outra com mutação.	33
Figura 7A-	Curvas de melting específicas para cada genótipo identificado no éxon 7 do gene LDLR	34
Figura 7B1-	Resultado do sequenciamento de uma amostra com a mutação Glic343Ser em heterozigose	34
Figura 7B2-	Resultado do sequenciamento de uma amostra com genótipo normal	34
Figura 8-	Representação da estimulação de células mononucleares de sangue periférico com diferentes meios e mitógenos em 24 horas e em 48 horas	36
Figura 9A-	Resultado do sequenciamento de uma amostra com a mutação Asp168Ala em heterozigose	41
Figura 9B-	Representação esquemática da localização do éxon e domínio da mutação Asp168Ala	41
Figura 10-	Representação da atividade residual do <i>LDLR</i> entre pacientes e controles	45
Figura 11-	Representação da atividade residual do <i>LDLR</i> entre pacientes e controles pareados por idade e sexo	46
Figura 12-	Representação da atividade residual do <i>LDLR</i> entre pacientes e controles totais e pareados por idade e sexo	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Mutações identificadas do gene <i>LDLR</i>	39
Tabela 2	Verificação da descrição e patogenicidade das mutações	41
Tabela 3	Verificação da descrição e patogenicidade das mutações do estudo funcional	43
Tabela 4	Médias e medianas da intensidade de fluorescência e atividade residual em pacientes HF	44
Tabela 5	Médias e medianas da intensidade de fluorescência e atividade residual em controles	45
Tabela 6	Médias e medianas da intensidade de fluorescência e atividade residual em pacientes e controles pareados por idade e sexo	46

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

Ala	Alanina
APOB	Apolipoproteína B
APOB-100	Apolipoproteína B-100
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
CT	Colesterol total
Cys	Cisteína
DCV	Doença cardiovascular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGF	Fator de crescimento epidermal
FBS	Soro bovino Fetal
Gln	Glutamina
Glu	Ácido Glutâmico
Gly	Glicina
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDL-C	Lipoproteína de alta densidade-colesterol
HF	Hipercolesterolemia familiar
His	Histidina
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HRM	High Resolution Melting
IDL	Lipoproteínas de densidade intermédia
IMDM	Meio modificado de Iscove de Dulbecco
Kb	Kilobase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-C	Lipoproteína de baixa densidade- colesterol
LDLR	Receptor de LDL
LDLRAP1	Proteína adaptadora 1 do receptor de LDL

Leu	Leucina
LP(a)	Lipoproteína (a)
LPDS	Soro deficiente em lipoproteína
Lys	Lisina
Met	Metionina
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PCSK9	proteína convertase subtilisina kexina tipo 9
PMA	Acetato de miristato de forbol
Pro	Prolina
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
Ser	Serina
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Val	Valina

SUMÁRIO

1. Introdução	15
1.1-Doenças Cardiovasculares, Colesterol e Lipoproteínas	16
1.2-Hipercolesterolemia Familiar: Aspectos Clínicos e Genéticos	17
1.3-LDLR: Do Gene à Proteína	19
1.4-Metabolismo Lipoproteico: Via do Receptor de LDL	21
1.5-Estudos Genéticos do <i>LDLR</i>	22
2. Justificativa	24
3. Objetivos	27
3.1- Objetivo Geral	28
3.2- Objetivos Específicos	28
4. Material e Métodos	29
4.1-Material	30
4.2- Métodos	30
4.2.1-Coleta do Material Biológico	30
4.2.2- Extração do DNA	31
4.2.3- Reação em Cadeia da Polimerase	31
4.2.4- High Resolution Melting (HRM)	32
4.2.5- Sequenciamento de DNA	33
4.2.6- Isolamento de Células Mononucleares	35
4.2.7- Estimulação de Linfócitos T	35
4.2.8- Captação de LDL Marcado	36
4.2.9- Análises Estatísticas	37

5. Resultados	38
5.1- Detecção de Mutações por HRM	39
5.2- Identificação de Mutações por Sequenciamento de DNA	39
5.3- Estudo Funcional para Determinação de Patogenicidade	44
6. Discussão	48
7. Conclusão	52
8. Referências	54
9. Anexo	62
9.1- Primers do gene <i>LDLR</i> utilizados	63
9.2- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	64
9.3- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	66
10. Artigo da tese	67

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1-Doenças Cardiovasculares, Colesterol e Lipoproteínas

A doença cardiovascular (DCV) é considerada a principal causa de morte no mundo. Estima-se que em 2030 cerca de 23,6 milhões de pessoas morrerão de doenças coronárias ou acidente vascular cerebral, pela incidência cada vez maior de obesidade e diabetes no ocidente. No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde de 2006, foram registradas aproximadamente 300 mil óbitos em decorrência de doenças cardiovasculares, representando quase 30% do total de mortes registradas no país (MURRAY, 1997; SPOSITO, 2007; LLOYD-JONES, 2009; WHO, 2011).

Um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares é o nível elevado de colesterol que pode levar ao desenvolvimento da placa aterosclerótica. A formação da placa ateromatosa é precedida pelas estrias gordurosas, originadas pelo acúmulo de lipoproteínas nos vasos endoteliais após injúria, que ao sofrerem oxidação, induzem a uma resposta inflamatória promovendo mais lesões e ao depósito maior de lipoproteínas. A progressão do ateroma é um mecanismo complexo que envolve as células sanguíneas, do endotélio vascular, do músculo liso, entre outras, podendo comprometer a circulação e levar à isquemia do tecido coronário (LIBBY & THEROUX, 2005; LIBBY *et al.*, 2011; STANCU *et al.*, 2012)

O colesterol, similarmente aos demais lipídeos presentes no organismo humano, tem propriedade hidrofóbica e precisa ser transportado através de complexos lipoprotéicos, denominados lipoproteínas. As lipoproteínas variam significativamente em tamanho, composição e densidade, sendo classificadas em lipoproteína (a) [Lp(a)], quilomícrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermédia (IDL), lipoproteínas de alta densidade (HDL) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (HAVEL *et al.*, 1995; RIFAI *et al.*, 1999).

As VLDL, quilomícrons e IDL são responsáveis principalmente pelo transporte de triglicerídeos, enquanto que as HDL e LP(a) pelos fosfolipídios e as LDL pelos ésteres de colesterol. As lipoproteínas apresentam uma região central de lipídios não polares (triglicerídeos e ésteres de colesterol) revestida por uma monocamada de lipídios polares (fosfolipídios e colesterol livre), contendo uma ou mais

apolipoproteínas específicas na superfície. A LDL é composta principalmente por colesterol e pela apolipoproteína B-100 (apoB-100) e está proporcionalmente associada aos níveis de colesterol no sangue e responsável pelo seu fornecimento para os tecidos periféricos (RIFAI *et al.*, 1999).

A hipercolesterolemia geralmente resulta de fatores ambientais, como dietas ricas em gorduras saturadas e/ou alterações em genes envolvidos no metabolismo das lipoproteínas (HOOPER *et al.*, 2012).

1.2- Hipercolesterolemia Familiar: Aspectos Clínicos e Genéticos

A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença autossômica dominante caracterizada por alterações no metabolismo dos lipídios desde o nascimento. Essas alterações levam à falha na remoção da LDL circulante, ocasionando uma maior permanência desta lipoproteína no organismo, deixando-a sujeita a várias modificações químicas que podem deflagrar mecanismos pró-aterogênicos (BROWN & GOLDSTEIN, 1986; SALAZAR *et al.*, 200; DANIELS *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012). A HF foi a primeira doença de base genética a ser reconhecida como uma das causas do infarto do miocárdio, sugerindo uma correlação positiva entre dislipidemias e doença cardiovascular (MÜLLER, 1938).

As presenças de xantomas, xantelasmas e doença coronariana precoce também estão clinicamente associados à HF (GOLDSTEIN *et al.*, 1995). Xantomas são lesões cutâneas decorrentes do acúmulo de derivados do colesterol na pele, típico de alterações no metabolismo lipídico. Xantelasma é um tipo de xantoma comumente visualizado na pele das pálpebras, próximo ao nariz, já o xantoma tendíneo, caracteriza-se por deposição de lipídios sobre os tendões abaixo do tecido cutâneo e é a forma mais indicativa da HF (FALUDI & BERTOLAMI, 1998; FITZPATRICK *et al.*, 1999) (Figura 1 e Figura 2).

As alterações genéticas mais frequentes associadas com a HF são mutações pontuais ou deleções no gene do receptor da LDL (*LDLR*), ocorrendo de 85% a 90% dos casos (GOLDSTEIN & BROWN, 2001; SANTOS *et al.*, 2012).

Figura 1: Xantoma no tendão de Aquiles em portador de HF homozigótica (Santos *et al.*, 2012). Figura 2: Xantelasmas extensos nas quatro pálpebras.(Pereira *et al.*, 2008).

O LDLR é responsável pela captação por endocitose e degradação intracelular da LDL plasmática (BROWN & GOLDSTEIN, 1986; LIYANAGE *et al.*, 2011). Além do *LDLR*, mutações em outros genes também podem causar a hipercolesterolemia familiar com o mesmo padrão autossômico dominante. Como alterações no gene da apolipoproteína B, localizado no cromossomo 2 (p24.1), que codificam uma apoB-100 defeituosa, prejudicando sua ligação com LDLR na captação de LDL (BOREN *et al.*, 2001; WHITFIELD *et al.*, 2004; SUN *et al.*, 2012). Outro exemplo são mutações no gene da pro-proteína convertase subtilisina kexina tipo 9 (*PCSK9*), localizado no cromossomo 1 (p34.1-p32). O *PCSK9* codifica a proteína NARC-14, que atua no catabolismo do LDLR e ao apresentar mutações com ganho de função, leva a degradação do LDLR nos lisossomos, impedindo sua reciclagem e aumentando os níveis de LDL plasmáticos (ABIFADEL, *et al.*, 2003; TIBOLLA, *et al.*, 2011; SUN *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2012). Uma forma recessiva e rara da hipercolesterolemia familiar é causada por mutações no gene da proteína adaptadora 1 do receptor de LDL (*LDLRAP1*), importante no processo de endocitose da LDL após ligação com o receptor em meio extracelular (SOUTAR & NAOUMOVA, 2007; TADA *et al.*, 2011).

A HF pode se manifestar de forma heterozigótica ou homozigótica. Em pacientes HF heterozigóticos a concentração de colesterol total varia de 290 a 500 mg/dL, em pacientes homozigotos apresentam valores acima de 600 mg/dL e podem desenvolver DCV antes da segunda década de vida (HOBBS *et al.*, 1992; GOLDSTEIN *et al.*, 1995).

A frequência da forma heterozigótica para o receptor de LDL é de 1 para cada 300-500 pessoas e para a forma homozigótica, estima-se entre 1:1.300.000 a

1:1.000.000 de indivíduos, sendo considerada a forma mais grave da doença (GOLDSTEIN *et al.*, 2001; HOPKINS *et al.*, 2011; SJOUKE *et al.*, 2014). A prevalência depende do gene analisado e do enquadramento geográfico da população em análise, sendo elevada em árabes, sul africanos brancos e canadenses de ascendência francesa e baixa em negros e orientais (MYANTE, 1993; RADER *et al.*, 2003).

No Brasil, a frequência deve variar em decorrência dos vários graus de miscigenação de diferentes grupos étnicos ocasionados pelas imigrações forçadas ou espontâneas as quais o país esteve submetido (FIGUEIREDO *et al.*, 1992; ALBERTO *et al.*, 1999; SALAZAR *et al.*, 2000).

1.3- LDLR: do gene à proteína

O gene do LDLR localiza-se no cromossomo 19 (19p13.1-13.3), possui um total de 18 éxons e 17 íntrons e codifica uma glicoproteína transmembrana a qual se liga à LDL plasmática, iniciando o processo de endocitose mediada por receptor (YAMAMOTO *et al.*, 1984; SUDHOF *et al.*, 1985; HOBBS *et al.*, 1990).

O RNA mensageiro (RNAm) do LDLR possui 5,3 kb de tamanho, dos quais aproximadamente metade corresponde a uma região 3' não traduzida (UTR) do éxon 18, codifica inicialmente uma proteína com 860 aminoácidos. Esta, após ter o peptídeo sinal excisado durante sua translocação para o retículo endoplasmático, segue para o complexo de Golgi até ser transportada para a membrana plasmática como proteína madura de 839 aminoácidos. O *LDLR* é expresso principalmente nas membranas dos hepatócitos embora também seja expresso nas membranas de outras células, como as esteroidogênicas e as dos tecidos periféricos (HOBBS *et al.*, 1992; GOLDSTEIN *et al.*, 1995).

O LDLR faz parte de uma família de receptores de superfície presente em mamíferos da qual se inclui o receptor de VLDL, receptor 2 da apolipoproteína E (apoE2), entre outros (NIMPF & SCHNEIDER, 2000; HUSSAIN, 2001). É caracterizado pela presença de cinco domínios funcionalmente distintos distribuídos entre os seus éxons, com exceção do éxon 1 que codifica a região 5' UTR, o peptídeo sinal, com 21 aminoácidos hidrofóbicos (Figura 3). O primeiro domínio é o amino terminal, está entre os éxons 2 ao 6 e é constituído por uma sequência de quarenta aminoácidos repetidos aproximadamente sete vezes, rico em resíduos de cisteína e responsável pela ligação do

receptor com a apoB-100 ou com a apolipoproteína E (apoE), outra apolipoproteína pela qual também possui afinidade (YAMAMOTO *et al.*, 1984; GOLDSTEIN *et al.*, 1995).

O domínio 2 compreende os éxons 7 ao 14 e é composto por uma sequência de 400 aminoácidos homóloga a uma parte do precursor do fator de crescimento epidermal (EGF) humano, que é constituída por três repetições de 40 aminoácidos: A, B e C. Essas repetições são ricas em cisteína, intercaladas por uma sequência que contém um motivo conservado Tyr-Trp-Thr-Asp (YWTD). Esse domínio é necessário no posicionamento do LDLR na superfície para a ligação com a apoB e na dissociação das lipoproteínas do receptor nos endossomos (RUSSELL *et al.*, 1984; GOLDSTEIN *et al.*, 1995).

Um terceiro domínio formado por 58 aminoácidos, com serinas e treoninas glicosiladas é codificado no éxon 15. Possui função pouco conhecida, possivelmente auxilia no posicionamento do domínio de ligação com a apoB (SUDHOF *et al.*, 1985; DAVIS *et al.*, 1986). O domínio 4 corresponde à região transmembrana composta por 22 aminoácidos hidrofóbicos codificados no éxon 16 e na extremidade 5' do éxon 17, que atravessam a membrana plasmática e são responsáveis pela fixação do receptor (DAVIS *et al.*, 1986).

A continuação do éxon 17 e região 5' do éxon 18 codificam os 50 aminoácidos do domínio citoplasmático. Este domínio é o único que se encontra totalmente no meio intracelular e que participa da interação entre receptor e as vesículas revestidas de clatrina no processo de endocitose. O restante do éxon 18 codifica uma região de 2,3 kb, da extremidade 3' não traduzida do RNAm do receptor (DAVIS *et al.*, 1986; GOLDSTEIN *et al.*, 1995). A região promotora do *LDLR* contém sequências *cis* atuantes que regulam a expressão do gene e são controladas por esterol (SUDHOF *et al.*, 1985; GOLDSTEIN & BROWN, 1990).

Figura 3: Representação esquemática do LDLR com seus 18 éxons e 5 domínios. Adaptado de Naumova *et al.*, 2004.

1.4-Metabolismo Lipoproteico: Via do Receptor de LDL

O metabolismo das lipoproteínas é composto por quatro vias: a via exógena, que consiste na absorção e transporte do colesterol proveniente da dieta; a via endógena, relacionada à síntese do colesterol nos hepatócitos; a via do transporte reverso, responsável pela condução do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado e a via do receptor de LDL (RIFAI *et al.*, 1999).

Os receptores são sintetizados no retículo endoplasmático e processados no complexo de Golgi até o transporte para a superfície celular, localizando-se preferencialmente em *coated pits*, regiões cobertas por clatrina na superfície interna da célula. A clatrina é a principal proteína estrutural de vesículas revestidas e desempenha importante papel no transporte intracelular (LIU *et al.*, 2012). O receptor liga-se especificamente à partícula de LDL por reconhecimento da apoB-100 na superfície da lipoproteína; este complexo é então internalizado por endocitose através de interações da parte citoplasmática do receptor com a clatrina e a LDLRAP1. Posteriormente, o pH ácido nos endossomos faz com que ocorra a dissociação do receptor com a lipoproteína de baixa densidade. Esta última segue para os lisossomos para a degradação em colesterol livre, que será utilizado na síntese de membranas celulares e no metabolismo de ácidos biliares e esteróides (GILLIAN-DANIEL *et al.*, 2002) (Figura 4).

Figura 4: Representação esquemática da Via Receptor LDL. PCSK9: proproteína convertase subtilisina kexina tipo 9; APOB-100: apolipoproteína B-100; LDLRAP1: proteína adaptadora 1 do receptor de LDL. Adaptado de Wasan *et al.*, 2008.

O receptor será reciclado para a superfície celular para um novo ciclo de captação da LDL. Cada ciclo dura aproximadamente 10 minutos, ocorrendo internalização e reciclagem mesmo na ausência da lipoproteína (GOLDSTEIN *et al.*, 1995). A atuação da PCSK9 está relacionada com diminuição de LDLR tanto após a síntese como após a endocitose, impedindo a reciclagem do receptor (MAYNE *et al.*, 2011).

A captação e a degradação da LDL plasmática pela via do receptor dependem diretamente da necessidade de colesterol intracelular, pois quando este está deficiente, novos receptores são sintetizados e transportados para a membrana, transformando o LDLR no principal responsável pela homeostase dessas lipoproteínas em meio plasmático e intracelular. Por outro lado, quando a concentração de colesterol intracelular está elevada ocorre a redução da síntese de LDLR, juntamente com a redução da síntese endógena de colesterol por inibição da enzima HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A) redutase e com o aumento da formação de colesterol esterificado pela ativação da acilCoA: colesterol aciltransferase (ACAT) (BROWN & GOLDSTEIN, 1997; RIFAI *et al.*, 1999).

1.5- Estudos Genéticos do *LDLR*

A análise do gene do *LDLR* já identificou mais de 1600 mutações que representam aproximadamente 90% de todos os casos de HF registrados. Estas mutações podem resultar em pouca ou nenhuma expressão do gene, afetando o número de receptores na superfície celular ou podem expressar isotipos com afinidade reduzida para a LDL circulante, podendo, desta forma, comprometer o metabolismo e a homeostase lipídica. (HOBBS *et al.*, 1987; HORSTHEMKE, *et al.*, 1987; HOBBS *et al.*, 1988; LANGLOIS *et al.*, 1988; LEIGH, *et al.*, 2008).

De acordo com seu efeito deletério na atividade do receptor, as mutações são divididas em cinco classes: as mutações de classe 1 causam deficiência na síntese do receptor; a segunda classe de mutações é responsável pela perda ou redução da capacidade do LDLR de seguir do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi, levando à diminuição de receptores na superfície celular; as mutações de classe 3 afetam a ligação do receptor com a apoB-100 da LDL; as de classe 4 prejudicam o posicionamento para endocitose do receptor e internalização da LDL e as mutações de

classe 5 comprometem a dissociação do receptor com a LDL, levando-o a degradação enzimática (HOBBS *et al.*, 1992).

A caracterização molecular das mutações nos genes envolvidos na hipercolesterolemia familiar tem sido alvo de vários estudos em diversos países. A primeira mutação identificada no *LDLR* ocorreu no início da década de 1970 (GOLDSTEIN & BROWN, 2009). No Brasil, a primeira caracterização ocorreu no início da década de 1990, com a identificação de uma mutação no éxon 14 (C660X) denominada de “mutação Libanesa” em cinco famílias de origem árabe (FIGUEIREDO *et al.*, 1992). Recentemente, publicou-se a I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF) com dados específicos de frequência, clínica e estimativas baseadas em pesquisas na população, indicando que é um tema relevante de crescente interesse científico (SANTOS, *et al.*, 2012; JANNES *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2014).

Estudos que esclareçam os mecanismos da hipercolesterolemia familiar são, portanto, de extrema importância, pois abrem perspectivas para o desenvolvimento de terapias mais específicas na redução dos níveis de colesterol e, consequentemente, da morbidade e mortalidade associadas às doenças cardiovasculares.

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

Apesar do aperfeiçoamento das técnicas moleculares na identificação de mutações, estas podem apresentar algumas limitações, como por exemplo, o sistema de mutação refratário à amplificação (ARMs), que necessita de conhecimento prévio da variante para identificá-la; a cromatografia líquida desnaturante de alta performance (dHPLC), que demanda tempo prolongado para a sua execução e até mesmo o sequenciamento, considerado o padrão ouro do diagnóstico molecular, pode se tornar dispendioso no rastreamento em cascata de famílias extensas (BODAMER *et al.*, 2002; MARKS *et al.*, 2002; TAYLOR *et al.*, 2007; LAURIE & GEORGE, 2009).

O *high resolution melting* (HRM) é uma tecnologia de rastreamento de nova geração, baseado na análise da curva de dissociação (*melting*), originada pela fluorescência de um intercalante saturado de DNA. Este método foi escolhido para a triagem de pacientes com hipercolesterolemia familiar, por oferecer benefícios significativos em tempo e custo, em comparação a outras técnicas de *scanning*, além de facilmente adaptável à rotina laboratorial (WITTWER *et al.*, 2003; CHOU *et al.*, 2005; LAURIE & GEORGE, 2009; WHITTALL *et al.*, 2010)..

Oposto ao vasto número de pesquisas na biologia molecular, que auxiliam sobremaneira na identificação de mutações em genes associados à HF, estudos que visam à caracterização funcional e determinação da patogenicidade das mutações nesses genes ainda são reduzidos. Desta forma, em uma segunda abordagem da pesquisa, buscou-se um novo método de biologia celular para a caracterização funcional de mutações, visando aumentar o espectro de informações a respeito da HF.

Utilizou-se a metodologia proposta por Makar *et al.* (1994) e aperfeiçoada por Romano *et al.* (2011); que se baseia na avaliação da atividade residual de LDLR pela captação de LDL marcado com um fluorescente lipofílico em cultura de linfócitos T, estimulados por mitógenos. Esta abordagem parte do mesmo princípio da escolha do método de rastreamento por HRM: apresentar alta sensibilidade e especificidade, além de poder ser incorporada na rotina laboratorial (ROMANO *et al.*, 2011).

A caracterização funcional de mutações em genes associados à HF, como o *LDLR*, juntamente com a rápida identificação de indivíduos portadores dessas mutações são de extrema importância no diagnóstico preciso, tratamento precoce, instituição de terapia hipolipemiante adequada, prevenção da doença cardiovascular prematura e,

consequentemente, na redução do risco de morte nessa população (SANTOS, *et al.*, 2012).

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1-Objetivo Geral

O presente estudo tem por objetivo o rastreamento, caracterização molecular e funcional de mutações no gene *LDLR* em pacientes com hipercolesterolemia familiar.

3.2- Objetivos Específicos

1. Realizar triagem de indivíduos hipercolesterolêmicos por técnica de rastreamento de mutações no *LDLR*
2. Identificar e caracterizar mutações no gene *LDLR* em pacientes com hipercolesterolemia familiar
3. Realizar estudo funcional para investigar a patogenicidade de mutações no gene *LDLR*

Material e métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1-Material

A amostragem foi composta por 32 indivíduos para rastreamento e identificação de mutações no gene *LDLR* e por 18 indivíduos para realização de estudo funcional de mutações neste mesmo gene, todos os indivíduos possuíam diagnóstico clínico para hipercolesterolemia familiar e foram atendidos no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFM-USP), pelo programa Hipercol Brasil.

Os experimentos do projeto foram desenvolvidos no Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Foram excluídos pacientes com insuficiência renal e hipotireoidismo, O grupo controle foi composto por 10 indivíduos normocolesterolêmicos e sem histórico de doenças cardiovasculares, constituído por estudantes e funcionários do Centro Regional de Hemoterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto FMRP/USP, processo número HCRP 9139/2010. Todos os envolvidos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para serem incluídos no projeto.

4.2-Métodos

4.2.1-Coleta do Material Biológico

Para a realização da triagem de variantes e sequenciamento, foram aliqüotados 50µl de DNA de 32 pacientes do banco de amostras do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (HCFM-USP). Posteriormente foram coletadas amostras de sangue periférico de 18 pacientes e dos indivíduos do grupo controle, para extração de ácidos nucleicos e isolamento de células mononucleares. De cada indivíduo foi coletado 10 ml de sangue periférico em tubos com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetracético). Após a extração de DNA e isolamento de células mononucleares, as

amostras foram numeradas (para garantir o sigilo) e armazenadas no banco de amostras mantido pelo Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática (FMRP-USP).

4.2.2-Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada utilizando o *Super Quick Gene DNA Isolation kit* (Analytical Genetic Testing Center) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 260 nm (NanoDrop ND1000) e a qualidade do DNA foi checada em gel de agarose 1,5%. Os DNAs foram diluídos e utilizados para as reações de PCR na concentração de 100 ng/μl e armazenados na temperatura – 20°C.

4.2.3- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Inicialmente a PCR foi usada para a padronização das temperaturas de anelamento dos primers antes de serem analisadas pelo método de HRM.

Para o gene *LDLR* foram utilizados 23 pares de primers capazes de amplificar os 18 éxons codificantes do gene. As sequências dos primers foram as mesmas descritas por Whittall *et al.*, (2010) que utilizou como base a sequência do gene disponível no banco de dados GenBank (número de acesso: NM_000527.3).

As amplificações foram realizadas com um volume total de 25 μL contendo 2 μL de DNA (100ng/μl), 2,5 μL de tampão 10X ((NH₄)₂SO₄ 2M, Tris-HCl 2M, MgCl₂ 1M e Tween 20 a 1%), 2 μL de dNTP a 2,5 mM, 1,5 μL para cada primer a 2,5 pmoles/μL, 0,2 μL de Taq DNA Polimerase a 1U (Biotools, Madri, Espanha) e 15 μL de água miliQ q.s.p.

Os parâmetros de amplificação foram: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento (*annealing*) por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Por fim, uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos das PCRs foram verificados por eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,5% (Figura 5).

Figura 5. Gel de agarose representativo da qualidade dos produtos da PCR referentes à amplificação do fragmento de 179 bp do éxon 6 do gene *LDLR*. Paciente 1 ao 13.
M: marcador de peso molecular; B: branco.

4.2.4- High Resolution Melting (HRM)

Para o *screening* de mutações no gene *LDLR* foi utilizado a técnica de HRM, que vem sendo amplamente usada para triagem de mutações em substituição a outros métodos de triagem como o SSCP, DGGE e DHPLC (GUNDRY *et al.*, 2003).

O procedimento consiste da PCR seguida da análise da curva de *melting* do fragmento de DNA amplificado. O HRM detecta variações da curva de *melting* causadas por mutações pontuais. Assim, as amostras que tiverem padrão de *melting* diferente da curva normal foram sequenciadas para validar e caracterizar a mutação.

Nesse estudo foi utilizado o corante *MeltDoctor* (Applied Biosystem), um intercalante saturado de DNA cuja intensidade máxima de fluorescência (100%) é registrada quando todo DNA está em fita dupla. À medida que a temperatura aumenta, a fluorescência diminui devido à dissociação da fita de DNA. Quando a intensidade de fluorescência atinge 50% significa que 50% da fita foi dissociada. Este é o ponto ideal para detectar variações de *melting* causadas por mutações (Figura 6).

O perfil da curva de *melting* depende principalmente do conteúdo GC e do tamanho do fragmento de DNA analisado. A curva de *melting* de um indivíduo heterozigoto quando comparada com a curva de um indivíduo homozigoto, mostra-se com um padrão distinto na forma e no deslocamento, devido à formação dos heteroduplexes após a renaturação do DNA na reação da PCR. Já em um indivíduo homozigoto mutante, apenas o deslocamento da curva de *melting*, este causado pela base mutante, pode ser detectado (LEENEER *et al.*, 2008).

Figura 6: Esquema ilustrando a temperatura de *melting* de uma sequência normal e outra com mutação (Fonte: próprio autor).

As reações foram realizadas com um volume total de 20 μL contendo, 3,6 μL de água miliQ, 1,2 μL de cada primer a 5 μM , 10 μL de MeltDoctor HRMTM Master Mix (Applied Biosystems) e 4 μL de DNA a 5ng/ μL . As reações sempre foram realizadas em duplicata. Os parâmetros de amplificação foram: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e temperatura de anelamento por 1 minuto. Em seguida, para a análise da curva de *melting*, os parâmetros foram: 95°C por 10 segundos, 60°C por 1 minuto, 95°C por 15 segundos e 60°C por 15 segundos.

Os resultados foram gerados utilizando o Applied Biosystems[®] 7500 *Fast Real-Time* PCR e analisados usando o Applied Biosystems[®] HRM *Software* v2.0. Amostras com curvas de *melting* semelhantes foram agrupadas e denominadas de variantes. Cada grupo de variante diferente das amostras sem mutação foi analisado utilizando os seguintes critérios: duplicatas com padrão de curva de *melting* diferentes, temperatura de *melting* mais alta, temperatura de *melting* mais baixa, curva de *melting* mais alta e curva de *melting* mais baixa.

4.2.5- Sequenciamento de DNA

Os produtos amplificados por PCR foram submetidos ao sequenciamento utilizando o sequenciador capilar automático 3500 XL *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Na reação de sequenciamento foram usados: 0,5 a 2 μL de DNA

amplificado (dependendo da qualidade do amplicon visualizado em gel de agarose 1,5%), 2 μ L de Big Dye Terminator v3.1 Cycle 2 μ L de 5X *Sequencing Buffer* (Applied Biosystems), 1 μ L de primer e água em quantidade suficiente para completar o volume final de 10 μ L. Os parâmetros de amplificação da reação de sequenciamento foram: 95°C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos de 95°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos cada. As sequências foram analisadas pelo software *Sequencing Analysis 5.2*. A figura 7 exemplifica a abordagem usada para o rastreamento das mutações no gene *LDLR* pelo método de HRM seguida da identificação por sequenciamento de DNA

Figura 7. A) Curvas de *melting* específicas para cada genótipo identificado no éxon 7 do gene *LDLR*. B1) Resultado do sequenciamento de uma amostra com a mutação Gly343Ser em heterozigose (curva de *melting* em azul); B2) Resultado do sequenciamento de uma amostra com genótipo normal (curva de *melting* em roxo).

4.2.6- Isolamento de Células Mononucleares

Após a coleta do material biológico, 9 ml sangue periférico, foram adicionados 18 ml de PBS (solução tampão de fosfato) com ausência de Ca^{2+} e Mg^{2+} (pH 7,4), que foram ser transferidos para tubo já contendo 13 ml de Ficoll-Paque (GE Helthcare). Posteriormente, ocorreu a separação por centrifugação a 1.500 RPM por 30 min a 4°C. Após a centrifugação, as células mononucleares do sangue periféricos (PBMC- do inglês Peripheral blood mononuclear cell) foram isoladas a partir da aspiração do anel de células presente na interfase soro/Ficoll. As células aspiradas foram lavadas três vezes com PBS e armazenadas em nitrogênio líquido com FBS (soro fetal bovino) (Lonza) 90% e DMSO (dimetilsulfóxido) 10% até o momento da sua utilização.

4.2.7- Estimulação de linfócitos T

Para a realização da padronização foram utilizadas amostras de um indivíduo controle para testes iniciais do protocolo. Realizou-se cultura celular para cada 10^6 de PBMC em 4 tipos de meios diferentes em placa de 24 poços para observação de crescimento celular.

Os meios e mitógenos usados foram: IMDM com LPDS, IMDM com LPDS+ ionomicina + PMA, IMDM com FBS, IMDM com FBS + ionomicina + PMA. Cada meio foi feito em duplicata, com um poço para análise em 24 horas e outro para 48 horas (Figura 8). O melhor resultado de crescimento com maior agrupamento de células e formação de rosetas pode ser observado no poço com IMDM e LPDS + ionomicina + PMA incubadas por 48 horas.

Figura 8. Representação da estimulação de células mononucleares de sangue periférico com diferentes meios e mitógenos em 24 horas e em 48 horas. IMDM: Meio modificado de Iscove de Dulbecco; LPDS: soro deficiente em lipoproteínas; IONOM.: ionomicina; PMA: acetato de miristato de forbol; FBS: soro fetal bovino.

Antes de serem utilizadas, as células descongeladas passaram por duas etapas de lavagem em FBS e em seguida, foram contadas e semeadas em placa de 24 poços (BD-Falcon) contendo 1×10^6 células/ml em cada poço com IMDM (Meio modificado de Iscove de Dulbecco) suplementado com 10% LPDS (soro deficiente em lipoproteínas) humano para induzir a expressão de LDLR e 2% do suplemento Ultra glutamina. A estimulação dos linfócitos T foi realizada durante 48h a 37°C e a 5% de CO_2 , com $1 \mu\text{M}$ de ionomicina (Sigma-Aldrich) e 10 ng/ml de PMA (acetato de miristato de forbol) de acordo com Makar (1994).

4.2.8- Captação de LDL Marcado

A atividade LDLR residual foi avaliada através da análise da captação da LDL marcada com Alexa Fluor 488-labeled LDL (Life Technologies) em linfócitos T estimulados por mitógeno. As células foram recolhidas e diluídas a 10^6 células/ml em DMEM:F12 (Dulbecco de meio de Eagle) (Sigma-Aldrich), sem fenol *red* e LPDS. Duas alíquotas de células de cada amostra analisada foram incubadas durante 3h a 37°C e a 5% de CO_2 seguido de 30 mg/L de LDL não marcado (Sigma-Aldrich), para medir background de fluorescência e 10 mg/L de LDL Alexa fluor 488 para estimar a ligação e a captação máxima de LDL.

Após três lavagens com PBS sem Ca^{2+} e Mg^{2+} , a intensidade da fluorescência foi medida por citometria de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson), de acordo com as

instruções do fabricante. *Gates* de dispersão frontal e lateral foram estabelecidos para excluir as células mortas e *debris* celulares. Os resultados foram expressos com a mediana da fluorescência e com a razão entre a mediana da intensidade de fluorescência das células de pacientes com a média da intensidade de fluorescência das células de indivíduos sem mutação. Esta razão representa a atividade residual do LDLR.

4.2.9- Análises Estatísticas

A distribuição normal das variáveis foi validada utilizando o teste Kolmogorov-Smirnov. As variáveis contínuas foram indicadas com média e desvio padrão (DP). A diferença entre as variáveis contínuas foram avaliadas por test-t. Em todas as avaliações estatísticas, o $p < 0,05$ foi considerado como significativo. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o SPSS versão 18.0 (SPSS Inc.). A determinação e descrição de mutações através do sequenciamento direto do gene alvo e análise das sequências foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática através do *software* SNPIIndex disponíveis via web no portal GDM (GENOME DATA MINING, 2006).

Resultados

5. RESULTADOS

5.1- Detecção de mutações por HRM

O rastreamento das mutações pelo método de HRM detectou um total de 273 fragmentos com variação da *curva de melting* em relação à curva normal, que foram sequenciados posteriormente. O HRM identificou em média 8,27 fragmentos com variação por paciente analisado.

5.2 - Identificação de mutações por sequenciamento de DNA

Os fragmentos que apresentaram variação da curva de *melting* em relação ao padrão normal foram sequenciados gerando os primeiros dados genéticos. Foram identificadas 22 mutações *missense*, 4 *nonsense* e 4 sinônimas (Tabela 1). Neste estudo, 26,6% dos pacientes tinham mutações localizadas no domínio 1 e pertencentes à classe 3, ou seja, afetando o domínio de ligação da molécula de LDL com o receptor. Em dois pacientes não foram detectadas mutações para o gene *LDLR*.

Tabela 1. Mutações identificadas do gene *LDLR*

Mutação	Éxon	Nucleotídeo	Localização no códon	Tipo de mutação	Domínio	Classe
p.(Tyr42X)	2	126	TAC→TAA	Nonsense	1	3
p.(Cys160Tyr)	4	479	TGC→TAC	Missense	1	3
p.(Asp168Ala)	4	503	GAC→GCC	Missense	1	3
p.(Pro181Leu)	4	542	CCG→CTG	Missense	1	3
p.(Asp221Gly)	4	662	GAC→GGC	Missense	1	3
p.(Glu228Lys)	4	682	GAG→AAG	Missense	1	3
p.(Cys276Trp)	6	828	TGC→TGG	Missense	1	3
p.(Asp301Gly)	6	902	GAC→GGC	Missense	1	3
p.(Cys318Phe)	7	953	TGC→TTC	Missense	2	2

p.(Ser326Cys)	7	973	TCC→TGC	Missense	2	2
p.(Gly343Ser)	7	1027	GGC→AGC	Missense	2	2
p.(Arg350X)	7	1048	CGA→TGA	Nonsense	2	2
p.(Gly373Asp)	8	1118	GGT→GAT	Missense	2	2
p.(Leu401Val)	9	1201	CTC→GTC	Missense	2	2
p.(Arg406Trp)	9	1216	CGG→TGG	Missense	2	2
p.(Ala431Thr)	9	1291	GCT→ACT	Missense	2	2
p.(Ala540Thr)	11	1618	GCC→ACC	Missense	2	2
p.(Gly549Asp)	11	1646	GGT→GAT	Missense	2	2
P.(Arg574His)	12	1721	CGC→CAC	Missense	2	2
p.(Leu575Leu)	12	1727	CTC→CTT	Sinônima	2	2
p.(Asn591Asn)	12	1773	AAT→AAC	Sinônima	2	2
p.(Arg595Trp)	12	1783	CGG→TGG	Missense	2	2
p.(Asp601His)	12	1801	GAT→CAT	Missense	2	2
p.(Val653Val)	13	1959	GTC→GTG	Sinônima	2	2
p.(Cys681X)	14	2043	TGC→TGA	Nonsense	2	2
p.(Pro685Leu)	14	2054	CCG →CTG	Missense	2	2
p.(Pro699Leu)	14	2096	CCG →CTG	Missense	2	2
p.(Arg744Arg)	15	2232	CGG→CGA	Sinônima	3	-
p.(Arg751Gln)	15	2252	CGG→CAG	Missense	3	-
p.(Lys811X)	17	2431	AAG→TAG	Nonsense	4	5

Após o sequenciamento, três bancos de dados foram consultados para verificar a prévia descrição e associação das mutações com a HF e obter informações sobre patogenicidade das mesmas (Tabela 2). Das mutações encontradas, 12 foram consideradas patogênicas e 5 foram classificadas como benignas. Também foi identificado um polimorfismo (ZAKHAROVA *et al.*, 2001). Para o restante das mutações não foi encontrada classificação. Este estudo identificou pela primeira vez a mutação Asp168Ala (Figura 9).

Figura 9. A) Resultado do sequenciamento de uma amostra com a mutação Asp168Ala em heterozigose. B) Representação esquemática da localização do éxon e domínio da mutação Asp168Ala. Adaptado de Naumova *et al.*, 2004.

Tabela 2. Verificação da descrição e patogenicidade das mutações

Mutação	HGMD	PolyPhen	JoJo Genetics	Referência
p.(Tyr42X)	-	-	Encontrada	-
p.(Cys160Tyr)	Descrita	Patogênica	-	DAY <i>et al.</i> , 1997
p.(Asp168Ala)	_____	_____	_____	-
p.(Pro181Leu)	-	-	Encontrada	-
p.(Asp221Gly)	Descrita	Patogênica	Encontrada	HOBBS <i>et al.</i> , 1992
p.(Glu228Lys)	-	-	Encontrada	-
p.(Cys276Trp)	-	-	Encontrada	DEIANA <i>et al.</i> , 2000
p.(Asp301Gly)	Descrita	Patogênica	Encontrada	FOUCHIER <i>et al.</i> , 2005
p.(Cys318Phe)	Descrita	Patogênica	-	LELLI <i>et al.</i> , 1994
p.(Ser326Cys)	Descrita	-	Encontrada	KERKHOF <i>et al.</i> , 2003

p.(Gly343Ser)	Descrita	Patogênica	-	MOZAS <i>et al.</i> , 2004
p.(Arg350X)	Descrita	-	-	GAUDET <i>et al.</i> , 1999
p.(Gly373Asp)	Descrita	Patogênica	Encontrada	SALAZAR <i>et al.</i> , 2002
p.(Leu401Val)	Descrita	Benigna	Encontrada	LEREN <i>et al.</i> , 1997
p.(Arg406Trp)	Descrita	Patogênica	-	RESHEF <i>et al.</i> , 1996
p.(Ala431Thr)	Descrita	Benigna	-	HOBBS <i>et al.</i> , 1990
p.(Ala540Thr)	Descrita	Benigna	Encontrada	DEDOUSSIS <i>et al.</i> , 2004
p.(Gly549Asp)	Descrita	Patogênica	-	HOBBS <i>et al.</i> , 1990
p.(Arg574His)	-	-	Encontrada	-
p.(Leu575Leu)	-	-	Encontrada	-
p.(Asn591Asn)	Descrita	Polimorfismo	-	ZAKHAROVA <i>et al.</i> , 2001
p.(Arg595Trp)	Descrita	Patogênica	Encontrada	DESCAMPS <i>et al.</i> , 2001
p.(Asp601His)	Descrita	Benigna	-	SALAZAR <i>et al.</i> , 2002
p.(Val653Val)	Descrita	-	-	-
p.(Cys681X)	Descrita	Patogênica	Encontrada	FIGUEREDO <i>et al.</i> , 1992
p.(Pro685Leu)	Descrita	Patogênica	-	MARK <i>et al.</i> , 1998
p.(Pro699Leu)	-	Patogênica	Encontrada	VAN GAAL <i>et al.</i> , 2001
p.(Arg744Arg)	-	-	Encontrada	-
p.(Arg751Gln)	Descrita	Benigna	Encontrada	FOUCHIER <i>et al.</i> , 2005
p.(Lys811X)	Descrita	-	-	MARUYAMA <i>et al.</i> , 1995

A mutação identificada neste estudo se encontra em negrito.

A partir da ausência de descrição da mutação Asp168Ala nos bancos de dados acima citados, outros três importantes bancos foram consultados: LOVD - Select Database, Mutation Taster e SIFT, este último, indicou se tratar de uma nova mutação com efeito deletério na atividade do receptor.

Diante deste fato, foi observada a necessidade de se desenvolver um estudo funcional de pequena escala, prático e facilmente implementável, que determinasse o grau de patogenicidade das mutações no gene *LDLR*. O método desenvolvido por Makar *et al.* (1994) e aperfeiçoado por Romano *et al.* (2011), pareceu adaptável à estrutura laboratorial e menos dispendioso. Optou-se por realizar a caracterização funcional em mutações não descritas na literatura especializada, para contribuir com a expansão de informações a respeito das mutações associadas à HF. Dentre as mutações

não descritas foram incluídas mutações *nonsense*, duplicações e deleções, que constituíram os controles positivos.

Os dados obtidos sobre as mutações dos 18 pacientes coletados para caracterização funcional encontram-se na tabela 3. Das 18 mutações, 8 foram consideradas patogênicas, 2 com informações contraditórias em dois bancos de dados e 9 mutações sem informações sobre a patogenicidade.

Tabela 3. Descrição e patogenicidade das mutações do estudo funcional

Mutação	HGMD	UCL/LOVD	JoJo Genetics	SIFT	PolyPhen	Mutation Taster
p.(Glu602X)	ND	ND	ND	Nova	ND	ND
p.(Tyr42X)	ND	ND	Encontrada	Nova	Patogênica	Causa doença
[Ex15_Ex16del]	ND	ND	ND	ND	ND	ND
p.(Cys82Ser)	ND	ND	ND	Nova	Patogênica	Causa doença
p.(Gln163X)	ND	ND	ND	Nova	Patogênica	Causa doença
p.(Ser791CysfsX70)	ND	ND	ND	Nova	Patogênica	ND
p.(Glu408Asp)	ND	ND	ND	Nova	Patogênica	ND
p.(His285Tyr)	ND	ND	ND	Nova	Patogênica	Polimorfismo
p.(Gly529Arg)	ND	ND	ND	Nova	Patogênica	ND
[Ex3_Ex6del]	ND	ND	ND	Nova	ND	ND
[Pr_Ex6dup]	ND	ND	ND	Nova	ND	ND
p.(His388ProfsX53)	ND	ND	ND	Nova	Patogênica	ND
p.(Thr404Ser)	ND	ND	ND	Nova	Benigna	Causa doença
[Pr_Ex6dup]*	ND	ND	ND	Nova	ND	ND
p.(Asp492ThrfsX15)	ND	ND	ND	Nova	ND	ND
[Ex11_Ex12dup]	ND	ND	ND	Nova	ND	ND
p.(His837ThrfsX23)	ND	ND	ND	Nova	ND	ND
p.(Phe629TyrfsX16)	ND	ND	ND	Nova	ND	ND

ND: Não descrita, *Paciente homozigoto

5.3 - Estudo funcional para determinação de patogenicidade

Obteve-se resultado do estudo funcional de 11 pacientes do total de 18 coletados. As médias e medianas da intensidade da fluorescência e a atividade residual dos pacientes e controles podem ser visualizados nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Médias e medianas da intensidade de fluorescência e atividade residual em pacientes

Alteração	Média Fluorescência	Mediana Fluorescência	Atividade Residual (%)
p.(Gln163X)	1082,43	103,66	103,15
p.(Phe629TyrfsX 16)	472,02	65,52	65,2
p.(Cys82Ser)	692,8	71,05	70,7
[Ex15_Ex16del]	1705,45	184,34	183,43
p.(Glu602X)	853,17	81,31	80,91
p.(Tyr42X)	1328,5	232,91	231,76
[Ex11_Ex12dup]	1360,3	162,53	161,73
p.(Thr404Ser)	304,46	26,3	26,17
p.(His388Profs X 53)	56,32	26,78	26,64
p.(Gly529Arg)	41,72	27,14	27
p.(His285Tyr)	1122,70	88,96	88,52

A atividade residual do *LDLR* foi calculada usando a média das medianas da intensidade de fluorescência dos controles, dividida pela mediana da intensidade de fluorescência de casa paciente analisado, com os dados apresentados em porcentagem.

Os valores máximos e mínimos da atividade residual dos pacientes foram 231,76% e 26,17% e nos controles foram 108,87% e 53,01%, respectivamente.

Tabela 5. Médias e medianas da intensidade de fluorescência e atividade residual nos controles

Identificação Controle	Média Fluorescência	Mediana Fluorescência	Atividade Residual (%)
C1	922,51	83,54	83,13
C2	498,60	53,28	53,01
C3	997,47	283,87	282,48
C4	103,92	57,25	56,96
C5	770,73	73,65	73,28
C6	660,31	91,4	90,95
C7	504,79	73,65	73,28
C8	769,28	75,67	75,29
C9	178,48	103,2	102,69
C10	811,37	109,41	108,87

Não houve diferença estatisticamente significativa na atividade residual do *LDLR* ao comparar pacientes com controles (figura 10). Entretanto, ao comparar pacientes e controles pareados de acordo com a idade e o sexo (tabela 6), observou-se diferença estatística, como mostra as figuras 11 e 12 ($p=0,041$).

Figura 10. Representação da atividade residual do *LDLR* entre pacientes e controles

Tabela 6. Médias e medianas da intensidade de fluorescência e atividade residual em pacientes e controles Pareados por idade e sexo

Alteração	Identificação	Mediana Fluorescência Pacientes	Mediana Fluorescência Controles	Atividade Residual Pacientes (%)	Atividade Residual Controles (%)
Pacientes	Controle				
p.(Cys82Ser)	C1	71,05	83,54	58,45	68,73
p.(Glu602X)	C3	81,31	283,87	66,89	233,53
p.(Thr404Ser)	C5	26,3	73,65	21,64	60,59
p.(His388ProfsX53)	C8	26,78	75,67	22,03	62,25
p.(Gly529Arg)	C9	27,14	103,2	22,33	84,90
p.(His285Tyr)	C10	88,96	109,41	73,18	90,01

Figura 11. Representação da atividade residual do *LDLR* entre pacientes e controles Pareados por idade e sexo

Figura 12. Representação da atividade residual do *LDLR* entre pacientes e controles totais e Pareados por idade e sexo

Discussão

6- DISCUSSÃO

Este trabalho inicialmente se propôs a analisar a utilização de uma nova metodologia de triagem de pacientes para o diagnóstico molecular de hipercolesterolemia familiar, através do rastreamento de variáveis por *High Resolution Melting*. Para o rastreamento dos 18 éxons do *LDLR*, foram utilizados 23 pares de primers de até 280pb, pois quanto menor for o fragmento escaneado, maior a especificidade na detecção de variantes (WHITTALL *et al.*, 2010).

Foram detectados em média 8,27 fragmentos para cada paciente, o que se compara a sequenciar diretamente o *LDLR* inteiro da metade da amostra analisada. Este resultado demonstra que, mesmo o HRM sendo um método com alta sensibilidade e o gene *LDLR* composto por muitas regiões polimórficas, ele pode ser considerado como a opção mais apropriada na análise de genes extensos, além de contribuir para a identificação de mais uma mutação no paciente analisado (WHITTALL *et al.*, 2010).

A rotina laboratorial em grandes centros de pesquisa e de diagnóstico molecular possui grande demanda de pacientes com diagnóstico clínico ou de familiares para a realização do rastreamento em cascata. Uma forma para tornar o processo de identificação menos dispendioso, seria realizar a técnica de HRM nos éxons são que conhecidos na literatura por apresentam mais mutações e sequenciá-los em seguida, caso apresentem alteração em algum fragmento. Para o rastreamento em cascata, utilizar a técnica no éxon que o paciente índice apresentou mutação, e na detecção de alteração, confirmar a suspeita através do sequenciamento. Importante a utilização de controles com perfil genético conhecido para o auxílio nas análises das curvas de dissociação, pois um bom parâmetro pode auxiliar sobremaneira a interpretação do padrão de curva de pacientes homozigotos.

Observou-se que dos 32 pacientes, 2 não possuíam mutações no gene *LDLR*. Isto pode significar a existência de mutação em qualquer um dos genes relacionados à HF. Faria-se, então, o sequenciamento direto das mutações mais conhecidas nos genes da APOB e PCSK9 e em último caso *LDLRAP1*, que são as mais raras. Se após esses sequenciamentos não for encontrada mutação e o diagnóstico clínico indicar HF, faz-se a técnica de MPLA para identificar grandes rearranjos e deleções, pois é um método oneroso e que necessita de um tempo consideravelmente longo para a sua execução (SANTOS *et al.*, 2012).

O objetivo deste trabalho foi ampliado, após a identificação de uma mutação nova, a Asp168Ala no éxon 4 e a necessidade obter informações a respeito da patogenicidade desta e de outras mutações não descritas na literatura especializada. A paciente portadora da mutação Asp168Ala não pôde participar da pesquisa.

Os testes iniciais de estimulação de linfócitos T indicaram que o protocolo escolhido como modelo, apresentou maior proliferação celular, provavelmente devido ao estresse celular causado pela deficiência de LDL no meio, causando maior expressão de receptores de LDL existentes na superfície dos linfócitos T. Este resultado foi compatível com o do protocolo proposto por Makar et al. (1994) e aperfeiçoado por Romano et al. (2011) ao qual seguimos como modelo em nossos experimentos.

Foram introduzidos ao estudo 18 pacientes com diagnóstico clínico e molecular de HF, mas por problemas operacionais o estudo funcional foi realizado em apenas 11 deles. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na atividade residual do *LDLR* de pacientes e controles, indicando que a presença de mutação não afetaria a função do receptor no metabolismo lipoproteico dos pacientes. Resolveu-se parear os pacientes e controles por sexo e idade para afastar algum possível viés de seleção. Desta maneira, as medianas da intensidade de fluorescência e atividade residual do receptor foram estatisticamente maiores nos controles em comparação com os pacientes. As mutações Glu602X e His388ProfsX53 confirmaram sua patogenicidade e podem ser considerados como controle positivo de efeito deletério ao receptor. As mutações de substituição Cys82Ser, Thr404Ser, Gly529Arg e his285Tyr apresentaram redução da atividade do receptor em comparação ao grupo controle pareado.

Adotamos métodos de estimulação de linfócitos T, captação de LDL marcada com fluoróforo e comparação com o grupo controle, semelhantes aos outros estudos publicados em revistas especializadas (ROMANO, *et al.*, 2010; ETXEBARRIA, *et al.*, 2011). Apesar de o resultado ter sido semelhante ao proposto pelo estudo de Romano (2010), observou-se que em alguns pacientes a atividade do receptor era apenas um pouco abaixo da atividade do seu controle correspondente, até mesmo em mutações classificadas como patogênicas. Sabia-se que mais de 70% dos pacientes faziam uso de atrovastatina, com ou sem combinação com ezetimibe e ácido nicotínico, em diferentes dosagens durante a coleta, pois já tinham mutação identificada por sequenciamento, além do diagnóstico clínico. Ao obter informações do tipo de medicação e dosagem de cada paciente, descobriu-se que os pacientes com mutações patogênicas com redução entre 15 e 20% da atividade do receptor faziam uso de 80mg/d de atorvastatina, 10 mg/d

de ezetimibe e 500mg/d de ácido nicotínico. É provável, portanto, que o uso de dessa combinação de fármacos hipolipemiantes tenha causado uma superexpressão de receptores de LDL, deixando-os com atividade residual semelhante aos controles saudáveis (BAYS & STEIN, 2003). Outro fato importante foi observar que os pacientes com má adesão ao tratamento ou que estavam sem uso de medicação apresentaram as mais baixas atividades residuais do LDLR.

É eticamente infundada a interrupção do tratamento dos pacientes para fins científicos, pois as pesquisas partem do princípio que não prejudicarão de nenhuma forma a saúde de seus participantes. Seria interessante iniciar a coleta e isolamento de células mononucleares logo após a confirmação de diagnóstico clínico e antes de qualquer intervenção medicamentosa que altere o quadro inicial do paciente. A construção de uma biblioteca de células mononucleares de pacientes sem o início do tratamento seria de significativa importância para pesquisa de mutações novas ou conhecidas sem informações de patogenicidade.

Um banco de dados com a atividade residual de indivíduos sem diagnóstico clínico de HF poderia traçar um perfil da população saudável quanto a sua homeostase na via do receptor de LDL e fundamentar referências para comparação com pacientes, mediante a reprodução fidedigna do protocolo escolhido para essa avaliação.

Ensaio funcionais precisos e de simples execução são necessários para ampliar o conhecimento a cerca das mutações relacionadas à HF. Neste trabalho, foi realizado um estudo funcional de pequena escala que mostrou pontos importantes para serem ajustados e novos interesses de pesquisa, como a ação da combinação de fármacos hipolipemiantes na regulação da síntese de receptores.

Estudos que esclareçam os mecanismos moleculares da HF e da relação genótipo/fenótipo abrem perspectivas para o desenvolvimento de terapias mais específicas na redução dos níveis de colesterol e, conseqüentemente, da morbidade e mortalidade associadas às doenças cardiovasculares.

Conclusões

7- CONCLUSÕES

Neste estudo foi realizado o rastreamento, caracterização molecular e funcional de mutações no gene *LDLR* em pacientes com hipercolesterolemia familiar. Conforme resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O método de detecção de mutações por HRM mostrou-se eficiente e robusto em sua função, pois passado o período de padronização das curvas, tornou-se menos dispendioso e de rápida execução, otimizando o diagnóstico molecular, já incorporado na rotina laboratorial.
- A mutação Asp168Ala foi descrita pela primeira vez em neste estudo
- As mutações Glu602X e His388ProfsX53 confirmaram sua patogenicidade e podem ser considerados como controle positivo para próximos estudos funcionais
- As mutações de substituição Cys82Ser, Thr404Ser, Gly529Arg e His285Tyr apresentaram diminuição da atividade residual do receptor de LDL em linfócitos T em comparação com a atividade residual de indivíduos normocolesterolêmicos do grupo controle.

Referências

8. REFERÊNCIAS

ABIFADEL, M.; VARRET, M.; RABÈS, J.P., *et al.* Mutations in *PCSK9* cause autosomal dominant hypercholesterolemia. **Nat Genet**, 34(2):154-156, 2003.

ALBERTO, F.L.; FIGUEIREDO, M.S.; ZAGO, M.A., *et al.* The Lebanese mutation as an important cause of familial hypercholesterolemia in Brazil. **Braz J Med Biol Res**, 32: 739-745, 1999.

BAYS, H; STEIN, EA. Pharmacotherapy for dyslipidaemia – current therapies and future agents. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2003, vol. 4, no. 11, pp. 1901 – 1938.

BOREN, J.; EKSTROM, U.; AGREN, B., *et al.* The molecular mechanism for the genetic disorder familial defective apolipoprotein B100. **J Biol Chem**, 276: 9214- 9218, 2001.

BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, 232: 34-47, 1986.

BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. **Cell**, 89:331-340, 1997.

CHRISTIANO, A.M.; MCGRATH, J.A.; TAN, K.C., *et al.* Glycine Substitutions in the Triple-Helical Region of Type VII Collagen Result in a Spectrum of Dystrophic Epidermolysis Bullosa Phenotypes and Patterns of Inheritance. **Am J Hum Genet**, 58: 671-681, 1996.

DANIELS, T.F.; KILLINGER, K.M.; MICHAL, J.J., *et al.* Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. **Int J Biol Sci**, 5: 474-488, 2009.

DAVIS, C.G.; ELHAMMER, A.; RUSSELL, D.W., *et al.* Deletion of clustered O-linked carbohydrates does not impair function of low density lipoprotein receptor in transfected fibroblasts. **J Biol Chem**, 261: 2828-2838, 1986.

DAVIS, C.G.; LEHRMAN, M.A.; RUSSELL, D.W., *et al.* The J.D. mutation in familial hypercholesterolemia: amino acid substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors. **Cell**, 45:15-24, 1986.

DAY, I.N.M.; WHITTALL, R.A.; O'DELL, S.D., *et al.* Spectrum of LDL Receptor Gene Mutations in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia. **Hum Mutat**, 10: 116-127, 1997.

DELONG, E.R.; DELONG, D.M.; CLARKE-PEARSON, D.L. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. **Biometrics**, 44: 837 – 845, 1988.

FALUDI, A.A.; BERTOLAMI, M.C. Como diagnosticar e tratar as dislipidemias. **Rev Bras Med**, 55: 6-11, 1998.

FIGUEIREDO, M.S.; SANTOS, J.E.; ALBERTO, F.L. *et al.* High frequency of the Lebanese allele of the LDLr gene among Brazilian patients with familial hypercholesterolemia. **J Med Genet**, 29: 813-815, 1992.

FITZPATRICK, T.B.; FREEDBERG, I.M.; EISEN, A.Z., *et al.* Xanthomatoses and lipoprotein disorders. **Dermatology in General Medicine**, 152: 1804-1811, 1999.

GILLIAN-DANIEL, D.L.; BATES, P.W.; TEBON, A., *et al.* Endoplasmatic reticulum localization of the low density lipoprotein receptor mediates presecretory degradation of apolipoprotein B. **Proc Natl Acad Sci**, 99: 4337-4342, 2002.

GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature**, 343: 425- 430, 1990.

GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. The cholesterol quartet. **Science**, 292: 1310-1312, 2001.

GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. The LDL Receptor. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 29:431-438, 2009.

GOLDSTEIN, J.L.; HOBBS, H.H.; BROWN, M.S. Familial hypercholesterolemia. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D., Eds. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 7. ed. New York: McGraw-Hill, 1995, p.1981-2030.

GOLDSTEIN, J.L.; HOBBS, H.H.; BROWN, M.S. Familial hypercholesterolemia. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D., Eds. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 8. ed. New York: McGraw-Hill, 2001, p.2863–2913.

HAVEL, R.J.; KANE, J.P. Introduction: Structure and metabolism of plasma lipoproteins. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D., Eds. **The Metabolic basis of Inherited Disease**. 7. ed. New York: McGraw-Hill, 1995. p.1841–1851.

HOBBS, H.H.; BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. **Hum Mutat**, 1:445-466, 1992.

HOBBS, H.H.; BROWN, M.S.; RUSSELL, D.W., *et al.* Deletion in the gene for the low-density-lipoprotein receptor in a majority of french canadians with familial hypercholesterolemia. **N Engl J Med**, 317(12):734-737, 1987.

HOBBS, H.H.; LEITERSDORF, E.; GOLDSTEIN, J.L., *et al.* Multiple crm-mutations in familial hypercholesterolemia: evidence for 13 alleles, including four deletions. **J Clin Invest**, 81(3):909-917, 1988.

HOBBS, H.H.; RUSSELL, D.W.; BROWN, M.S., *et al.* The LDL receptor locus and familial hypercholesterolemia: Mutational analysis of a membrane protein. **Annu Rev Genet**, 24: 133-170, 1990.

HOOPER, L.; SUMMERBELL, C.D.; THOMPSON, R., *et al.* Reduced or modified dietary fat for preventing cardiovascular disease. **Cochrane Database Syst Rev**, 00:000-000, 2012.

HOPKINS, P.N.; TOTH, P.P.; BALLANTYNE, C.M., *et al.* Familial hypercholesterolemias: prevalence, genetics, diagnosis and screening recommendations from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. **J Clin Lipidol**, 5 : S9-S17, 2011.

HORSTHEMKE, B.; DUNNING, A.; HUMPHRIES, S. Identification of deletions in the human low density lipoprotein receptor gene. **J Med Genet**, 24(3):144-147, 1987.

HUSSAIN, M.M. Structural, biochemical and signaling properties of the low-density lipoprotein receptor gene family. **Front Biosci**, 6: 417-428, 2001.

JANNES, C.E., SANTOS, R.D., SILVA, P. R. S., et al. Familial hypercholesterolaemia in Brazil: cascade screening program, clinical and genetic aspects. **Atherosclerosis**, 238: 101-107, 2014.

LANGLOIS, S.; KASTELEIN, J.J.; HAYDEN, M.R.; *et al.* Characterization of six partial deletions in the low-density-lipoprotein (ldl) receptor gene causing familial hypercholesterolemia (FJ). **Am J Hum Genet**, 43(1):60-68, 1988.

LEENEER, K., *et al.* Rapid and sensitive detection of BRCA1/2 mutations in a diagnostic setting: comparison of two high-resolution melting platforms. **Clin Chem**, v.54, n.6, Jun, p.982-9. 2008.

LEIGH, S.E.; FOSTER, A.H.; WHITTAL, R.A., *et al.* Analysis of the university college london low density lipoprotein receptor familial hypercholesterolemia data base. **Ann Hum Genet**, 72: 485-498, 2008.

LEITERSDORF, E.; RESHEF, A.; MEINER, V., *et al.* A missense mutation in the low density lipoprotein receptor gene causes familial hypercholesterolemia in Sephardic Jews. **Hum Genet**, 91: 141-147, 1993.

LIBBY, P.; RIDKER, P.M.; HANSSON, G.K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature**, 19; 473: 317-325, 2011.

LIBBY, P.; THEROUX, P. Pathophysiology of coronary artery disease. **Circulation**, 111: 3481- 3488, 2005.

LIU, Y.W.; SU, A.I.; SCHMID, S.L. The evolution of dynamin to regulate clathrin-mediated endocytosis: Speculations on the evolutionarily late appearance of dynamin relative to clathrin-mediated endocytosis. **Bioessays**, 00:000-000, 2012.

LIYANAGE, K.E.; BURNETT, J.R.; HOOPER, A.J., *et al.* Familial hypercholesterolemia: epidemiology, Neolithic origins and modern geographic distribution. **Crit Rev Clin Lab Sci**, 48:1-18, 2011.

LLOYD-JONES, D.; ADAMS, R.; CARNETHON, M., *et al.* Heart disease and stroke statistics 2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation**, 119: 480-486, 2009.

LOMBARDI, P.; SIJBRANDS, E.J.; KAMERLING, S., *et al.* The T705I mutation of the low density lipoprotein receptor gene (FH Paris-9) does not cause familial hypercholesterolemia. **Hum Genet**, 99: 106-107, 1997.

MAKAR, R.S.; LIPSKY, P.E.; CUTHBERT, J.A. Non-sterol regulation of low density lipoprotein receptor gene expression in T cells. **J. Lipid Res**, 35: 1888 – 1895, 1994.

MAYNE, J.; DEWPURA, T.; RAYMOND, A., *et al.* Novel loss-of-function PCSK9 variant is associated with low plasma LDL cholesterol in a French-Canadian family and with impaired processing and secretion in cell culture. **Clin Chem**, 57:1415-1423, 2011.

MÜLLER, C. Xanthomata, hypercholesterolemia, angina pectoris. **Acta Med Scand**, 89: 75-84, 1938.

MURRAY, C.J.; LOPEZ, A.D. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global burden of disease study. **Lancet**, 349:1436-1442, 1997.

MYANT, M.B. Familial defective apolipoprotein B-100: a review, including some comparisons with familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, 104: 1-18, 1993.

NAOUMOVA, R.P.; NEUWIRTH, C.; POTTINGER, B., *et al.* Genetic diagnosis of familial hypercholesterolaemia: a mutation and a rare non-pathogenic amino acid variant in the same family. **Atherosclerosis**, 174: 67-71, 2004.

NIMPF, J.; SCHNEIDER, W.J. From cholesterol transport to signal transduction: low density lipoprotein receptor, very low density lipoprotein receptor and apolipoprotein E receptor-2. **Biophys Acta**, 1529: 287-298, 2000.

RADER, D.J.; COHEN, J.; HOBBS, H.H. Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. **J Clin Invest**, 111: 1795- 1803, 2003.

RIFAI, N.; BACHORIK, P.S.; ALBERS, J.J. Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. In: BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E., Eds. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**. 3. ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999. p. 809- 861.

ROMANO, M.; DI TARANTO, M.D.; MIRABELLI, P., *et al.* An improved method on stimulated T-lymphocytes to functionally characterize novel and known LDLR mutations. **J Lipid Res**, 52: 2095-2100, 2011.

RUSSELL, D.W.; SCHNEIDER, W.J.; YAMAMOTO, T., *et al.* Domain map of the LDL receptor: sequence homology with the epidermal growth factor precursor. **Cell**, 37: 577-585, 1984.

SALAZAR, L.A.; CAVALLI, S.A.; HIRATA, M.H., *et al.* Polymorphisms of the low-density lipoprotein receptor gene in brazilian individuals with heterozygous familial hypercholesterolemia. **Braz J Med Biol Res**, 33: 1301-1304, 2000.

SANTOS, R.D.; GAGLIARDI, A.C.M.; XAVIER, H.T., *et al.* Sociedade Brasileira de Cardiologia.I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). **Arq Bras Cardiol**, 99(2 Supl. 2):1-2, 2012.

SANTOS, P.C.J.L.; MORGAN, A.C.; JANNE, C.E., *et al.* Presence and type of low density lipoprotein receptor (LDLR) mutation influences the lipid profile and response to lipid-lowering therapy in Brazilian patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, 233: 206-210, 2014.

SOUTAR, A.K.; NAOUMOVA, R.P. Mechanisms of Disease: genetic causes of familial Hypercholesterolemia. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med**, 4: 214-225, 2007.

SOZEN, M.M.; WHITTALL, R.; ONER, C., *et al.* The molecular basis of familial hypercholesterolaemia in Turkish patients. **Atherosclerosis**, 180: 63–71, 2005.

SPOSITO, C.A.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F.A.H., *et al.* IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol**, 88 (S1): 2-18, 2007.

STANCU, C.S.; TOMA, L.; SIMA, A.V. Dual role of lipoproteins in endothelial cell dysfunction in atherosclerosis. **Cell Tissue Res**, 00:000-000, 2012.

SUDHOF, T.C.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S., *et al.* The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. **Science**, 228:815-822, 1985.

SUN, H.; SAMARGHANDI, A.; ZHANG, N., *et al.* Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Interacts With Apolipoprotein B and Prevents Its Intracellular Degradation, Irrespective of the Low-Density Lipoprotein Receptor. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 00:000-000, 2012.

TADA, H.; KAWASHIRI, M.A.; OHTANI, R., *et al.* A novel type of familial hypercholesterolemia: double heterozygous mutations in LDL receptor and LDL receptor adaptor protein 1 gene. **Atherosclerosis**, 219: 663-666, 2011.

TIBOLLA, G.; NORATA, G.D.; ARTALI, R. *et al.* Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): from structure-function relation to therapeutic inhibition. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, 21:835-843, 2011.

WHITFIELD, A.J.; BARRETT, P.H.; VAN BOCKXMEER, F.M., *et al.* Lipid disorders and mutations in the APOB gene. **Clin Chem**, 50:1725– 1732, 2004.

WHITTALL, R.A.; SCARTEZINI, M.; KAWAH, L., *et al.* Development of high-resolution melting method for mutation detection in familial hypercholesterolaemia. **Ann Clin Biochem**, 47: 44-55, 2010.

WHO. **Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control**. Geneva: WHO Press, 2011. 155 p.

YAMAMOTO, T.; DAVIS, C.G.; BROWN, M.S., *et al.* The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. **Cell**, 39:27-38, 1984.

Anexo

9. ANEXO

9.1- PRIMERS DO GENE *LDLR* UTILIZADOS

Detalhes dos primers do gene *LDLR* utilizados para as técnicas de sequenciamento e HRM

FRAGMENTO <i>LDLR</i>	<i>FORWARD</i> 5'-3'	<i>REVERSE</i> 5'-3'	TAMANHO (pb)	TEMPERATURA DE <i>ANNEALING</i>
Prom	CAGCTCTTCACCGGAGACCC	ACCTGCTGTGTCCTAGCTGG	278	65°C
Éxon 1	ACTCCTCCCCCTGCTAGAAACCTCA	CTATTCTGGCGCCTGGAGCAAGCC	238	65°C
Éxon 2	TTGAGAGACCCTTTCTCCTTTTCC	GCATATCATGCCCAAAGGGG	183	60°C
Éxon 3	TCAGTGGGTCTTTCCTTTGAG	CAGGACCCCGTAGAGACAAA	250	65°C
Éxon 4(1)	TGGTGTGGGAGACTTCACA	CATCATCCGAGCCATCTTC	281	57°C
Éxon 4(2)	AAGTGCATCTCTCGGCAGTT	CCCCTTGAACACGTAAAGA	220	55°C
Éxon 4(3)	AGCTTCCAGTGCAACAGCTC	CATACCGCAGTTTTCTCGT	246	62°C
Éxon 4(4)	TGTTCCAAGGGGACAGTAGC	AAATCACTGCATGTCCCACA	210	68°C
Éxon 5	AGAAAATCAACACACTCTGTCCTG	GGAAAACCAGATGGCCAGCG	180	62°C
Éxon 6	TCCTCCTTCTCTCTCTGGC	TCTGCAAGCCGCCTGCACCG	179	62°C
Éxon 7	GGCGAAGGGATGGGTAGGGG	GTTGCCATGTCAGGAAGCGC	236	62°C
Éxon 8	CATTGGGGAAGAGCCTCCCC	GCCTGCAAGGGGTGAGGCCG	220	63°C
Éxon 9	TCCATCGACGGGTCCCCTCTGACCC	AGCCCTCATCTCACCTGCGGGCCAA	273	63°C
Éxon 10	AGATGAGGGCTCCTGGTGCGATGCC	GCCCTTGGTATCCGCAACAGAGACA	203	65°C
Éxon 10	GATCCACAGCAACATCTACTGGACC	AGCCCTCAGCGTCGTGGATA	163	65°C
Éxon 11	TCCTCCCCCGCCCTCCAGCC	GCTGGGACGGCTGTCCTGCG	194	68°C
Éxon 12	GCACGTGACCTCTCCTTATCCACTT	CACCTAAGTGCTTCGATCTCGTACG	200	63°C
Éxon 13	GTCATCTTCCTTGCTGCCTG	GTTTCCACAAGGAGGTTTCAAGGTT	219	63°C
Éxon 14	GAATCTTCTGGTATAGCTGAT	GCAGAGAGAGGCTCAGGAGG	279	60°C
Éxon 15	GAAGGGCCTGCAGGCACGTGGCACT	GTGTGGTGGCGGGCCAGTCTTT	247	63°C
Éxon 16	CCTTCCTTTAGACCTGGGCC	CATAGCGGGAGGCTGTGACC	173	67°C
Éxon 17	GGGTCTCTGGTCTCGGGCGC	GGCTCTGGCTTTCTAGAGAGGG	240	66°C
Éxon 18	GCCTGTTTCTGAGTGCTGG	TCTCAGGAAGGGTTCTGGGC	136	62°C

9.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezado (a) Senhor (a),

Venho por meio desta, convidá-lo (a) a participar voluntariamente desta pesquisa intitulada “IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE DO RECEPTOR DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (*LDLR*) EM PACIENTES COM HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR“, que visa o estudo de fatores genéticos envolvidos na Hipercolesterolemia Familiar. Ao aceitar participar desta pesquisa, o (a) senhor (a) deverá responder a um questionário de identificação, estilo de vida e antecedentes familiares de doenças cardíacas. Posteriormente, será submetido (a) a coleta de uma amostra de 10 ml de sangue (igual a 2 colheres de chá), obtida por picada em veia do braço, o que poderá levar a dor, ardência e formação de pequena mancha roxa no local da picada. Seu sangue será analisado para identificação de pequenas alterações em seu DNA, que podem estar envolvidas na Hipercolesterolemia Familiar. Seu sangue deverá ser armazenado em nosso laboratório, pois se ocorrer a necessidade de repetição nos exames, não venhamos a solicitar uma nova coleta do(a) senhor(a). Seu material armazenado será utilizado exclusivamente para esta pesquisa. Ao consentir em participar voluntariamente, o(a) senhor(a) terá acesso aos resultados em qualquer etapa da pesquisa. Os resultados obtidos serão apresentados em reuniões científicas e publicados em revistas especializadas. Sua identidade será protegida, sem revelação do seu nome ou qualquer informação que possa torná-lo reconhecido ou causá-lo constrangimento. Sua participação é voluntária e poderá ser interrompida pelo(a) senhor(a) em qualquer momento desse estudo, sem nenhum tipo de pressão dos pesquisadores responsáveis e/ou médicos. Esta pesquisa não irá interferir de nenhuma forma em seu atendimento e acompanhamento médicos durante e após o desenvolvimento do projeto. Eu, Karina Alves da Silva e o Prof. Dr. Wilson de Araújo Silva Junior, pesquisadores responsáveis pelo estudo, ficamos a sua disposição para qualquer esclarecimento que venha necessitar sobre esta pesquisa, no telefone (0xx16) 2101-9362.

Eu _____, declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador, consinto em participar na amostragem do projeto de pesquisa em questão, por livre vontade sem que tenha sido submetido a qualquer tipo de pressão.

Nome da cidade e data:

Assinatura do paciente ou responsável legal:

Assinatura do Pesquisador (carimbo ou nome legível):

Nome e assinatura da testemunha:

Nota: este termo deverá ser elaborado em duas vias, ficando uma via em poder do paciente ou seu representante legal e outra com o pesquisador responsável pelo projeto.

9.3- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
www.hcrp.usp.br
USP - RIBEIRÃO
assistência • ensino • pesquisa

Ribeirão Preto, 10 de novembro de 2010

Ofício nº 3788/2010
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **"IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE DO RECEPTOR DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (LDL_r) EM PACIENTES COM HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR"** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 314ª Reunião Ordinária realizada em 08/11/2010 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 9139/2010.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
KARINA ALVES DA SILVA
PROF. DR. WILSON ARAÚJO DA SILVA JÚNIOR (Orientador)
Depto. de Genética - FMRP-USP

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA - 0000 2733; IRB - 0000 2189 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

Artigo da tese

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE MUTAÇÕES NO GENE DO RECEPTOR DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (*LDLR*) EM PACIENTES COM HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR

VASCONCELOS, K.A.S.¹, LORENZI, J.C.C.², ZANETTE, D.L.³, FARIA, C.A.⁴; TUROLLA, L.⁵, ARAÚJO, L.F.⁴, WATANABE, C.⁵, JANNES, C.E.⁵, DA SILVA, E.M.⁴, MOLFETTA, G.A.⁴, PEREIRA, A.C.⁵, SANTOS, R.D.⁵, DOS SANTOS, J.E.¹, SILVA JR, W.A.^{1,4}

¹ Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

² Rockefeller University

³ Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz- FioCruz, Bahia

⁴ Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

⁵ Instituto do Coração (InCor), Universidade de São Paulo

RESUMO

INTRODUÇÃO/OBJETIVOS: Hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença autossômica dominante, caracterizada por elevados níveis plasmáticos da lipoproteína de baixa densidade (LDL), desenvolvimento de xantoma tendíneo e arco corneal, além do aumento do risco de doença coronariana e acidente vascular cerebral prematuros. Frequentemente subdiagnosticada, estima-se que apenas 10% dos 400.000 indivíduos com HF no Brasil têm conhecimento da própria doença; afetando, desta forma, a qualidade e a expectativa de vida dos pacientes. Mutações no gene do receptor da LDL (*LDLR*) são consideradas as alterações genéticas mais frequentes para o desenvolvimento da hipercolesterolemia familiar, pois comprometem a capacidade de remoção das partículas de LDL circulantes, promovendo seu aumento em níveis plasmáticos. Já foram descritas mais de 1600 mutações diferentes no gene *LDLR* associadas ao fenótipo da HF; entretanto, ainda é difícil determinar em muitas delas o efeito deletério na atividade do receptor. O objetivo desse estudo foi identificar mutações no gene *LDLR* e caracterizar funcionalmente mutações não descritas na literatura para determinar sua patogenicidade na hipercolesterolemia familiar.

MÉTODOS: Foi avaliada a atividade residual de *LDLR* através da captação de LDL marcado com fluoróforo lipofílico em cultura de linfócitos T dos pacientes portadores das mutações analisadas após estimulação dos linfócitos T por mitógenos específicos.

RESULTADOS: As mutações de substituição Cys82Ser, Thr404Ser, Gly529Arg e His285Tyr apresentaram diminuição da atividade residual do receptor de LDL em linfócitos T. As mutações Glu 602X e His388ProfsX53 confirmaram sua patogenicidade e podem ser considerados como controle positivo para futuros ensaios funcionais.

CONCLUSÃO: Estudos que esclareçam os mecanismos moleculares da HF e da relação genótipo/fenótipo abrem perspectivas para o desenvolvimento de terapias mais específicas na redução dos níveis de colesterol e, conseqüentemente, da morbidade e mortalidade associadas às doenças cardiovasculares.

Palavras-Chave: *LDLR*, mutações, Hipercolesterolemia familiar, estudos funcionais, patogenicidade.

ABSTRACT

BACKGROUND/AIMS: Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant disorder characterized by elevated plasma levels of low-density lipoprotein (LDL), and development of corneal arcus tendinous xanthoma, and increased risk of coronary heart disease and premature stroke. Often misdiagnosed, it is estimated that only 10% of the 400.000 patients with FH in Brazil has knowledge of the disease itself, affecting in this way the quality and life expectancy of patients. Mutations in the LDL receptor (*LDLR*) are considered the most frequent genetic alterations for the development of familial hypercholesterolemia because compromise the ability of removal of circulating LDL particles, promoting its increase in plasma levels. Have been described over 1600 different mutations in the *LDLR* gene associated with the phenotype of FH, however, it is still difficult to determine in many of the deleterious effects on receptor activity. The aim of this study was to identify mutations in the *LDLR* gene and functionally characterize mutations not described in the literature to determine its pathogenicity in familial hypercholesterolemia. **METHODS:** The residual activity of *LDLR* was evaluated by raising LDL labeled with lipophilic fluorophore in cultured T lymphocytes of patients with the analyzed mutations after stimulation of T lymphocytes by specific mitogen. **RESULTS:** The substitution mutations Cys82Ser, Thr404Ser, Gly529Arg e His285Tyr caused decreased of the residual activity of the LDL receptor in T lymphocytes. The His388ProfsX53 and Glu602X mutations confirmed their pathogenicity and can be considered as positive control for future functional assays. **CONCLUSIONS:** Studies to clarify the molecular mechanisms of HF and genotype/ phenotype open perspectives for the development of more specific therapies for reducing cholesterol levels, and therefore the morbidity and mortality associated with cardiovascular diseases.

Keywords: *LDLR* mutations, familial hypercholesterolemia, functional studies, pathogenicity.

Os autores declaram que não têm nada a divulgar sobre financiamento de indústrias ou conflito de interesse com relação a este manuscrito.

*Endereço para correspondência: Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Rua Tenente Catão Roxo, 2501 Monte Alegre CEP: 14051-140-Ribeirão Preto, SP. Telefone: (16) 2101-9362. E-mail: Wilsonjr@usp.br

INTRODUÇÃO:

A doença cardiovascular (DCV) é considerada a principal causa de morte no mundo. Estima-se que em 2030 cerca de 23,6 milhões de pessoas morrerão de doenças coronárias ou acidente vascular cerebral, pela incidência cada vez maior de obesidade e diabetes no ocidente (MURRAY, 1997; SPOSITO, 2007; LLOYD-JONES, 2009; WHO, 2011). A hipercolesterolemia geralmente resulta de fatores ambientais, como dietas ricas em gorduras saturadas e/ou alterações em genes envolvidos no metabolismo das lipoproteínas (HOOPER *et al.*, 2012).

A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença autossômica dominante caracterizada por alterações no metabolismo dos lipídios desde o nascimento. Essas alterações levam à falha na remoção da LDL circulante, ocasionando uma maior permanência desta lipoproteína no organismo, deixando-a sujeita a várias modificações químicas que podem deflagrar mecanismos pró-aterogênicos (BROWN & GOLDSTEIN, 1986; SALAZAR *et al.*, 200; DANIELS *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012). A HF foi a primeira doença de base genética a ser reconhecida como uma das causas do infarto do miocárdio, sugerindo uma correlação positiva entre dislipidemias e doença cardiovascular (MÜLLER, 1938).

As alterações genéticas mais frequentes associadas com a HF são mutações pontuais ou deleções no gene do receptor da LDL (*LDLR*), ocorrendo de 85% a 90% dos casos (GOLDSTEIN & BROWN, 2001; SANTOS *et al.*, 2012). A HF pode se manifestar de forma heterozigótica ou homozigótica. Em pacientes HF heterozigóticos a concentração de colesterol total varia de 290 a 500 mg/dL, em pacientes homozigotos apresentam valores acima de 600 mg/dL e podem desenvolver DCV antes da segunda década de vida (HOBBS *et al.*, 1992; GOLDSTEIN *et al.*, 1995).

A análise do gene do *LDLR* já identificou mais de 1600 mutações que representam aproximadamente 90% de todos os casos de HF registrados; e podem desde expressar isotipos com afinidade reduzida para a LDL circulante a pouca ou nenhuma expressão do gene (HOBBS *et al.*, 1987; HORSTHEMKE, *et al.*, 1987; HOBBS *et al.*, 1988; LANGLOIS *et al.*, 1988; LEIGH, *et al.*, 2008).

Algumas mutações identificadas no gene *LDLR* não deixam dúvidas quanto a sua patogenicidade, como os grandes rearranjos (duplicações e deleções), mutações sem sentido (*nonsense*), que originam proteínas truncadas ou pequenas inserções e deleções

que alteram toda a sequência de aminoácidos (*frameshift*). Entretanto, ainda é difícil determinar a patogenicidade de algumas mutações não sinônimas, tendo em vista que várias delas, antes consideradas causadoras de HF, não ocasionavam nenhum efeito deletério na atividade do receptor (LOMBARDI *et al.*, 1997; NAUMOVA *et al.*, 2004).

Com o aperfeiçoamento das técnicas em biologia molecular houve um grande avanço na identificação de mutações nos genes associados com a hipercolesterolemia familiar. No entanto, estudos que visam à caracterização funcional e determinação da patogenicidade das mutações nesses genes ainda são reduzidos. Grande parte se deve a ausência de métodos confiáveis, mais simples e menos dispendiosos para avaliações funcionais.

O Objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização funcional para determinação de patogenicidade de mutações não descritas na literatura em pacientes com hipercolesterolemia familiar.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes e controles

Foram selecionados 18 indivíduos para realização de estudo funcional de mutações não descritas na literatura especializada. Os experimentos do projeto foram desenvolvidos no Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Foram excluídos pacientes com insuficiência renal e hipotireoidismo, além dos indivíduos que se recusaram a participar da pesquisa. O grupo controle foi composto por 10 indivíduos normocolesterolêmicos e sem histórico de doenças cardiovasculares, constituído por estudantes e funcionários do Centro Regional de Hemoterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto FMRP/USP, processo número HCRP 9139/2010. Todos os envolvidos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para serem incluídos no projeto.

Isolamento de Células Mononucleares

Após a coleta do material biológico, 9ml de sangue periférico, foram adicionados a 18 ml de PBS (solução tampão de fosfato) com ausência de Ca^{2+} e Mg^{2+} (pH 7,4), que foram ser transferidos para um tubo já contendo 13 ml de Ficoll-Paque (GE Helthcare). Posteriormente, ocorreu a separação por centrifugação a 1.500 RPM por 30 min a 4°C. Após a centrifugação, as células mononucleares do sangue periféricos (PBMC) foram isoladas a partir da aspiração do anel de células presente na interfase soro/Ficoll. As células aspiradas foram lavadas três vezes com PBS e armazenadas em nitrogênio líquido com FBS (soro fetal bovino) (Lonza) 90% e DMSO (dimetilsulfóxido) 10% até o momento da sua utilização.

Estimulação de linfócitos T e Captação de LDL Marcado

Antes de serem utilizadas, as células descongeladas passaram por duas etapas de lavagem em FBS e em seguida, foram contadas e semeadas em placa de 24 poços (BD-Falcon) contendo 1×10^6 células/ml em cada poço com IMDM (Meio modificado de Iscove de Dulbecco) suplementado com 10% LPDS (soro deficiente em lipoproteínas) humano para induzir a síntese de LDLR e 2% do suplemento Ultra glutamina. A estimulação dos linfócitos T foi realizada durante 48h a 37°C e a 5% de CO_2 , com 1 μM de ionomicina (Sigma-Aldrich) e 10 ng/ml de PMA (acetato de miristato de forbol) de acordo com Makar (1994). A atividade LDLR residual foi avaliada através da análise da captação da LDL marcada com Alexa Fluor 488-labeled LDL (Life Technologies), em linfócitos T estimulados por mitógeno. As células foram recolhidas e diluídas a 10^6 células/ml em DMEM:F12 (Dulbecco de meio de Eagle) (Sigma-Aldrich), sem fenol *red* e LPDS. Duas alíquotas de células de cada amostra analisada foram incubadas durante 3h a 37°C e a 5% de CO_2 seguido de 30 mg/L de LDL não marcado (Sigma-Aldrich), para medir background de fluorescência e 10 mg /L de LDL Alexa flúor 488 para estimar a ligação e a captação máxima de LDL. Após três lavagens com PBS sem Ca^{2+} e Mg^{2+} , a intensidade da fluorescência foi medida por citometria de fluxo FACSCanto (Becton-Dickinson), de acordo com as

instruções do fabricante. *Gates* de dispersão frontal e lateral foram estabelecidos para excluir as células mortas e *debris* celulares. Os resultados foram expressos com a mediana da fluorescência e com a razão entre a mediana da intensidade de fluorescência das células de pacientes com a média da intensidade de fluorescência das células de indivíduos sem mutação. Esta razão representa a atividade residual do LDLR.

Análises Estatísticas

A distribuição normal das variáveis foi avaliada utilizando o teste Kolmogorov-Smirnov. As variáveis contínuas foram indicadas com média e desvio padrão (DP). A diferença entre as variáveis contínuas foram avaliadas por test-t. Em todas as avaliações estatísticas, o $p < 0,05$ foi considerado como significativo. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o SPSS versão 18.0 (SPSS Inc.). A determinação e descrição de mutações através do sequenciamento direto do gene alvo e análise das sequências foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática através do *software* SNPIndex disponíveis via web no portal GDM (GENOME DATA MINING, 2006).

Resultados

Foram coletados 18 pacientes com mutações não descritas, entretanto, foram realizados os estudos funcionais em 11 pacientes e 10 controles normocolesterolêmicos. As médias e medianas da intensidade da fluorescência e a atividade residual dos pacientes e dos controles podem ser visualizados nas tabelas 1 e 2.

A atividade residual do *LDLR* foi calculada usando a média das medianas da intensidade de fluorescência dos controles, dividida pela mediana da intensidade de fluorescência de cada paciente analisado, com os dados são apresentados em porcentagem. Os valores máximos e mínimos da atividade residual dos pacientes foram 231,76% e 26,17% e nos controles foram 108,87% e 53,01%, respectivamente.

As atividades residuais entre pacientes e controles não foram estatisticamente significante, como mostrado na figura 1. Mas ao parear os controles e os pacientes HF de acordo com a idade e o sexo (tabela 3) e comparar as atividades residuais, observou-se diferença estatisticamente significante como mostrado nas figuras 2 e 3 ($p=0,041$).

Discussão

Foram introduzidos ao estudo 18 pacientes com diagnóstico clínico e molecular de HF, mas por problemas operacionais o estudo funcional foi realizado em apenas 11 deles. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na atividade residual do *LDLR* de pacientes e controles, indicando que a presença de mutação não afetaria a função do receptor no metabolismo lipoproteico dos pacientes. Resolveu-se parear os pacientes e controles por sexo e idade para afastar algum possível viés de seleção. Desta maneira, as medianas da intensidade de fluorescência e atividade residual do receptor foram estatisticamente maiores nos controles em comparação com os pacientes.

As mutações Glu602X e His388ProfsX53 confirmaram sua patogenicidade e podem ser considerados como controle positivo de efeito deletério ao receptor. As mutações de substituição Cys82Ser, Thr404Ser, Gly529Arg e his285Tyr apresentaram redução da atividade do receptor em comparação ao grupo controle pareado.

Observou-se que em alguns pacientes a atividade do receptor era apenas um pouco abaixo da atividade do seu controle correspondente, até mesmo em mutações classificadas como patogênicas. Sabia-se que mais de 70% dos pacientes faziam uso de atorvastatina, com ou sem combinação com ezetimibe e ácido nicotínico, em diferentes dosagens. É provável que em alguns pacientes, o uso de fármacos hipolipemiantes tenha causado uma superexpressão de receptores de LDL, deixando-os com atividade residual comparável aos controles saudáveis (BAYS & STEIN, 2003).

É eticamente infundada a interrupção do tratamento dos pacientes, pois as pesquisas partem do princípio que não prejudicarão de nenhuma forma a saúde de seus participantes. Seria interessante iniciar a coleta e isolamento de células mononucleares logo após a confirmação de diagnóstico clínico e antes de qualquer intervenção medicamentosa que altere o quadro inicial do paciente. A construção de uma biblioteca de células mononucleares de pacientes que ainda não iniciaram tratamento seria de significativa importância para pesquisa de mutações novas ou conhecidas sem informações de patogenicidade. Um banco de dados com a atividade residual de indivíduos sem diagnóstico clínico de HF poderia traçar um perfil da população saudável quanto a sua homeostase na via do receptor de LDL e fundamentar referências para comparação com pacientes, mediante a reprodução fidedigna do protocolo escolhido para essa avaliação.

Adotamos métodos de estimulação de linfócitos T, captação de LDL marcada com fluoróforo e comparação com o grupo controle, semelhantes aos outros estudos publicados em revistas especializadas (ROMANO, *et al.*, 2001; ETXEBARRIA, *et al.*, 2011).

Estudos que esclareçam os mecanismos moleculares da HF e da relação genótipo/fenótipo abrem perspectivas para o desenvolvimento de terapias mais específicas na redução dos níveis de colesterol e, conseqüentemente, da morbidade e mortalidade associadas às doenças cardiovasculares.

Referências

BAYS, H; STEIN, EA. Pharmacotherapy for dyslipidaemia – current therapies and future agents. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2003, vol. 4, no. 11, pp. 1901 – 1938.

BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, 232: 34-47, 1986.

DANIELS, T.F.; KILLINGER, K.M.; MICHAL, J.J., *et al.* Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. **Int J Biol Sci**, 5: 474-488, 2009.

GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. The cholesterol quartet. **Science**, 292: 1310-1312, 2001.

GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. The LDL Receptor. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 29:431-438, 2009.

GOLDSTEIN, J.L.; HOBBS, H.H.; BROWN, M.S. Familial hypercholesterolemia. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D., Eds. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 7. ed. New York: McGraw-Hill, 1995, p.1981-2030.

HAVEL, R.J.; KANE, J.P. Introduction: Structure and metabolism of plasma lipoproteins. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D., Eds. **The Metabolic basis of Inherited Disease**. 7. ed. New York: McGraw-Hill, 1995. p.1841-1851.

HOBBS, H.H.; BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. **Hum Mutat**, 1:445-466, 1992.

HOBBS, H.H.; BROWN, M.S.; RUSSELL, D.W., *et al.* Deletion in the gene for the low-density-lipoprotein receptor in a majority of french canadians with familial hypercholesterolemia. **N Engl J Med**, 317(12):734-737, 1987.

HOBBS, H.H.; LEITERSDORF, E.; GOLDSTEIN, J.L., *et al.* Multiple crm-mutations in familial hypercholesterolemia: evidence for 13 alleles, including four deletions. **J Clin Invest**, 81(3):909-917, 1988.

HOOPER, L.; SUMMERBELL, C.D.; THOMPSON, R., *et al.* Reduced or modified dietary fat for preventing cardiovascular disease. **Cochrane Database Syst Rev**, 00:000-000, 2012.

HORSTHEMKE, B.; DUNNING, A.; HUMPHRIES, S. Identification of deletions in the human low density lipoprotein receptor gene. **J Med Genet**, 24(3):144-147, 1987.

LANGLOIS, S.; KASTELEIN, J.J.; HAYDEN, M.R., *et al.* Characterization of six partial deletions in the low-density-lipoprotein (ldl) receptor gene causing familial hypercholesterolemia (FJ). **Am J Hum Genet**, 43(1):60-68, 1988.

LEIGH, S.E.; FOSTER, A.H.; WHITTAL, R.A., *et al.* Analysis of the university college london low density lipoprotein receptor familial hypercholesterolemia data base. **Ann Hum Genet**, 72: 485-498, 2008.

LLOYD-JONES, D.; ADAMS, R.; CARNETHON, M., *et al.* Heart disease and stroke statistics 2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation**, 119: 480-486, 2009.

LOMBARDI, P.; SIJBRANDS, E.J.; KAMERLING, S., *et al.* The T705I mutation of the low density lipoprotein receptor gene (FH Paris-9) does not cause familial hypercholesterolemia. **Hum Genet**, 99: 106-107, 1997.

MAKAR, R.S.; LIPSKY, P.E.; CUTHBERT, J.A. Non-sterol regulation of low density lipoprotein receptor gene expression in T cells. **J. Lipid Res**, 35: 1888 – 1895, 1994

MÜLLER, C. Xanthomata, hypercholesterolemia, angina pectoris. **Acta Med Scand**, 89: 75-84, 1938.

MURRAY, C.J.; LOPEZ, A.D. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global burden of disease study. **Lancet**, 349:1436-1442, 1997.

NAOUMOVA, R.P.; NEUWIRTH, C.; POTTINGER, B., *et al.* Genetic diagnosis of familial hypercholesterolaemia: a mutation and a rare non-pathogenic amino acid variant in the same family. **Atherosclerosis**, 174: 67-71, 2004.

ROMANO, M.; DI TARANTO, M.D.; MIRABELLI, P., *et al.* An improved method on stimulated T-lymphocytes to functionally characterize novel and known LDLR mutations. **J Lipid Res**, 52: 2095-2100, 2011.

SALAZAR, L.A.; CAVALLI, S.A.; HIRATA, M.H., *et al.* Polymorphisms of the low-density lipoprotein receptor gene in brazilian individuals with heterozygous familial hypercholesterolemia. **Braz J Med Biol Res**, 33: 1301-1304, 2000.

SANTOS, R.D.; GAGLIARDI, A.C.M.; XAVIER, H.T., *et al.* Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). **Arq Bras Cardiol**, 99(2 Supl. 2):1-2, 2012.

SOUTAR, A.K.; NAOUMOVA, R.P. Mechanisms of Disease: genetic causes of familial Hypercholesterolemia. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med**, 4: 214-225, 2007.

SPOSITO, C.A.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F.A.H., *et al.* IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol**, 88 (S1): 2-18, 2007.

WHO. **Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control**. Geneva: WHO Press, 2011. 155 p.

Tabela 1. Médias e medianas da intensidade de fluorescência e atividade residual em pacientes

Alteração	Média Fluorescência	Mediana Fluorescência	Atividade Residual (%)
p.(Gln163X)	1082,43	103,66	103,15
p.(Phe629TyrfsX 16)	472,02	65,52	65,2
p.(Cys82Ser)	692,8	71,05	70,7
[Ex15_Ex16del]	1705,45	184,34	183,43
p.(Glu602X)	853,17	81,31	80,91
p.(Tyr42X)	1328,5	232,91	231,76
[Ex11_Ex12dup]	1360,3	162,53	161,73
p.(Thr404Ser)	304,46	26,3	26,17
p.(His388Profs X 53)	56,32	26,78	26,64
p.(Gly529Arg)	41,72	27,14	27
p.(His285Tyr)	1122,70	88,96	88,52

Tabela 2. Médias e medianas da intensidade de fluorescência e atividade residual nos controles

Identificação Controle	Média Fluorescência	Mediana Fluorescência	Atividade Residual (%)
C1	922,51	83,54	83,13
C2	498,60	53,28	53,01
C3	997,47	283,87	282,48
C4	103,92	57,25	56,96
C5	770,73	73,65	73,28
C6	660,31	91,4	90,95
C7	504,79	73,65	73,28
C8	769,28	75,67	75,29
C9	178,48	103,2	102,69
C10	811,37	109,41	108,87

Tabela 3. Médias e medianas da intensidade de fluorescência e atividade residual em pacientes e controles Pareados por idade e sexo

Alteração	Identificação	Mediana Fluorescência	Mediana	Atividade	Atividade
Pacientes	Controle	Pacientes	Fluorescência	Residual (%)	Residual (%)
			Controles	Pacientes	Controles
p.Cys82Ser	C1	71,05	83,54	58,45	68,73
p.Glu602X	C3	81,31	283,87	66,89	233,53
p.Thr404Ser	C5	26,3	73,65	21,64	60,59
p.(His388ProfsX53)	C8	26,78	75,67	22,03	62,25
p.Gly529Arg	C9	27,14	103,2	22,33	84,90
p.His285 Tyr	C10	88,96	109,41	73,18	90,01

Figura 1. Representação da atividade residual do *LDLR* entre pacientes e controles

Figura 2. Representação da atividade residual do *LDLR* entre pacientes e controles Pareados por idade e sexo

Figura 3. Representação da atividade residual do *LDLR* entre pacientes e controles totais e Pareados por idade e sexo