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

ALDRINA LAURA DA SILVA COSTA HONORATO

Investigação de mutações no gene PCSK9 em famílias com diagnóstico clínico de
Hipercolesterolemia Familiar

Ribeirão Preto - SP

2018

ALDRINA LAURA DA SILVA COSTA HONORATO

**Investigação de mutações no gene PCSK9 em famílias com diagnóstico clínico de
Hipercolesterolemia Familiar**

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto - USP para obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas

Área de concentração: Clínica Médica

Opção: Investigação Biomédica

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vivian Marques Miguel Suen

Ribeirão Preto - SP

2018

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Honorato, Aldrina Laura da Silva Costa

Investigação de mutações no gene PCSK9 em famílias com diagnóstico clínico de Hipercolesterolemia Familiar./Aldrina Laura da Silva Costa Honorato; Orientadora Vivian Marques Miguel Suen – Ribeirão Preto, 2018

99f: il.

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo, 2018. Área de concentração: Clínica Médica.

1. Hipercolesterolemia Familiar 2. Doenças Cardiovasculares 3. lipoproteína de baixa densidade 4. proprotein convertase subtilisina kexin tipo 9 (PCSK9).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluna: Aldrina Laura da Silva Costa Honorato

Título: Investigação de mutações no gene PCSK9 em famílias com diagnóstico clínico de Hipercolesterolemia Familiar

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto - USP para obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas

Área de concentração: Clínica Médica

Opção: Investigação Biomédica

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 2018.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof.^(a) Dr.^(a) _____

Instituição _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

DEDICATÓRIA

A meu pai, que apesar de ter apenas a 5ª série do ensino fundamental, era um homem culto e sedento por leitura e que partiu desse lado sem presenciar a formação dos seus quatro filhos em universidades pública e que sonhava em vê-los ‘doutores’.

Em especial a minha mãe que com sua coragem, determinação e amor pela família, sempre se esforçando para oferecer o melhor para seus filhos, acreditando que a educação seria a melhor herança que poderia deixar, um exemplo de luta, uma mulher guerreira.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por estar presente em todos os momentos me transmitindo coragem e fé, por me presentear com o dom da vida e por me permitir concluir mais uma etapa da minha vida;

A minha orientadora **Prof.^a Dr. Vivian Marques Miguel Suen**, que aceitou me orientar, me permitindo conquistar este título se fazendo parte integrante desse trabalho, por sempre me transmitir serenidade e segurança, além de valores como humildade e gratidão. Serei sempre grata pela oportunidade e por ser referência de sabedoria, paciência e humildade em minha vida.

Ao meu esposo **Abraão Honorato** que me apóia em todas as minhas conquistas e decisões, por ser a peça chave nesse elo de entrada para USP, por toda paciência e compreensão pela distância durante o primeiro ano de mestrado. Amor da minha vida.

A minha família, em especial minha irmã Jaina, minha companheira e incentivadora dos meus sonhos e projetos.

A minha amiga Eliselma que foi a primeira incentivadora desse projeto de vida, me ensinando os meios de como entrar no mestrado, até mesmo coisas simples como o uso do lattes, porém fundamental para iniciar uma carreira acadêmica.

As amigas Margarete, Ivana e Caroline por serem minhas amigas parceiras em Ribeirão Preto, a referência de família, uma vez que estávamos longe de nossa família.

Aos pacientes, pela disponibilidade de participarem dessa pesquisa, sendo eles o motivo dessa investigação.

Aos pesquisadores e funcionários do Hemocentro, em especial ao professor Dr. Wilson, a pesquisadora Greice e as técnicas Thaís e Jeni, pela enorme colaboração e ensinamentos nesse mundo da biologia molecular.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram no desenvolvimento desse trabalho.

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria”.

Coríntios 13:2

RESUMO

HONORATO, A. L. S. C **Investigação de mutações no gene PCSK9 em famílias com diagnóstico clínico de Hipercolesterolemia Familiar.** 2018. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2018.

A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma alteração de origem genética comum que pode se manifestar clinicamente desde o nascimento e provoca um aumento nos níveis plasmáticos de LDL-colesterol (LDL-c), xantomas e doença coronária prematura. Sua detecção e tratamento precoce reduzem a morbidade e mortalidade coronária. A identificação e rastreamento em cascata familiar usando níveis de LDL-c e detecção genética é a estratégia mais aconselhável e rentável para descoberta de novos casos. O tratamento crônico com estatinas reduz o risco cardiovascular da população em geral, contudo, estudos clínicos com estatinas revelam risco cardiovascular residual mesmo após correção das concentrações de LDL-c. Com o surgimento de novas drogas e mais recentemente um inibidor da enzima pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), este estudo enfatizou na investigação específica para aqueles acometidos com defeitos genéticos nessa enzima, por ser de frequência ainda mais rara e pouco estudada, necessitando de melhor investigação na população em estudo a fim de rastrear a ocorrência de mutações patológicas na PCSK9. O objetivo desse estudo foi identificar e caracterizar mutações e/ou deleções patológicas no gene PCSK9 em pacientes com Hipercolesterolemia Familiar provenientes do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da FMRP/USP selecionados para o teste genético. Foi feito o rastreamento de mutações pelo método High Resolution Melting (HRM), de forma prática, rápida e eficiente, onde mutações detectadas foram seqüenciadas. Foram identificadas 7 mutações não patogênicas, caracterizando que a população estudada não apresenta Hipercolesterolemia Familiar associada a mutações no gene PCSK9, fato que não exclui o diagnóstico por outros defeitos genéticos associados a doença.

Palavras chaves: Hipercolesterolemia Familiar, Doenças Cardiovasculares, lipoproteína de baixa densidade, proprotein convertase subtilisina kexin tipo 9 (PCSK9).

ABSTRACT

HONORATO, A. L. S. C. **Investigation on the PCSK9 gene mutations in families with clinic diagnosis of Familial Hypercholesterolemia.** 2018. 99pp. Master's dissertation (Master's Degree in Medical Sciences) – Ribeirão Preto Medical School (RPMS), University of São Paulo University (USP), 2018.

Familial hypercholesterolemia (FH) is an alteration of common genetic origin that can manifest clinically from birth and which causes an increase in the LDL-cholesterol plasma levels (LDL-c), xanthomas and premature coronary disease. Its early detection and treatment reduce morbidity and coronary mortality. The identification and tracking in familial cascade using levels of LDL-c and genetic detection is the most advisable and profitable strategy to find new cases. The chronic treatment with statins reduces the cardiovascular risk in the population in general. However, clinic studies on statins show a residual cardiovascular risk even after the correction of LDL-c concentrations. With the appearance of new drugs and, more recently, of a proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 enzyme inhibitor (PCSK9), this study highlighted the specific investigation for those stricken by genetic defects in this enzyme, once it is even rarer and understudied and needs further investigation in the study's population aiming at tracking the occurrence of a pathological mutation in the PCSK9. This study aimed at identifying and characterizing mutations and/or pathological deletions in the PCSK9 gene in patients with Familial Hypercholesterolemia from the RPMS/USP Ribeirão Preto Clinical Hospital which were selected for the genetic test. We performed the mutation tracking by using the High Resolution Melting (HRM) method in a practical, fast and efficient way, where the mutations detected were sequenced. We identified 7 non-pathogenic mutations, showing that the population studied does not present Familial Hypercholesterolemia associated to mutations in the PCSK9 gene, which doesn't exclude the diagnosis by other genetic defects associated to the disease.

Key words: Familial Hypercholesterolemia, Cardiovascular Diseases, low density lipoprotein, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9).

LISTA DE FIGURAS

1	Representação da formação da placa de ateroma no interior do vaso sanguíneo	17
2	Ciclos de transporte de lípidos no plasma.	22
3	Biossíntese do colesterol a partir da acetil coenzima A.	23
4	Xantelasmas extensos nas quatro pálpebras	25
5	Xantoma no tendão de Aquiles e Xantoma tendinoso (A) em região dorsal da mão e xantomas planares intertriginosos (B)	25
6	Síntese e reciclagem do LDLR; b - síntese, secreção de PCSK9 e efeito no LDLR (o PCSK9 liga-se ao LDLR e, por internalização, direciona o LDLR para a degradação dos lisossomos, diminuindo o número de LDLRs na superfície celular	27
7	Representação esquemática do gene e proteína do PCSK9	29
8	Papel do PCSK9 na Regulação do Metabolismo do LDL-R	32
9	Esquema do componente murino e humano, segundo o tipo de anticorpo monoclonal	34
10	Evolução dos anticorpos monoclonais e a sua relação com a capacidade de formação de uma resposta imune contra os anticorpos monoclonais usados em terapia	35
11	Atividade do agente fluorescente. A: saturação do corante na dupla fita de DNA. B: gradativo da temperatura. C: início da desnaturação e diminuição da fluorescência.	46
12	Esquema ilustrando a temperatura ideal para detecção de variações na temperatura de melting causada por mutações	47
13	Esquema ilustrando a temperatura de <i>melting</i> de uma sequência normal (controle) e outra com mutação.	47
14a	Classificação do estado nutricional segundo o índice de massa corporal	56
14b	Percentual de homens e mulheres com circunferência da cintura elevada.	57

LISTA DE TABELAS

1	Critérios de diagnóstico de HF, com base no lipidograma	28
2	Critérios diagnósticos da HF	40
3	Temperaturas de anelamento dos primers da PCSK9	53
4	Mutações encontradas no gene PCSK9	54
5	Caracterização clínica observada no momento da entrevista.	55
6	Valores de mínimo, máximo, média e desvio padrão, para os valores de idade, peso, estatura, IMC, Circunferência da Cintura (CC) e Circunferência do Braço (CB) mensurados nos participantes.	57
7a	Valores de mínimo, máximo, média e desvio padrão, gordura, massa muscular, taxa metabólica basal e água, mensurados na bioimpedância tetrapolar nas mulheres.	58
7b	Valores de mínimo, máximo, média e desvio padrão, gordura, massa muscular, taxa metabólica basal e água, mensurados na bioimpedância tetrapolar nos homens.	58
8	Valores de mínimo, máximo, média e desvio padrão, para os valores de Colesterol total, triglicérides, HDL-c, L DL-c, mensurados nos participantes	59
9	Número de pacientes por faixa de valores de LDL e uso de estatinas.	59

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ACAT	Acil-CoA:Colesteril Aciltransferase
APO	Apolipoproteína
CPK	Creatinofosfoquinase
DAC	Doença Arterial Coronariana
DCNT	Doenças Crônicas não Transmissíveis
DCV	Doenças Cardiovasculares
DNA =	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleótido Trifosfatado
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF-A	Fator de crescimento epidérmico de repetição do domínio A
FDA	Food and Drug Administration
HAD	Hipercolesterolemia Autossômica Dominante
HCFMRP/USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HF	Hipercolesterolemia Familiar
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
HRM	High Resolution Melting
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IDL	Lipoproteína de densidade intermédia
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-c	Colesterol presente na Lipoproteína de baixa densidade
LDLR	Receptor das lipoproteínas de baixa densidade
Lp(a)	lipoproteína (a)
MEDPED	Make Early Diagnosis to Prevent Early Death
MoAbs	Anticorpos monoclonais
NPC1-L1	Niemann-Pick C1-like 1
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	Reação da cadeia de polimerase
PCSK9	Proteína Convertase Subtilisina Kexina tipo 9

SREBP-2	Sterol-regulatory element-binding protein ou proteína reguladora do elemento de esterol
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
TG	Triglicerídeos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Doenças Cardiovasculares	15
1.2 Biossíntese do Colesterol	18
1.3 Fisiopatologia da Hipercolesterolemia Familiar	25
1.4 Perfil Lipídico da Hipercolesterolemia familiar	28
1.5 Função e mecanismos de ação da enzima PCSK9 e seu gene	29
1.6 Drogas hipolipemiantes usuais e a terapia com anticorpos monoclonais (mAb).	32
2. JUSTIFICATIVA	37
3. HIPÓTESE	38
4. OBJETIVOS	39
4.1 Objetivo Geral	39
4.2 Objetivos Específicos	39
5. METODOLOGIA	40
5.1 Tipo de estudo	40
5.2 Casuística e critérios de inclusão e exclusão	40
5.3 Aspectos éticos	42
5.4 Critérios de identificação clínica para Hipercolesterolemia Familiar	42
5.5 Coleta e análise bioquímica	42
5.6 Análise de mutações no gene PCSK9	43
5.6.1 Extração de DNA	43
5.6.2 Reação da Cadeia da Polimerase (PCR)	44
5.6.3 High Resolution Melting (HRM)	45
5.6.4 Sequenciamento de DNA	48
5.7 Questionário de hábitos de saúde.	48
5.8 Avaliação do estado nutricional	49
5.8.1 Questionário de Frequência de Consumo Alimentar (QFCA)	49
5.8.2 Antropometria	50
5.8.3 Avaliação da composição corporal por bioimpedância tetrapolar	50
5.9 Questionário socioeconômico	51

5.10 Análise Estatística	51
6. RESULTADOS	52
6.1 Temperatura de anelamento por PCR em tempo real	53
6.2 Detecção de mutações por HRM	54
6.3 Dados clínicos em percentual observados no questionário de saúde	54
6.4 Considerações sobre o questionário de frequência alimentar	55
6.5 Classificação clínica por antropometria e bioimpedância	55
6.4 Parâmetros bioquímicos do lipidograma	59
7. DISCUSSÃO	61
8. CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS	72
APENDICES	79

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Cardiovasculares

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 *mellitus* no ocidente. No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde de 2006, foram registrados aproximadamente 300 mil óbitos em decorrência de doenças cardiovasculares, representando quase 30% do total de mortes registradas no país (VASCONCELOS, 2015).

As doenças cardiovasculares são aquelas que afetam o sistema circulatório, ou seja, os vasos sanguíneos e o coração. É um termo bastante amplo que envolve várias doenças cardíacas e vasculares mais específicas. Como resultado do desequilíbrio dos mecanismos da fisiologia natural do músculo cardíaco, vários sintomas e doenças manifestam-se. Dentre esses estão inclusos: as cardiopatias coronárias, acidentes cerebrovasculares, hipertensão arterial, cardiopatias reumáticas, congênitas, vasculopatia periférica e insuficiência cardíaca, sendo a doença arterial coronária (DAC) e a aterosclerose as que mais acometem a população. Entre os eventos mais comuns estão os acidentes vasculares cerebrais, infarto do miocárdio, angina do peito e a própria aterosclerose, além disso, pacientes que possuem doenças cardiovasculares podem apresentar um único ou uma gama de sinais e/ou sintomas, sendo que esses podem não ser de origem cardiovascular (WHO, 2011).

De modo geral, as DCV são descritas como um conjunto de doenças que afetam todo o aparelho cardiovascular – coração e vasos sanguíneos. A doença arterial coronária e a doença cerebrovascular são alguns dos exemplos de DCV, as quais são definidas como doenças multifatoriais resultantes da combinação de diversos fatores de risco nomeadamente na associação com outras doenças como hipertensão arterial, diabetes *mellitus*, obesidade e dislipidemias (essencialmente hipercolesterolemia) (BONNEY, 2004).

As DCV apresentam dados estatísticos elevados de morbidade e mortalidade, principalmente nos países subdesenvolvidos, uma vez que, um arsenal de fatores de risco como obesidade, diabetes *mellitus* e o tabagismo atuam na predisposição para o desenvolvimento da aterosclerose, e estão associados, na sua grande maioria, com baixo nível socioeconômico e cultural. A aterosclerose afeta artérias elásticas e musculares e caracteriza-

se por lesões do tipo ateromas, decorrentes de acúmulo de colesterol e proliferação de células musculares na túnica íntima, modificando a mesma e proporcionando complicações circulatórias (ROSS, 1999). Geralmente, prevalece em artérias das regiões: cerebral, coronariana e periférica. As estrias precursoras das placas ateroscleróticas podem aparecer na aorta aos três anos de idade, e nas coronárias na adolescência; fato que desmistifica a designação da patologia como sendo restrita a idosos (MATOS et al., 2012). Níveis elevados de colesterol sérico são associados com aterosclerose prematura em adolescentes e adultos jovens (COELHO et. al.; 2005).

A formação da placa aterosclerótica inicia-se com a agressão ao endotélio vascular devida a diversos fatores de risco como dislipidemia, hipertensão arterial ou tabagismo. Como consequência, a disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da íntima às lipoproteínas plasmáticas, favorecendo a retenção das mesmas no espaço subendotelial. Retidas, as partículas de LDL sofrem oxidação, causando a exposição de diversos neoepitopos e tornando-as imunogênicas. O depósito de lipoproteínas na parede arterial, processo-chave no início da aterogênese, ocorre de maneira proporcional à concentração dessas lipoproteínas no plasma. Os macrófagos repletos de lípidos são chamados de células espumosas e são o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose. Uma vez ativados, os macrófagos são, em grande parte, responsáveis pela progressão da placa aterosclerótica mediante a secreção de citocinas, que amplificam a inflamação, e de enzimas proteolíticas, capazes de degradar colágeno e outros componentes teciduais locais. Outras células inflamatórias também participam do processo aterosclerótico(figura 1) (XAVIER et al., 2013).

Figura 1-Representação da formação da placa de ateroma no interior do vaso sanguíneo

Fonte: CRID (2014).

Colesterol LDL elevado ($> 130\text{-}160\text{ mg / dl}$) é um dos principais fatores de risco para DAC. Para cada aumento de 1% no colesterol LDL, o risco de DAC aumenta de 1% a 2%. Além disso, a redução do colesterol LDL reduz drasticamente o risco de doença coronária pelo mesmo montante. Portanto, o nível de colesterol LDL deve ser cuidado para minimizar o risco de doença coronariana.(RUDENKO L.; DEISENHOFER J., 2003).

Para quase todos esses distúrbios, as variantes de sequência de DNA herdadas desempenham um papel na conferência de risco para a doença. Por exemplo, na população em geral, uma história de DCV aterosclerótica prematura em um dos pais confere um aumento de 3% no risco cardiovascular para descendentes (LLOYD JONES et al., 2004). A magnitude precisa do papel da herança, no entanto, varia de acordo com a doença e por outros fatores, como idade do início da doença e subtipo de doença.

Diversos estudos epidemiológicos envolvendo pacientes hiperlipêmicos têm mostrado uma relação direta entre o risco de desenvolvimento de DAC e lesões ateroscleróticas, devido às elevadas concentrações de lipídios sanguíneos, geralmente na forma de lipoproteínas. A hiperlipidemia ou hiperlipemia pode ser causada por distúrbio genético, influências ambientais ou por uma combinação destes fatores (WITZTUM, 1997).

A presença de história familiar é um importante fator de risco para a doença arterial coronariana. Da mesma forma que os antecedentes familiares são dependentes das características genéticas (MANSUR, 2000).

1.2 Biossíntese do Colesterol

O colesterol é um esteróide componente essencial da membrana celular, precursor de hormônios esteróides, várias vitaminas e bile. É também o componente essencial da mielina que cobre os nervos e, assim, permite a condução do impulso elétrico para garantir a resposta correta pelos tecidos efetores. Uma fração de colesterol é obtida a partir de alimentos, mas a maior proporção é sintetizada no fígado e daí passa a circulação geral, sendo transportada por lipoproteínas, que são de peso molecular diferente (ZÁRATE, 2016).

O colesterol está presente nos tecidos na forma de colesterol livre e no plasma em combinação com um ácido graxo de cadeia longa, na forma de éster de colesteril, sua forma de armazenamento. No plasma, ambas as formas são transportadas em lipoproteínas. O colesterol é lipídio anfipático e, desse modo, um componente estrutural essencial das membranas, onde é importante na manutenção da permeabilidade e da fluidez apropriada, bem como da camada externa das lipoproteínas plasmáticas. É sintetizado em muitos tecidos a partir de acetil- CoA, é precursor de todos os outros esteróides no organismo, incluindo os corticosteróides, os hormônios sexuais, os ácidos biliares e a vitamina D. Como produto típico do metabolismo animal, é encontrado nos alimentos de origem animal, como a gema do ovo, a carne, o fígado e o cérebro. A lipoproteína de baixa densidade (LDL) do plasma é o veículo que fornece o colesterol e o éster de colesteril em muitos tecidos. O colesterol livre é removido dos tecidos pela lipoproteína de alta densidade (HDL) plasmática e transportado até o fígado, onde é eliminado do organismo em sua forma inalterada ou após conversão em ácidos biliares por um processo conhecido como transporte reverso do colesterol. O colesterol é um importante constituinte dos cálculos biliares. Entretanto, seu principal papel em processos patológicos consiste em atuar como fator na gênese da aterosclerose de artérias vitais, causando doença vascular cerebral, coronariana e periférica (BOTHAM, 2017).

Devido sua importância, todas as células são capazes de sintetizá-lo a partir de moléculas simples, portanto, não é necessário que esteja presente na dieta de mamíferos (LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, 2008). A síntese e o uso do colesterol precisam de uma regulação rigorosa para que esteja disponível em suas funções, mas também para evitar seu

excesso. Todas as células podem fazer esta regulação, no entanto, a regulação alterada da síntese, absorção e excreção predispõe a doenças cardiovasculares de origem aterosclerótica. O controle dos níveis depende de dois aspectos principais: sua produção intracelular e sua absorção pela célula (HANUKOGLU, 1992).

O colesterol circulante precisa ser transportado pelas lipoproteínas, uma vez que é insolúvel; os quilomícrons são transportadores, mas também existe lipoproteína de baixa densidade (LDL), densidade muito baixa e lipoproteína de alta densidade (HDL). A principal fonte vem da síntese interna que inclui entre 800 a 1.500mg por dia, aos quais são adicionados aproximadamente 300mg provenientes dos alimentos. No intestino delgado é absorvido cerca de 40% da gordura total que atravessa o trato digestivo e estes são embalados simultaneamente com triglicérides como quilomícrons que são de menor densidade e maior tamanho (contendo apoproteína A, B e E) (OLSO., 1998).

As lipoproteínas são agregados macromoleculares que transportam triglicerídeos (TG) e colesterol pelo plasma. São compostas por uma parte lipídica (TG e colesterol esterificado) que constitui um núcleo hidrofóbico que é revestido por uma camada hidrofílica, composta de fosfolípídios, colesterol não esterificado e apolipoproteínas (APO) (COHEN E ARMSTRONG, 2009). As lipoproteínas permitem a solubilização e o transporte dos lípidos, que são substâncias geralmente hidrofóbicas, no meio aquoso plasmático. São compostas por lípidos e proteínas denominadas Apolipoproteínas (apo). As apo têm diversas funções no metabolismo das lipoproteínas, como a formação intracelular das partículas lipoproteicas, caso das apo B100 e B48, e a atuação como ligantes a receptores de membrana, como as apo B100 e E, ou cofatores enzimáticos como as apo CII, CIII e AI. Existem quatro grandes classes de lipoproteínas (quadro 1) separadas em dois grupos: (i) as ricas em TG, maiores e menos densas, representadas pelos quilomícrons, de origem intestinal, e pelas Lipoproteínas de Densidade Muito Baixa (VLDL, sigla do inglês *very low density lipoprotein*), de origem hepática; e (ii) as ricas em colesterol, incluindo as LDL e as de Alta Densidade (HDL, do inglês *high density lipoprotein*). Existe ainda uma classe de Lipoproteínas de Densidade Intermediária (IDL, do inglês *intermediary density lipoprotein*) e a Lipoproteína (a) – Lp(a) e sua função fisiológica não é conhecida, mas, em estudos mecanísticos e observacionais, ela tem sido associada à formação e à progressão da placa aterosclerótica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017).

Quadro 1: Características físico-químicas das principais classes de lipoproteínas

Lipoproteína	Densidade	Massa Mol.	Diâmetro	Lipídios		
	g/dl	Kda	Nm	TAG	Col	PL
Quilomícrons	0,95	400×10^3	75 a 1200	80 a 95	2 a 7	3 a 9
VLDL	0,95 a 1,006	$10 \text{ a } 80 \times 10^3$	30 a 80	55 a 80	5 a 15	10 a 20
IDL	1,006 a 1,019	$5 \text{ a } 10 \times 10^3$	25 a 35	20 a 50	20 a 40	15 a 25
LDL	1,019 a 1,063	$2,3 \times 10^3$	18 a 25	5 a 15	40 a 50	20 a 25
HDL	1,063 a 1,210	$1,6 \text{ a } 3,6 \times 10^2$	5 a 12	5 a 10	15 a 25	20 a 30

Nota: TAG, triacilglicerol; Col, soma de colesterol livre e esterificado; PL, fosfolipídeos. A composição remanescente percentual é constituída pelas apoproteínas. Fonte: GINSBERG E GOLDBERG (1998).

No metabolismo das lipoproteínas, na via intestinal, as lípases pancreáticas hidrolisam os TG em ácidos graxos, monoglicerídeos e diglicerídeos. Sais biliares liberados na luz intestinal emulsificam estes e outros lípides oriundos da dieta e da circulação entero-hepática, com formação de micelas que se movimentam através da borda em escova das células intestinais. A proteína Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1-L1), parte de um transportador de colesterol intestinal, situada na membrana apical do enterócito, promove a passagem do colesterol através da borda em escova desta célula, facilitando a absorção intestinal do colesterol. A inibição da NPC1-L1, com consequente inibição seletiva da absorção intestinal do colesterol, é um importante alvo terapêutico no tratamento da hipercolesterolemia (ALTMANN et al., 2004).

Os ácidos graxos, após serem absorvidos pelas células intestinais, são utilizados na produção de quilomícrons, que contêm ApoB48, o componente amino-terminal da ApoB100. Os quilomícrons são, em seguida, secretados pelas células intestinais para o interior do sistema linfático, seguindo para circulação. A enzima Lipase Lipoproteica (LPL), hidrolisa os quilomícrons, liberando ácidos graxos e glicerol do core, e de colesterol não esterificado da superfície destas partículas. Após esta lipólise, os ácidos graxos são capturados por células musculares e adipócitos – estes últimos importantes reservatórios de TG elaborados a partir de ácidos graxos. Remanescentes de quilomícrons e ácidos graxos também são capturados pelo fígado, onde são utilizados na formação de VLDL (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017).

Já no metabolismo hepático das lipoproteínas, o transporte dos lipídios originados do fígado, ocorre por meio das VLDL, IDL e LDL. As VLDL são lipoproteínas ricas em TG e contêm a ApoB100 como sua Apo principal. Montadas e secretadas pelo fígado, as VLDL

requerem a ação de uma proteína intracelular, a chamada proteína de transferência de TG microsomal (MTP, do inglês microsomal triglyceride transfer protein), responsável pela transferência dos TG para a ApoB, permitindo a formação da VLDL. A montagem hepática da VLDL também tem sido reconhecida como foco terapêutico no tratamento da hipercolesterolemia, seja pela inibição da síntese de Apolipoproteína B 100 (ApoB), ou pela inibição da MTP (STEINBERG E WITZTUM, 2009).

Já na circulação, uma parte das VLDL dá origem às IDL, que são removidas rapidamente do plasma. O processo de catabolismo continua e inclui a ação da lipase hepática, resultando na formação das LDL que são compostas principalmente de colesterol e a ApoB100. As LDL são capturadas por células hepáticas ou periféricas pelos LDLR. No interior das células, o colesterol livre pode ser esterificado para depósito por ação da enzima Acil-CoA:Coesterol Aciltransferase (ACAT). A expressão dos LDLR nos hepatócitos é a principal responsável pelo nível de colesterol no sangue e depende da atividade da enzima Hidroximetilglutaril Coenzima A (HMGCoA) redutase, enzima-chave para a síntese intracelular do colesterol hepático. A inibição da HMG-CoA redutase e, portanto, da síntese intracelular do colesterol é um importante alvo terapêutico no tratamento da hipercolesterolemia. Recentemente, a identificação e a caracterização da Pró-proteína Convertase Subtilisina/Kexina Tipo 9 (PCSK9) introduziram novos conhecimentos ao metabolismo do colesterol. A PCSK9 é uma protease expressa predominantemente pelo fígado, intestino e rins, capaz de inibir a reciclagem do LDLR de volta à superfície celular, resultando em menor número de receptores e aumento dos níveis plasmáticos de LDL. A inibição da PCSK9, outro potencial foco na terapêutica da hipercolesterolemia, bloqueia a degradação do LDLR, com maior capacidade de clearance da LDL circulante (STEINBERG E WITZTUM, 2009).

As partículas de HDL são formadas no fígado, no intestino e na circulação. Seu principal conteúdo protéico é representado pelas apolipoproteínas AI e AII. O colesterol livre da HDL, recebido das membranas celulares, é esterificado por ação da Lecitina Coesterol Aciltransferase (LCAT). A ApoA-I, principal proteína da HDL, é cofator desta enzima. O processo de esterificação do colesterol, que ocorre principalmente nas HDL, é fundamental para sua estabilização e seu transporte no plasma, no centro desta partícula. A HDL transporta o colesterol até o fígado, no qual ela é captada pelos receptores SR-B1. O circuito de transporte do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado é denominado transporte reverso do colesterol. Neste transporte, é importante a ação do complexo ATP-Binding Cassette A1

(ABC-A1) que facilita a extração do colesterol da célula pela HDL. A HDL também tem outras ações que contribuem para a proteção do leito vascular contra a aterogênese, como a remoção de lípidos oxidados da LDL, a inibição da fixação de moléculas de adesão e monócitos ao endotélio, e a estimulação da liberação de óxido nítrico. Além das diferenças em tamanho, densidade e composição química, as lipoproteínas podem diferir entre si em relação à modificação in vivo por oxidação, glicação ou dessialização. Estas modificações influenciam em seu papel no metabolismo lipídico e no processo aterogênico. Os ciclos exógeno e endógeno, e o transporte reverso de colesterol são apresentados na figura 2 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017).

Figura 2: Ciclos de transporte de lípides no plasma.

Nota: As lipoproteínas participam de três ciclos básicos de transporte de lípides no plasma: (1) ciclo exógeno, no qual as gorduras são absorvidas no intestino e chegam ao plasma, sob a forma de quilomícrons, e, após degradação pela lipase lipoproteica (LPL), ao fígado ou a tecidos periféricos; (2) ciclo endógeno, em que as gorduras do fígado se direcionam aos tecidos periféricos; a lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) é secretada pelo fígado e, por ação da LPL, transforma-se em lipoproteína de densidade intermediária e, posteriormente, em LDL, a qual carrega os lípidos, principalmente o colesterol, para os tecidos periféricos; (3) transporte reverso do colesterol, em que as gorduras, principalmente o colesterol dos tecidos, retorna para o fígado; as HDL nascentes captam colesterol não esterificado dos tecidos periféricos pela ação da lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), formando as HDL maduras; por meio da CETP, ocorre também a transferência de ésteres de colesterol da HDL para outras lipoproteínas, como as VLDL. AGL: ácidos graxos livres; HPL: lipase hepática. (Fonte: (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017).

O colesterol é principalmente sintetizado nos hepatócitos. Este órgão desempenha papel central na manutenção da homeostase de lipídeos no organismo. A biossíntese é complexa (figura 3), e a sua regulação nos mamíferos é mediada pela concentração intracelular que por sua vez é dependente do equilíbrio entre a síntese e absorção deste lipídeo contido no sangue, além de, sua excreção, especialmente pelas vias biliares. A principal etapa de regulação da síntese de colesterol é a conversão de 3- hidroxil-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) em mevalonato, catalisada pela enzima HMG-CoA-redutase (GUPTA; SEXTON; RUDNEY, 1990).

Figura 3- Biossíntese do colesterol a partir da acetil coenzima A.

Fonte: CAMPO E CARVALHO, 2007.

A molécula de colesterol possui 27 carbonos, provenientes de acetil-CoA (produzida a partir de glicose ou aminoácidos), sendo este o mesmo precursor também dos ácidos graxos. O início da formação dessa molécula é dado com a união de dois acetil-CoA, pela enzima citossólica tiolase, formando o acetoacetil-CoA. Um terceiro acetil-CoA é condensado, catalisado pela enzima HMG-CoA sintase (também citossólica), formando o composto de seis átomos de carbono, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Até então, essas duas reações são reversíveis e não comprometem a célula em finalizar a síntese. A próxima reação, entretanto, é irreversível, e compreende na redução da molécula de HMG-CoA a mevalonato por dois NADPH. Tal redução é catalisada pela enzima HMG-CoA redutase, uma proteína integral de membrana do retículo endoplasmático liso e o principal ponto de regulação da síntese de colesterol (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002). O mevalonato então passa por três fosforilações à custa de três moléculas de ATP e perde um grupo carboxila e um fosfato, resultando em uma unidade isoprenóide (semelhante ao isopreno), com cinco carbonos. Seis dessas moléculas isoprenóides são condensadas, formando o esqualeno, um composto linear de trinta carbonos que passará por ciclização, formando o lanosterol, este já apresenta quatro anéis característicos do núcleo esteróide. Após diversas reações, que incluem perda e migração de grupos metila, o colesterol é formado (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

Com exceção dos hepatócitos, tecidos esteroidogênicos e intestino, os demais tecidos não são capazes de metabolizar e exportar colesterol em quantidade significativa. Por isso, existe um fino mecanismo de regulação da concentração intracelular de colesterol. O aumento do conteúdo de colesterol na célula leva à diminuição da atividade da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) redutase, que tem papel-chave na síntese de colesterol, além da redução da expressão dos receptores de LDL e aumento da atividade da enzima acilcolesterol aciltransferase (ACAT), a fim de estocar colesterol na forma esterificada, uma vez que o excesso de colesterol livre é tóxico para a célula (LEANÇA et al., 2010).

A homeostase do colesterol celular está sob o controle da sua síntese endógena, secreção e das atividades do receptor de lipoproteína que enriquecem a célula. Receptores de lipoproteínas desempenham um papel importante no metabolismo da lipoproteína e na homeostase do colesterol celular. As LDL (Lipoproteínas de Baixa Densidade) são as principais portadoras de éster de colesterol em humanos. Entre 60 e 70% do LDL circulante é removido da circulação por endocitose mediada por LDLR (Receptor de LDL) no fígado, na qual a LDL é internalizada e entregue aos lisossomos para degradação. A redução na atividade do LDLR resulta em elevações no colesterol da lipoproteína de baixa densidade

(LDL-c) plasmático e deposição de colesterol nos tecidos do corpo. A importância crítica da via do LDLR na prevenção do acúmulo de LDL é ilustrada pelos níveis plasmáticos muito altos de LDL e aterosclerose prematura grave que caracterizam formas autossômicas dominantes conhecidas de hipercolesterolemia grave, HF (hipercolesterolemia familiar) e FDB (apolipoproteína familiar com defeito) (RUDENKO; DEISENHOFER, 2003).

1.3 Fisiopatologia da Hipercolesterolemia Familiar

A Hipercolesterolemia Familiar (OMIM 143890) é uma das doenças hereditárias, autossômicas dominantes mais comuns, transmite-se verticalmente dos pais a 50% dos filhos, e é caracterizada por níveis elevados de LDL-c nos indivíduos desde a vida fetal e/ou nascimento, e durante toda a vida adulta se não se realizarem terapêuticas eficazes (WIEGMAN et al., 2015). Essa desordem genética do metabolismo das lipoproteínas se associa a uma elevada concentração no sangue de LDL-c e com a presença de sinais característicos como xantomas tendinosos, xantelasmas e risco elevado de doença cardiovascular aterosclerótica (DCVA) prematura (SANTOS et al., 2012). Xantomas são lesões cutâneas decorrentes do acúmulo de derivados do colesterol na pele, típico de alterações no metabolismo lipídico. Xantelasma (figura 4) é um tipo de xantoma comumente visualizado nas pálpebras, próximo ao nariz, já o xantoma tendíneo (figuras 5), caracteriza-se por deposição de lipídios sobre os tendões abaixo do tecido cutâneo e é a forma mais indicativa da HF. (FALUDI e BERTOLAMI, 1998).

Figura 4: Xantelasmas extensos nas quatro pálpebras

Fonte: PEREIRA et al, 2008

Figura 5: Xantoma no tendão de Aquiles e Xantoma tendinoso (A) em região dorsal da mão e xantomas planares intertriginosos (B)

Fonte: PEREIRA, 2012

Indivíduos com HF, mesmo sem possuir outros fatores de risco para a doença arterial coronariana (DAC), apresentam processo aterogênico muito acelerado, com mortalidade precoce (MACEDO, 2006). A doença deve-se à redução na capacidade dos receptores LDL hepáticos de remover as partículas LDL-c do plasma e, consequente a sua acumulação patológica e precoce (GASPAR, 2015).

Anormalidades genéticas que levam a níveis anormais de lipídios no sangue são encontradas principalmente em genes envolvidos no transporte e absorção celular de lipídios. Os indivíduos que apresentam essas mutações muitas vezes têm níveis anormais de lipídios no sangue, o que resulta em início precoce da doença cardiovascular (KWITEROVICH et al., 2011).

A HF é herdada de maneira autossômica dominante com uma penetrância próxima aos 100%. Isso significa que metade dos descendentes em primeiro grau de um indivíduo afetado terão o defeito genético e, assim, apresentarão níveis elevados de LDL-c desde o nascimento. Na maioria dos casos, essa enfermidade surge como consequência de mutações em algum dos genes que determinam a estrutura e a função do receptor da LDL (LDLR) (GOLDSTEIN e HOBBS, 2001). Os defeitos genéticos mais comuns são a ausência e/ou diminuição dos receptores específicos de LDL-c, por defeito familiar da apolipoproteína B ou por defeitos na pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) (VARRET et al., 2007).

Segundo (SANTOS et al., 2012) o fenótipo clínico de HF é geralmente decorrente de defeitos no gene que codifica o LDLR, 13 (OMIM# 143890); pode também ser secundário a defeitos no gene APOB, que codifica a apolipoproteína B100 (Apo B-100) (OMIM# 144010), onde a Apo B-100 defeituosa possui menor afinidade pelo LDLR; ou ainda, quando existe catabolismo acelerado do LDLR, devido a mutações com ganho de função no gene pró-

proteína convertase subtilisina/ kexina tipo 9 (PCSK-9), que codifica a proteína NARC-1 (OMIM# 603776), que participa do catabolismo do LDLR.

Em pacientes heterozigotos, um gene defeituoso para o receptor de LDL é herdado de um dos pais e um gene normal, do outro. Como dois genes funcionais são necessários para manter o nível plasmático normal de LDL-c, a ausência de um gene funcional causa um aumento no nível de LDL para aproximadamente duas vezes o normal já na infância (SANTOS et al., 2012).

Localizado na superfície das células hepáticas e de outros órgãos, o receptor se liga ao LDL e facilita sua captação, realizada por endocitose mediada pelo próprio receptor. A LDL é degradada nos lisossomos e o colesterol é liberado na célula para uso metabólico (figura 6a). Quando os receptores de LDL são defeituosos, o nível de remoção de LDL do plasma diminui, e o nível plasmático de LDL aumenta em proporção inversa ao número de receptores funcionais presentes. A hipercolesterolemia devido à mutação no gene *APOB* é referida como Familiar Defective apo B ou defeito familiar da apo B (FDB). Outra etiologia para o fenótipo HF é hipercolesterolemia autossômica dominante atribuível ao aumento da atividade de *PCSK9*, que codifica a proteína NARC-14, por sua vez esta participa do catabolismo do LDLR, onde mutações com ganho de função levam a maior degradação do receptor de LDL (figura 6b) (GO; MANI, 2012).

Figura 6: a-Síntese e reciclagem do LDLR; b - síntese, secreção de PCSK9 e efeito no LDLR (o PCSK9 liga-se ao LDLR e, por internalização, direciona o LDLR para a degradação dos lisossomos, diminuindo o número de LDLRs na superfície celular

Fonte: (FARNIER, 2014).

Assim descrita, a hipercolesterolemia familiar é um defeito de remoção das LDL da circulação. Como as partículas da LDL circulam por mais tempo nos pacientes com hipercolesterolemia familiar, estão mais sujeitas a oxidação e outras transformações químicas. Isso resulta na captação aumentada da LDL modificada pelos macrófagos, deflagrando mecanismos pró-aterogênicos (SANTOS et al., 2012).

1.4 Perfil Lipídico da Hipercolesterolemia familiar

O perfil lipídico é avaliado laboratorialmente por meio de determinações séricas e está intimamente relacionado com o metabolismo das lipoproteínas, as quais são estruturas complexas compostas de colesterol, fosfolípidos e triglicérides associados à apolipoproteínas (GUEDES et al., 2016).

Os critérios de determinação de diagnósticos têm sido propostos na tentativa de uniformizar e formalizar o diagnóstico de HF, como por exemplo, os da Dutch Lipid Clinic Network (Dutch MEDPED), tabela 1.

Tabela 1 - Critérios de diagnóstico de HF, com base no lipidograma.

Nível de LDL-c (mg/dL)	Pontuação
≥ 330 mg/dL	8
250 - 329 mg/dL	5
190 - 249 mg/dL	3
155 - 189 mg/dL	1
Diagnóstico de HF:	
certeza se	> 8 pontos
provável se	6 - 8 pontos
possível se	3 - 5 pontos

Fonte: PEREIRA, 2012

1.5 Função e mecanismos de ação da enzima PCSK9 e seu gene

Fatores ambientais e genéticos regulam as concentrações plasmáticas de LDL-c. Entre as causas genéticas, a hipercolesterolemia autossômica dominante (HAD) está associada a concentrações elevadas de LDL-c e doença cardiovascular prematura. Na maioria dos casos, a hipercolesterolemia familiar (HF) está relacionada a mutações no próprio LDLR. Uma segunda e menos frequente forma de HF é causada por mutações no domínio de ligação ao ligando de apolipoproteína (apo) B100, o componente protéico de LDL que interage com o LDLR. A identificação de um terceiro gene associado com HF, pró-convertease subtilisina de codificação / Kexin Tipo 9 (PCSK9), tem gerado uma pesquisa intensiva em PCSK9, fazendo com que essa proteína de um regulador chave para a atividade do LDLR seja um alvo atraente para o tratamento de hipercolesterolemia (FARNIER, 2014).

A estrutura da PCSK9 compreende uma seqüência sinal, um pró-domínio, um domínio catalítico e uma porção carboxiterminal contendo resíduos de cisteína (figura 7). É sintetizada como um precursor inativo, que sofre clivagem por autocatálise entre o pró-domínio e o domínio catalítico, sendo que o pró-domínio permanece ligado à proteína em sua forma madura, e trafega na célula entre seus compartimentos acoplado à proteína, provavelmente regulando sua atividade enzimática. Nesse trânsito, a PCSK9 interfere no ciclo biológico do receptor de LDL, favorecendo a sua degradação (HORTON, 2006).

Figura 7: Representação esquemática do gene e proteína do PCSK9

Fonte: Alves, 2014

A proproteína convertase subtilisina kexina tipo 9 (PCSK9) é um ligante circulatório que termina o ciclo de vida do receptor de lipoproteína de baixa densidade, afetando assim os níveis plasmáticos de LDL-c. Evidências recentes mostram que, além do mecanismo de ação direto, há interações mais complexas entre os níveis de PCSK9, LDLR e lipoproteína plasmática, incluindo: (a) a presença de regulação paralela e recíproca de LDLR de superfície e PCSK9 plasmática; (b) uma correlação entre PCSK9 e os níveis de LDL-c dependentes não só sobre o fato de PCSK9 remover o LDL hepático, mas também devido ao fato de que até 40% da PCSK9 plasmática está fisicamente associada à LDL; e (c) uma associação entre a produção de PCSK9 no plasma e a montagem e secreção de lipoproteínas ricas em triglicerídeos (TAVORI; RASHID; FAZIO, 2015).

A PCSK9 é uma enzima que, nos seres humanos, é codificada pelo gene PCSK9 com ortólogos encontrados em praticamente todas as espécies. Esse gene codifica uma pró-proteína convertase pertencente à subfamília proteinase K da família subtilase secretora. A proteína codificada é sintetizada como um zimogênio solúvel, que sofre processamento autocatalítico intramolecular no retículo endoplasmático. Essa proteína tem um papel fundamental na regulação da homeostase do colesterol. A PCSK9 liga-se ao fator de crescimento epidérmico de repetição do domínio A (EGF-A), do receptor de lipoproteína de baixa densidade, induzindo a degradação desse receptor. Esses níveis reduzidos de LDLR resultam em diminuição do metabolismo das lipoproteínas de baixa densidade, o que poderia levar a hipercolesterolemia (LEITÃO, 2012).

O gene humano PCSK9 está localizado no cromossomo 1p32.3 que codifica uma glicoproteína inativa de 692 aminoácidos. A PCSK9 é expressa em vários órgãos, particularmente no fígado, intestino e rim. O ácido 692-amino PCSK9 sofre clivagem de peptidase de sinal (domínio 1-30), seguida de clivagem autocatalítica no retículo endoplasmático em dois produtos: o pró-domínio e a PCSK9 madura contendo o domínio catalítico e o domínio C-terminal. A clivagem do pró-domínio é necessária para a maturação e secreção de PCSK9. Uma mutação de perda de função devido a uma substituição de aminoácido com a clivagem autocatalítica, impede o processamento e, por inibição da secreção de PCSK9, estando associada com a redução de 48% na concentração de LDL-c (FARNIER, 2014). A principal via de eliminação do LDL-C circulante do sangue é por meio da endocitose dos hepatócitos - um processo mediado pela ligação do LDL-c aos LDLRs na membrana celular do hepatócito (figura 8). O típico LDLR é capaz de recircular de volta para a superfície da célula até 150 vezes, com o PCSK9 desempenhando um papel crítico no

metabolismo do LDL-R. A subunidade catalítica de PCSK9 liga-se ao domínio semelhante ao fator de crescimento epidérmico do LDLR e, em seguida, acompanha o receptor até sua degradação dentro do lisossoma. Dado o papel contrarregulatório desempenhado pela PCSK9, as mutações de ganho de função na PCSK9, resultando em sua superexpressão, levam a um menor número de LDLR em funcionamento e níveis mais altos de LDL-c circulante. Por outro lado, mutações de perda de função no PCSK9 resultam em níveis mais baixos de LDL-c. PCSK9 pode ligar outras proteínas; parece desempenhar papéis adicionais e menores no metabolismo lipídico; e sua expressão pode ser modificada por vários fatores (por exemplo, as estatinas aumentam os níveis de PCSK9) - outros detalhes podem ser encontrados em outros lugares (ARTENSTEIN; OPAL, 2011).

Na figura abaixo (figura 8), a SREBP-2 em hepatócitos regula a transcrição de vários lipídios e proteínas, incluindo o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR) e a subtilisina de convertase de proproteína / kexina tipo 9 (PCSK9) (etapa 1). A PCSK9 é processada no retículo endoplasmático em uma forma madura (etapa 2) e é embalada pelo aparelho de Golgi (assim como o LDLR) antes de ser secretada (etapa 3). O LDLR liga-se ao colesterol da lipoproteína de baixa densidade circulante (LDL-c) (passo 4), e o par é internalizado nos endossomos, onde o LDL-c pode ser transportado para outro uso. Enquanto isso, o LDLR recircula para a superfície da célula (passo 5) até 150 vezes, removendo o LDL-c adicional da circulação. A PCSK9 regula o número de LDLR pela ligação e internalização do LDLR (passo 6), acompanhando-o até à sua destruição no lisossoma (passo 7). Isso não permite que o LDLR recircule. Vários métodos para interferir com a função da PCSK9 são mostrados pelas letras dentro dos octógonos vermelhos. Pequenos ácidos ribonucleicos interferentes (siRNAs) (A) podem bloquear a transcrição do ácido ribonucleico mensageiro PCSK9, enquanto inibidores moleculares pequenos (B) podem interromper o processamento do PCSK9 - ambas as abordagens reduzem a produção do PCSK9 funcional. Duas abordagens extracelulares para inibir a função de PCSK9 incluem anticorpos monoclonais (MoAbs) (C) e adnectinas (D) que impedem a ligação de PCSK9 ao LDL-R. SREBP = fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de ligação ao esterol (GIUGLIANO; SABATINE, 2015).

Figura 8: Papel do PCSK9 na Regulação do Metabolismo do LDL-R

Nota: SREBP-2= *Sterol-regulatory element-binding protein* (proteína reguladora do elemento de esterol). Fonte: GIUGLIANO E SABATINE, 2015

1.6 Drogas hipolipemiantes usuais e a terapia com anticorpos monoclonais (mAb).

As estatinas são os fármacos mais usados para tratamento das hiperlipidemias em prevenção primária e secundária, com o propósito de diminuir os níveis de lipoproteínas plasmáticas ricas em colesterol e reduzir os riscos de DAC. Estes efeitos são resultantes da atividade inibidora das estatinas sobre a enzima HMG-CoA redutase (hidroximetilglutaril-CoA redutase), com a propriedade de bloquear a conversão do substrato HMG-CoA em ácido mevalônico, inibindo os primeiros passos da biossíntese de colesterol. Estas substâncias, capazes de mimetizar o substrato natural, podem ser divididas em naturais e sintéticas e diferem fundamentalmente em termos de potência, perfil farmacocinético, interação farmacológica e efeito indesejado relacionado à miotoxicidade (CAMPO; CARVALHO, 2007).

Destaca-se que a utilização de estatinas vem se tornando mandatória em pacientes com elevado risco para o desenvolvimento de aterosclerose (SIQUEIRA et. al., 2007). Com frequência, torna-se necessário usar combinações de fármacos diante de níveis elevados de LDL-c e de triglicerídeos. A terapia combinada também é útil quando a monoterapia, em especial à base de estatinas, falha em promover os níveis-alvo desejados de lipídios e

lipoproteínas, sobretudo de LDL-c. Entre as combinações comumente usadas estão: estatinas + fibratos (embora pouco se saiba sobre os benefícios aditivos destes fármacos em termos de redução dos eventos clínicos) e estatinas + niacina. As estatinas e os sequestradores de ácido biliar também são úteis como combinações, e o uso dos novos inibidores da absorção de colesterol com outras classes de fármacos, em particular as estatinas, provavelmente sejam significativas. Em alguns casos, a terapia tripla (p. ex., estatina + niacina + agente de ação intestinal) torna-se necessária. A terapia farmacológica é feita com estatinas de alta potência, como Atorvastatina (10-80mg) e Rosuvastatina (10-40 mg), visando obter redução maior que 50% do nível basal.(SANTOS, et.al., 2012). Em pacientes intolerantes a estatina, poderá ser feita terapia com outros hipolipemiantes, como ezetimiba, niacina ou colestiramina; as quais também poderão ser combinadas entre si, em pacientes mau respondedores a terapia isolada com estatinas (GENEST, 2013).

A terapia medicamentosa deverá ser prescrita individualmente e ser mantida em longo prazo, com seguimento médico regular, com avaliação de enzimas hepáticas (TGO/TGP) e musculares como a creatinofosfoquinase (CPK) (XAVIER et al., 2013).

As alterações de hipercolesterolemia podem gerar patologias como o infarto agudo do miocárdio (IAM). No entanto, nem sempre o aumento do colesterol é ocasionado apenas pela má alimentação e pelo estilo de vida; grupos como o da hipercolesterolemia familiar (HF) têm valores séricos aumentados por alterações genéticas e, nesses casos, as medicações hipolipemiantes tradicionais não são eficazes (HENRIQUE et al., 2017). Em um cenário em que fármacos atuais atingiram seu limiar de tratamento, a comunidade científica vislumbra uma nova classe de medicamentos atuantes contra a pró-proteína convertase subtilisina/quexina tipo 9 (PCSK9): os anticorpos monoclonais, como o evolocumab (AMG 145) (CHRISTIAN; GABRIEL, 2016).

Os MAbs podem ser divididos em: murinos (sufixo: -omab): são 0% humanos, com alto potencial imunogênico; quimérico (-ximab): 66% de potencial imunogênico intermediário humano; humanizado (-zumab): 90% humano, baixo potencial imunogênico e humanos (-umab): 100% humano, muito baixo potencial imunogênico (HANSEL et al., 2010).

Figura 9: Esquema do componente murino e humano, segundo o tipo de anticorpo monoclonal

Fonte: CHRISTIAN E GABRIEL, 2016

O primeiro anticorpo monoclonal aprovado para uso em humanos foi o muromonab, um anticorpo anti-CD3 IgG2a de camundongo, para profilaxia ou tratamento de alotransplantes (SGRO, 1995). No entanto as diferenças entre o sistema imunológico humano e do camundongo, fizeram com que os pacientes tratados com sequências completas de anticorpos de camundongo desenvolvessem anticorpos anti-camundongos humanos, provocando uma rápida eliminação dos anticorpos, hipersensibilidade, baixa capacidade de penetração no local alvo e redução da eficácia (NEWSOME E ERNSTOFF, 2008; SGRO, 1995).

Para reduzir estes efeitos, através da tecnologia do DNA recombinante, produziram-se anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados (STERN E HERRMANN, 2005). Em 2002 a Food and Drug Administration (FDA) aprovou o primeiro anticorpo monoclonal totalmente humano e, a partir daí, foram aprovados mais anticorpos deste gênero (NELSON et al., 2010).

A imunogenicidade do MAb pode causar a geração de anticorpos neutralizantes pelo paciente, o que é conhecido como a resposta anti-anticorpo, que está associada a uma diminuição na eficácia e segurança do MAb, nos anticorpos murinos ocorre em 84% , enquanto em pacientes quiméricos em 40%, em pacientes humanizados em 9% dos pacientes (figura 10) (KEIZER ET AL., 2010).

Figura 10: Evolução dos anticorpos monoclonais e a sua relação com a capacidade de formação de uma resposta imune contra os anticorpos monoclonais usados em terapia

Fonte:CATAPANO; PAPADOPOULOS, 2013

Entre os principais avanços das MABs utilizadas na cardiologia, damos destaque aqui as drogas de uso na hipercolesterolemia, descrito a seguir:

Evolocumab (AMG 145), alirocumab e bococizumab : os dois primeiros são Mab humano e o último humanizado, dirigido contra pró-convertase subtilisina / Kexin tipo 9 (PCSK9), a proteína do receptor que medeia a degradação lisossomal - lipoproteína de baixa densidade (LDL) no hepatócito, em menor grau no intestino e no rim. A inibição da interação de PCSK9 com o receptor de LDL, diminui a degradação destes receptores, que reduz os níveis de LDL circulante, em que geralmente, estes anticorpos têm poucas reações adversas, tais com os sintomas da gripe mais comuns. Mais de trinta ensaios clínicos III para evolucumab e alirocumab encontram-se em fase III, buscando novas indicações para o uso com os resultados cardiovasculares em termos de regressão da placa aterosclerótica em uso concomitante com estatinas e eventos cardiovasculares (CHRISTIAN; GABRIEL, 2016).

Estes medicamentos podem ajudar especialmente os portadores de hipercolesterolemia familiar (HF), que abarca cerca de dez milhões de pessoas no mundo e entre 250 mil e 300 mil no Brasil, é composto por indivíduos que não conseguem diminuir seus níveis lipêmicos com as terapias atuais, o que acaba gerando lesões obstrutivas precoces e aumento do risco de morte relativo à doença coronária (PEREIRA, 2012).

Os anticorpos monoclonais vieram resolver, em grande parte, os efeitos destes fatores. O conceito usado na preparação de soros à base de anticorpos monoclonais é bastante simples, visto que em vez da colheita do soro que contém a mistura de todos os anticorpos sintetizados pelos linfócitos B, faz-se a colheita individual de cada linfócito B e respectivo produto. Uma vez que cada linfócito B sintetiza anticorpos que se ligam a um antígeno particular, é apenas necessário obter um clone da célula B de interesse e as suas sucessivas linhagens de células-filhas permitem efetuar a produção de grandes quantidades de anticorpos específicos para um antígeno, designados por anticorpos monoclonais (COELHO, 2014 ; BANDER, 1987).

Segundo Cohen et al. 2009, em trabalhos realizados com pessoas com decréscimo natural da expressão do gene PCSK9, comprovou-se a diminuição conjunta dos níveis séricos de colesterol de LDL, concluindo, por meio desta observação, que medicamentos que atuam diminuindo a expressão dessa enzima aumentam o número de LDLR e auxiliam a queda de níveis séricos de colesterol.

2. JUSTIFICATIVA

A caracterização funcional de mutações de genes associados à HF, 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 de doença cardiovascular prematura e, conseqüentemente, na redução do risco de morte nessa população. (SANTOS et al., 2012).

Assim, diante do elevado risco cardiovascular, diminuição da expectativa e qualidade de vida, dificuldades no tratamento e desconhecimento das variáveis genéticas dessa doença e sabendo-se da existência de potencial e efetivo tratamento para pacientes com HF, em especial com defeitos no gene PCSK9, nosso estudo visou investigar em pacientes com hipercolesterolemia, o defeito nesse gene, com as perspectivas de trazer um tratamento adequado a essa população, além de contribuir com novas descobertas com defeitos genéticos ainda não encontrados na literatura.

3. HIPÓTESE

Pacientes com diagnóstico de hipercolesterolemia familiar selecionados no HCFMRP possuem mutações patológicas no gene da PCSK9.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Identificar e caracterizar mutações patológicas no gene PCSK9 em pacientes com hipercolesterolemia familiar provenientes do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da FMRP/USP selecionados para o teste genético.

4.2 Objetivos Específicos

- Rastrear mutações no gene PCSK9 através da técnica de HRM (High Resolution Melting), seguido do sequenciamento dos casos com curva de melting anormal;
- Realizar estudo funcional para investigar a patogenicidade de mutações do gene da PCSK9
- Rastrear mutações patológicas na PCSK9 ainda não encontradas na literatura
- Identificar variáveis clínicas e bioquímica que poderiam contribuir para o aumento do risco de doença cardiovascular.
- Diagnosticar pacientes e familiares com hipercolesterolemia familiar clínica;

5. METODOLOGIA

5.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo observacional, transversal de coleta de dados primários, englobando toda a população com HF.

5.2 Casuística e critérios de inclusão e exclusão

Inicialmente, para encontrar os pacientes com possível diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, foi realizada uma triagem minuciosa de todos os lipidogramas feitos entre os meses de junho de 2014 a junho de 2015 no HCFMRP/USP, que correspondeu a 17.017 (dezessete mil e dezessete) pessoas que realizaram lipidograma naquele período. Baseado nos critérios da Dutch Lipid Clinic Network (Dutch MEDPED), (NCCPC,2008), seguindo o parâmetro níveis plasmáticos LDL colesterol (LDL-c), onde indica possível diagnóstico de HF, quando $LDL-c \geq 190\text{mg/dl}$ (destacado na tabela 2), todos os pacientes com valores iguais ou acima de 190mg/dl foram primariamente selecionados para investigação de prontuário, que correspondeu a 480 indivíduos pré-selecionados.

Tabela 2 – Critérios diagnósticos da HF

Parâmetro	Pontos
História Familiar	
Parente de 1º grau portador de doença vascular/ coronária prematura (homem < 55 anos, mulher < 60 anos) OU Parente adulto de 1º ou 2º grau com colesterol total > 290 mg/dL*	1
Parente de 1º grau portador de xantoma tendinoso e/ou arco corneano OU Parente de 1º grau <16 anos com colesterol total > 260 mg/dL*	2
História clínica	
Paciente portador de doença arterial coronária prematura (homem <	2

55 anos, mulher < 60 anos) Paciente portador de doença arterial cerebral ou periférica prematura (homem < 55 anos, mulher < 60 anos)	1
Exame físico	
Xantoma tendinoso	6
Arco corneano < 45 anos	4
Nível de LDL-c (mg/dL)	
≥ 330 mg/dL	8
250 - 329 mg/dL	5
190 - 249 mg/dL	3
155 - 189 mg/dL	1
Análise do DNA	
Presença de mutação funcional do gene do receptor de LDL, da apoB100 ou da PCSK9*	8
Diagnóstico de HF:	
certeza se	> 8 pontos
provável se	6 - 8 pontos
possível se	3 - 5 pontos

Baseado nos critérios da Dutch Lipid Clinic Network [Dutch MEDPED]. PEREIRA, 2012.

Após investigação dos prontuários de todos os 480 pacientes, houve exclusões por causas externas aqueles em tratamento para o câncer, com síndrome da imunodeficiência humana, insuficiência renal crônica ou aguda, disfunções metabólicas (diabetes não associado ao uso prolongado de estatinas, hipotireoidismo, etc), restando 218 pacientes com possível diagnóstico da doença.

Para participação da pesquisa, foi preciso selecionar apenas os que foram localizados por telefone ou carta, os que concordaram participar da pesquisa, e os que puderam vir ao hospital no período das coletas.

Desses duzentos e dezoito indivíduos, apenas 40 foram localizados ou puderam comparecer ao HCFMRP/USP para coleta de sangue no período e mais 10 pacientes foram inclusos na pesquisa por serem familiares de primeiro grau dos que foram selecionados, e que relataram ter o diagnóstico clínico de HF fazendo-se um rastreamento em cascata, sendo assim, foram selecionados no total cinquenta pacientes para pesquisa.

5.3 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto FMRP/USP, processo número 7778/2014. Todos os envolvidos assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido e os responsáveis pelos menores de 18 anos assinaram o termo de assentimento.

As amostras coletadas foram usadas somente para o projeto em questão.

O recrutamento dos voluntários do estudo foi realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto –HCFMRP/USP. Sendo que as etapas seguintes da investigação foram realizadas com cada participante da pesquisa, de forma individual, em uma sala disponível no HCFMRP/USP, sempre pelo mesmo pesquisador, com o intuito de diminuir ao máximo possível os vieses.

5.4 Critérios de identificação clínica para Hipercolesterolemia Familiar

Para identificação de hipercolesterolemia familiar foram utilizados os critérios da Tabela 2 (Dutch MEDPED).

5.5 Coleta e análise bioquímica

Todas as coletas de sangue foram realizadas no laboratório central do HCFMRP/USP, após jejum de pelo menos 12 horas. Os pacientes foram orientados a não ingerir bebidas alcoólicas e não realizar atividade física vigorosa nas 72 e 24 horas que antecederiam a coleta de sangue, respectivamente. De cada indivíduo foi coletado 10 ml de sangue periférico em tubo de ensaio contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante.

Para avaliação dos triglicerídeos, colesterol total e HDL-c, utilizou-se o método enzimático calorimétrico automatizado. Este método constitui a melhor opção por

apresentarem muito boa sensibilidade e especificidade, simplicidade operacional, baixo custo e possibilidade de automação em laboratórios clínicos.

Já para a determinação do LDL-c, utilizou-se a fórmula de Friedewald:

$\text{LDL-c} = \text{colesterol total} - (\text{HDL-c} + \text{triglicerídeos} / 5)$ onde TG/5 representa o colesterol ligado à VLDL ou VLDL-C. Fórmula válida para triglicerídeos < 400mg/dL, se maior que 400mg/dL, utilizaria o método calorimétrico-enzimático homogêneo.

5.6 Análise de mutações no gene PCSK9

5.6.1 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada no laboratório de medicina genômica do HCFMRP/USP, de forma automatizada no equipamento Maxwell Mdx, utilizando o kit da promega, código AS1010, obedecendo às instruções recomendadas pelo fabricante, usados para realizar o isolamento automatizado de DNA genômico de amostras de sangue total humano ou de *buffy coat*. Utilizando 2,5ml das amostras coletadas em tubos de coleta de sangue tratados com EDTA.

As amostras foram centrifugadas a $2.000 \times g$ durante 20 minutos utilizando 150µl de *buffy coat* e 300µl de buffer para eluir as amostras, resultando na separação do material em três camadas: uma camada inferior contendo principalmente glóbulos vermelhos, uma camada superior de plasma e uma fina camada branca na interface que é enriquecido para glóbulos brancos.

Após a eluição do DNA genômico dos leucócitos concentrado, a concentração do DNA purificado foi medida por absorbância a 260nm. A pureza do DNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose e medindo a razão A260 / A280, que é tipicamente > 1,7.

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%.

Após a extração de DNA, as amostras foram numeradas (para garantir o sigilo) e armazenadas no banco de amostras mantido pelo Laboratório de Genética Molecular e

Bioinformática do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRPUSP).

5.6.2 Reação da Cadeia da Polimerase (PCR)

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

Os DNAs foram diluídos e utilizados para as reações de PCR na concentração de 100ng/μL e armazenados na temperatura de -20°C. A reação de PCR foi utilizada para estabelecer as condições ideais requeridas para a técnica de HRM. Nesse caso, a temperatura de anelamento dos primers é o parâmetro mais importante na análise.

A reação em cadeia da polimerase (PCR - “polymerase chain reaction”) é uma técnica *in vitro* que permite a amplificação de seqüências específicas de ácido desoxirribonucleico (DNA - “deoxyribonucleic acid”) ou de ácido ribonucleico (RNA - “ribonucleic acid”), sendo este último realizado a partir da síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA - “complementary deoxyribonucleic acid”). A característica mais importante da PCR é a capacidade de amplificar exponencialmente cópias de DNA a partir de pouca quantidade de material (MESQUITA, 2001).

Para o gene PCSK9 foram utilizados 12 pares de primers capazes de amplificar os 12 éxons codificantes do gene. A seqüência dos primers foram a mesma descrita por Pisciotta et al., (2006). Esses primers foram desenhados com base na seqüência do gene disponível no banco de dados GenBank (número de acesso: NM_ 174936) e o tamanho máximo estabelecido dos fragmentos foi de 393 pb. No Anexo 3 pode-se ver as seqüências dos primers e o tamanho dos fragmentos gerados.

As amplificações foram realizadas com um volume total de 25 μL contendo 14,5 μL de água miliQ, 2,5 μL de Buffer (tampão) 10x, 2 μL de dNTP a 1,24 mM, 1,5 μL para cada primer (forward e reverse) a 2,5pmoles/ μL, 1,0 μL de Taq DNA Polimerase a 1U (Biotools, Madri, Espanha) e 2 μL de DNA.

Os parâmetros de amplificação foram: 94°C por 5 minutos, seguido por 94°C durante 1 minuto / TA durante 1 minuto / 72°C durante 1 min durante 35 ciclos e uma extensão final a 72°C durante 5 min, terminando com 4°C até o ∞ .

Sendo $TA = TM - 5^{\circ}C$

TA = Temperatura de anelamento

TM= Temperatura média

$TM = 2 (A+T) + 4 (C+G)$

5.6.3 High Resolution Melting (HRM)

Foi utilizado o método de fusão de alta resolução ou high resolution melting (HRM) para detecção de mutação como ferramenta de triagem rápida para pacientes com HF (KRYPUY E AHMED, 2007). “High Resolution Melting” (HRM) é uma técnica baseada na análise de dissociação do DNA, que permite detectar diferentes tipos de polimorfismos, como inserções, deleções e polimorfismo de uma única base (SNP), além de variações epigenéticas. Para sua realização é necessário o uso de equipamento de PCR em tempo real com a opção fast e corantes fluorescentes saturantes que permitem a detecção da variação de até um único nucleotídeo (CORBETT, 2018).

Este método foi escolhido para triagem de pacientes com hipercolesterolemia familiar, por oferecer benefícios significativos em tempo e custo, em comparação a outras técnicas de *scanning*, além de facilmente adaptado à rotina laboratorial (WHITTALL et al., 2010).

O método de High Resolution Melting vem sendo amplamente usado para triagem de mutações em substituição a outros métodos de triagem (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 tiveram padrão de melting diferente da curva normal foram sequenciadas para validar e caracterizar a mutação.

A técnica de HRM exige a utilização dos reagentes de uma PCR (polymerase chain reaction – reação em cadeia da polimerase) convencional com a adição de um corante que

emite fluorescência ao se intercalar na dupla fita de DNA (fluoróforo). Após a realização da PCR e da amplificação do fragmento específico, termociclando geralmente de trinta a quarenta ciclos, há o maior grau de fluorescência devido ao maior número de DNA de fita dupla. Assim, o aparelho de PCR com leitura em tempo real executa a análise de HRM propriamente dita, isto é, aumenta a temperatura no tubo de reação, gradativamente (aproximadamente de 70°-90°C), a fim de dissociar a dupla fita de DNA e gerar uma curva de decaimento da fluorescência. Assim, ocorre a diminuição da fluorescência (Figura 11), que é captada pelo leitor do aparelho, gerando padrões de curvas (curvas de *melting*) de acordo com os diferentes genótipos (CORBETT, 2006).

Figura 11- Atividade do agente fluorescente. A: saturação do corante na dupla fita de DNA. B: gradativo da temperatura. C: início da desnaturação e diminuição da fluorescência.

Fonte: Corbett, 2006

Nesse estudo, utilizamos 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 12 e 13).

Figura 12- Esquema ilustrando a temperatura ideal para detecção de variações na temperatura de melting causada por mutações

Fonte: (Cury, 2012).

Figura 13: Esquema ilustrando a temperatura de *melting* de uma sequência normal (controle) e outra com mutação.

Fonte: próprio autor

Para a realização das reações foi utilizado um volume total de 20µL contendo, 3,6 µL de água miliQ, 1,2 µL de cada primer a 5 µM, 10 µL de MeltDoctor HRM™ Master Mix (Applied Biosystems) e 4 µL de DNA a 4ng/ µL. Todas as reações foram realizadas em duplicata. Os parâmetros de amplificação foram: 95 °C por 10 segundos, 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 anelamento usando o Applied Biosystems® HRM *Software* v2.0. Amostras com curva 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.

5.6.4 Sequenciamento de DNA

Os produtos de amplificação por PCR foram submetidos ao sequenciamento capilar automático 3500 XL *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Na reação de sequenciamento foram usados: 0,5 a 0,2 µL de DNA amplificado (dependendo da quantidade do amplicon visualizado em gel de agarose 1,5%), 2 µL de Big Dye Terminator v3.1 Cycle 2 µL de 5X *Sequencing Buffer* (Applied Biosystems), 1 µL de primer e água em quantidade suficiente para completar o volume final de 10 µL. 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.

5.7 Questionário de hábitos de saúde.

Os hábitos de vida influenciam nas condições de saúde e estas podem influenciar diretamente no desencadeamento e agravamento de doenças genéticas.

Nesse sentido, a presente pesquisa procurou analisar a associação entre hábitos saudáveis, histórico pessoal e familiar por meio do questionário de hábitos de saúde de cada paciente.

5.8 Avaliação do estado nutricional

5.8.1 Questionário de Frequência de Consumo Alimentar (QFCA)

O questionário de frequência de consumo alimentar (QFCA) é o método mais utilizado para mensurar a dieta pregressa, pois tem a capacidade de classificar os indivíduos segundo seus padrões alimentares habituais, além de ser um instrumento de fácil aplicabilidade e baixo custo, o que viabiliza sua utilização em estudos populacionais (VIEBIG E VALERO, 2003). É composto por uma lista de alimentos e bebidas cuja frequência de consumo é perguntada ao indivíduo. Esse questionário pode se tornar mais sofisticado, fornecendo também uma estimativa quantitativa do consumo alimentar, incluindo-se informações sobre a porção diária consumida ou, por aproximação, comparando-a com uma porção alimentar de referência (HOLANDA E FILHO, 2006).

Nesse primeiro encontro foi realizado um inquérito alimentar, utilizando-se um questionário frequência de consumo alimentar (QFCA) já validado (apêndice 2), de hábitos alimentares, com baixo custo de aplicação, não invasivo que pôde fornecer diversas informações fundamentais sobre a alimentação, onde o indivíduo foi solicitado a responder com que frequência cada item da lista era consumido em número de vezes, por dia, por semana, por mês ou nunca, avaliando o consumo habitual de grupos específicos de alimentos (história dietética), onde este apresentava alimentos ricos em gordura saturada e colesterol e teve o objetivo de buscar alguma correlação com alguma doença crônicas não-transmissível.

Sabendo-se que a ingestão calórica excessiva, com elevado teor de gordura e colesterol, está associada a níveis séricos aumentados de colesterol total (CT) e fração de colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDLc), por meio da aplicação desta metodologia, foi possível determinar as características de consumo alimentar e estilo de vida que sugerem possíveis correlações com hipercolesterolemia e doenças crônicas, devendo ser

levado em conta os objetivos e características da população em estudo, dando uma visão aos pesquisadores do real consumo de alimentos fontes de colesterol.

5.8.2 Antropometria

Todas as medidas foram realizadas em um mesmo dia, na parte da manhã. Os indivíduos respeitaram um período de jejum de doze horas antes da tomada das medidas, tendo-se absterido de atividades físicas e de bebidas alcoólicas, respectivamente, nas 24 e 72 horas precedentes. Inicialmente foi realizada uma avaliação antropométrica dos indivíduos participantes, onde foi aferido o peso, estatura, e calculado o Índice de massa corpórea- IMC, classificação de adultos (WHO, 2000); adolescentes e crianças (FRISANCHO, 1990) e idosos (LIPSCHITZ, 1994), as circunferências da cintura de acordo com métodos padronizados (CUPARRI, 2005) para adulto e (TAYLOR, 2000) para crianças e adolescentes, aferidos com fita métrica inelástica, enquanto que o peso e a estatura, segundo Marchini et al. (1992). Para a aferição do peso e estatura, os voluntários estavam com a bexiga vazia, roupas leves, descalços e em jejum.

O cálculo da relação cintura-quadril obedeceu aos valores determinados como normais pela WHO (1997). A pesagem foi feita em balança eletrônica Filizola® (capacidade para 150Kg e com precisão de 0,1kg) e a estatura em estadiômetro fixo na parede (precisão de 0,5cm).

5.8.3 Avaliação da composição corporal por bioimpedância tetrapolar

A bioimpedância elétrica (BIA) é um método não invasivo e de fácil aplicação, utilizado tanto em indivíduos sadios quanto nos doentes, para determinar a composição corporal. Esse método baseia-se no princípio da condutividade elétrica para estimativa dos compartimentos corporais. Os tecidos magros são altamente condutores de corrente elétrica pela grande quantidade de água e eletrólitos; por outro lado, a gordura e o osso são condutores fracos de corrente elétrica (VITOLLO, 2008).

A impedância bioelétrica foi aplicada com aparelho marca Biodynamics, modelo 450, fornecendo valores de resistência e reactância, que foram utilizados para o cálculo de massa magra e gorda corporais com uso de fórmulas (KYLE et al., 2000; 2004). As medidas de bioimpedância foram executadas com o indivíduo deitado, em decúbito dorsal, em uma maca, sem portar relógio ou qualquer outro objeto metálico. Antes da colocação dos eletrodos na pele dos sujeitos, foi feita limpeza dos pontos de contato com algodão embebido em álcool. Os indivíduos ficavam repousando durante cinco minutos antes das tomadas de medida. O aparelho fornecia o percentual de gordura diretamente, através de equações já programadas pelos fabricantes nos próprios instrumentos.

5.9 Questionário socioeconômico

O questionário socioeconômico utilizado (apêndice 4) já validado (ABEP, 2014) investigou condições de renda, habitação, saúde e educação para visualizar o enquadramento familiar no qual o paciente estava inserido, dando uma visão mais ampliada aos pesquisadores sobre suas condicionalidades e classe social pertencente de acordo com o somatório dos pontos para cada resposta.

5.10 Análise Estatística

Foi realizada análise estatística descritiva dos dados. As variáveis quantitativas contínuas foram avaliadas por meio do cálculo da média e do desvio padrão, ao passo que as variáveis categóricas nominais foram descritas por meio do cálculo da frequência. O programa utilizado foi o IBM SPSS.

6. RESULTADOS

Para realização da análise genética foram selecionados minuciosamente 50 pacientes, seguindo o diagrama abaixo:

Os 50 pacientes estudados pertencem a 40 famílias distintas. A maioria com história pessoal de hipercolesterolemia (82%). Dos pacientes com história de hipercolesterolemia, 6 relataram ter sofrido algum evento cardiovascular pelo menos uma vez na vida (AVC, infarto, trombose). E todos relataram ter algum evento de doença cardiovascular na família.

O estudo foi composto por 26 homens e 24 mulheres. Desse total, 8 eram menores de 18 anos (8-17anos), 35 adultos (18-59 anos) e 7 idosos (60-72anos).

As mulheres apresentaram média de $37,8 \pm 18,8$ anos de idade e os homens apresentaram média de $37,8 \pm 16,8$ anos de idade. Quanto às características da amostra, foram assim distribuídas: 52% dos avaliados são do sexo masculino, 48% do sexo feminino.

6.1 Temperatura de anelamento por PCR em tempo real

As temperaturas de anelamento (TA) dos 12 pares de primers foram padronizadas pelo PCR em tempo real e podem ser visualizadas na tabela 3. Estas foram determinadas para serem analisada pelo HRM.

Tabela 3- Temperaturas de anelamento dos primers da PCSK9

Amplified Region	Forward Primer	Reverse Primer	TA
Exon 1	CTTCAGCTCCTGCACAGTC	TGAGGCCCCGAGAGGAAA	52°C
Exon 2	GGGTGAGATAAAGTACACCTAGG	CCCTATCAGGAAGTGCCATTCC	63°C
Exon 3	GGGACAGGTTTGATCAGGTAAG	AATGGATTTCAGCTCAGATGGG	59°C
Exon 4	CTTTATGCTCATTCCCTCCTCTC	CCACCCACCTCCAGGAT	57°C
Exon 5	CCAGCCACCTGCTGATTT	TTCTTGTTAGGAGACATTAGCTC	57°C
Exon 6	CCATCACTCTGTGCCTGTAAG	CCCACGTGCCACAAGAA	54°C
Exon 7	CTCTCTTGGGCTCCTTTCTCTGC	CGGCACAGACCCTGACT	62°C
Exon 8	GCCATCACCATCTTTCACCATTCA	AAGGGAGAGACTGTCAAGGTCACA	66°C
Exon 9	CTCCTCTCTCCTACCATGAATA	CTTACAGAAGAGCTGGAGTCTGGAG	67°C
Exon10	GTTGATCCTGTCTAGTCCCTTTC	TGAGTCTCATGGATCACACTTG	57°C
Exon 11	GAGACGGAGCATCCCAGCATTTC	CAGAAAAGCTGTGCAGGAGAGACA	66°C
Exon 12	GATGTCTGGAGGGAGAAATGAAG	GGGACAAGTCGGAACCATTT	62°C

6.2 Detecção de mutações por HRM

Utilizando-se a técnica de *High Resolution Melting* juntamente com PCR em tempo real e posterior sequenciamento, foram identificadas sete mutações, analisadas nos 600 exons dos 50 pacientes. Desses 50 pacientes, 14 apresentaram tais mutações, distribuídas segundo a tabela 4.

Mutações no éxon 7 foram detectadas na maior parte dos pacientes, seguido do éxon 9. O éxon 12 foi o único que apresentou 2 mutações, sendo todas benignas, caracterizadas como polimorfismos. Sendo assim, não caracterizando HF por defeitos no gene da PCSK9

Tabela 4: Mutações encontradas no gene PCSK9

Designação	Exon	Base trocada	Tripleto de nucleótidos	Aminoácido trocado	Pacientes acometidos	Tipo de mutação
p.Glu57Lys	1	G/A	GAG>AAG	Glu → Lys	1	Polimorfismo
p.Gly240Gly	5	C/T	GGC>GGT	Gly → Gly	1	Polimorfismo
p.Gln342Gln	7	A/G	CAA>CAG	Gln → Gln	8	Polimorfismo
p.Val474Ile	9	G/A	GTC>ATC	Val → Ile	4	Polimorfismo
p.Ala617Ala	11	A/C	CAC>CCC	Ala → Ala	1	Polimorfismo
p.His644His	12	C/T	CAC>CAT	His → His	1	Polimorfismo
p.Gly670Glu	12	A/A	GGG>GAG	Gly → Glu	1	Polimorfismo

No apêndice 1 encontram-se os resultados de todas essas mutações pelo método de HRM e sequenciamento.

6.3 Dados clínicos em percentual observados no questionário de saúde

Por meio da entrevista de saúde pudemos avaliar os dados clínicos que compreendem o estilo de vida e presença de doença coronária. Na tabela abaixo (Tabela 5) se pode ter a visão ampliada em percentuais.

Tabela 5 - Caracterização clínica observada no momento da entrevista.

Estilo de vida	
Exercício físico	58%
Hábitos tabágicos	6%
Hábitos etanólicos	42%
Outras doenças	
Hipertensão	24%
Diabetes	12%
Medidas terapêuticas	
Dieta	62%
Medicação	64%

Medicação: tomar estatinas e/ou ezetimiba e/ou resinas e/ou fibratos.

Aqui damos destaque ao grande percentual de pacientes que relataram fazer dieta para controle do colesterol, porém vai de encontro ao que foi observado no questionário de frequência alimentar, onde percebemos divergências nesses dois dados relatados no mesmo dia.

6.4 Considerações sobre o questionário de frequência alimentar

O questionário adaptado a nossa pesquisa priorizou alimentos ultra processados, fontes de gordura saturada e colesterol. O objetivo desse questionário foi proporcionar um dimensionamento sobre o consumo desses alimentos e o que pudemos perceber foi que todos os pacientes tinham o consumo habitual, dando destaque aos salames, salsichas e linguças em que 41 participantes relataram o consumo diário.

6.5 Classificação clínica por antropometria e bioimpedância

Na avaliação nutricional observamos os seguintes dados num total de 50 pacientes (N=50).

A classificação do estado nutricional de acordo com o índice de massa corporal e as recomendações da OMS (1998) e a circunferência da cintura estão nas figura 14a e 14b respectivamente. A amostra total foi classificada como acima do peso com predominância do quadro sobrepeso e obesidade associado a um aumento do risco de problemas cardiovasculares em decorrência da presença de circunferência da cintura acima dos valores recomendados.

Observamos na amostra total uma média de $27,73 \pm 6,81 \text{ Kg/m}^2$ para o IMC e de $94,35 \pm 17,35 \text{ cm}$ para circunferência abdominal.

Figura 14a: Classificação do estado nutricional segundo o índice de massa corporal

Figura 14b: Percentual de homens e mulheres com circunferência da cintura elevada.

Na análise da medida da circunferência da cintura, utilizamos para crianças e adolescentes como referência o protocolo de Taylor et al. (2000); para adultos usamos como referência NIH (2000).

Quando analisadas em termos gerais as variáveis antropométricas estão apresentadas na tabela a seguir (tabela 6).

Tabela 6 - Valores de mínimo, máximo, média e desvio padrão, para os valores de idade, peso, estatura, IMC, Circunferência da Cintura (CC) e Circunferência do Braço (CB) mensurados nos participantes.

Variável	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Idade	8	72	38,92	17,7187
Peso	34	133	76,90	21,527
Estatura	138	183	165,51	11,044
IMC	15	51	27,73	6,818
Circunferência da cintura	51	140	94,35	17,357
Circunferência do braço	16	45	32,67	6,032

O uso do IMC para avaliar o estado nutricional apresenta limitações incluindo a incapacidade de diferenciar os compartimentos da composição corporal (gordura, músculo e osso), sendo assim a porcentagem de gordura corporal dos indivíduos do estudo também foi analisada por meio da bioimpedância tetrapolar. A porcentagem média de gordura corporal encontrada na amostra total foi de $28,2 \pm 8,6$. Desses, 14 homens e 13 mulheres apresentavam-se acima da recomendação para gordura corporal. Portanto, o excesso de peso corporal avaliado pelo IMC foi confirmado por meio das altas porcentagens de pacientes com gordura corporal elevada.

Analisando a bioimpedância estratificado por mulheres e homens em termos gerais as variáveis da composição corporal estão apresentadas nas tabelas 7a e 7b a seguir:

Tabela 7a - Valores de mínimo, máximo, média e desvio padrão, gordura, massa muscular, taxa metabólica basal e água, mensurados na bioimpedância tetrapolar nas mulheres.

Variável	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Gordura (%)	16	58	32,74	8,71
Gordura (kg)	9	60	24,09	12,95
Massa Muscular (Kg)	27	61	46,22	8,67
Taxa Metabólica Basal	849,0	2100,0	1506,522	311,9331
Água (%)	69,60	80,80	72,41	2,43645

Tabela 7b - Valores de mínimo, máximo, média e desvio padrão, gordura, massa muscular, taxa metabólica basal e água, mensurados na bioimpedância tetrapolar nos homens.

Variável	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Gordura (%)	8	33	23,56	6,31
Gordura (kg)	3	90	22,28	8,67
Massa Muscular (Kg)	13	87	60,28	15,04
Taxa Metabólica Basal	896,0	2811,0	1948,280	426,0944
Água (%)	70,00	80,40	73,30	2,59840

6.4 Parâmetros bioquímicos do lipidograma

Partindo-se para uma análise mais detalhada da população estudada, iremos encontrar, disposto na tabela 8, as informações sobre os parâmetros bioquímicos do lipidograma dos participantes da pesquisa.

Tabela 8 - Valores de mínimo, máximo, média e desvio padrão, para os valores de Colesterol total, triglicérides, HDL-c, LDL-c, mensurados nos participantes.

Variável	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Colesterol total	134	464	235,49	61,918
Triglicérides	49	1978	201,12	353,731
HDL-c	26	65	43,96	9,248
LDL-c	65	382	166,56	58,483

É sabido que o sobrepeso e obesidade contribuem para o aumento de eventos cardiovasculares, somado ao elevado LDL-c, esse risco tende a se agravar. Em nossa amostra, foi observada após realização de lipidograma durante a pesquisa, um maior número de participantes com valores abaixo de 155 mg/dl, porém percebe-se que dos 23 nessa faixa, 21 faziam uso de medicamentos hipolipemiantes (tabela 9) o que portanto justificam os valores normais na maioria dos pacientes estudados.

Tabela 9 - Número de pacientes por faixa de valores de LDL e uso de estatinas.

Valores de LDL em mg/dl	≥330	250-329	190-249	155-189	≤155	Valores indeterminados	Total
Número de pacientes	2	3	12	8	23	2	50
Pacientes em uso de estatinas	-	2	5	4	21	0	32

De acordo com Marine, 2017, corroborando como outros estudos, as estatinas representam o grupo de fármacos de primeira escolha no tratamento da dislipidemia reduzindo os níveis de colesterol em aproximadamente 20% a 30%, e a frequência de eventos

cardiovasculares e a mortalidade em até 22%. A ação da sinvastatina se dá por inibição da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima redutase (HMG-CoA redutase) que é a enzima chave na síntese do colesterol, fato que leva à menor síntese de colesterol hepático, e ao aumento da expressão dos receptores da LDL-colesterol na superfície do fígado, consequentemente haverá menor síntese e remoção das VLDL-c e LDL-c pelo fígado, o que se explica o maior número de pacientes nessa faixa de LDL-c ($\leq 155\text{mg/dl}$), em uso de estatinas.

7. DISCUSSÃO

Por se tratar de uma mutação rara, não foi encontrada nenhuma mutação patogênica na pesquisa em questão, porém o que se esperava era encontrar mutações na PCSK9, uma vez que a descendência da população brasileira remete a portuguesa, onde mutações dessa característica encontram uma boa frequência em Portugal, com mutações descritas apenas nessa população, a exemplo da mutação patogênica de alteração p.Asp374His, descrita apenas na população portuguesa (Alves, 2014). Tal resultado corrobora com a dificuldade de se encontrar e determinar mutações em outros estudos tais como o estudo português de Hipercolesterolemia Familiar (EPHF), em que sendo a Hipercolesterolemia Familiar uma das doenças monogênicas mais bem estudada no mundo e apresentar critérios clínicos bem definidos (Marks et al. 2003), estudos realizados em diferentes cohorts indicam que 20-80% dos doentes com diagnóstico clínico de FH não apresentam mutações em nenhum destes genes, estando esta diferença associada aos diferentes critérios de diagnóstico e seus cut off aplicados nos diferentes grupos de trabalho. No EPHF, até ao ano de 2010, apenas 48% dos doentes com diagnóstico clínico de FH apresentavam uma mutação nos genes LDLR, APOB e PCSK9, pelo que a causa genética nos restantes doentes pode estar em mutações nestes genes mas situadas em regiões habitualmente não estudadas ou em alterações noutros genes do metabolismo lipídico. Além disso, é também possível que alguns destes doentes tenham uma dislipidemia poligênica e não monogênica, como referido recentemente por Talmud e colegas (Talmud et al. 2013).

Como observado na população estudada que os pacientes apresentavam dados clínicos de hipercolesterolemia familiar, aliado a maioria com níveis elevados de percentual de gordura corporal, sobrepeso e obesidade, além de consumo excessivo de alimentos ultra processados, percebemos que tal população encontra-se exposta a diversos fatores de riscos para DCV.

Dados da Organização Mundial da Saúde mostram que 31% das mortes registradas em todo o mundo em 2012 são decorrentes de DCV, apontam ainda que a prevalência de DCV no Brasil nas próximas décadas tende a aumentar, agravando mais as elevadas taxas de morbidade e mortalidade (WHO, 2015). O que torna tais dados ainda mais preocupantes são a adoção da sociedade moderna de hábitos alimentares pouco saudáveis e também a opção por uma vida sedentária, fatores que contribuem para uma epidemia crescente de doenças crônicas

tais como obesidade, diabetes mellitus, hipertensão arterial. Condições que cursam, na maioria dos pacientes, com alterações lipídicas (SBC, 2013).

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, que são conhecidos na literatura por apresentarem mais mutações, e sequenciá-los em seguida, caso apresentem alteração em algum fragmento. Importante a utilização de controles com perfil genético conhecido para auxílio nas análises das curvas de dissociação, pois um bom parâmetro pode auxiliar sobremaneira a interpretação do padrão de curva de pacientes homozigotos (ALVEZ, 2015).

Para triagem de mutações por meio de variáveis na HRM, foi utilizado 12 pares de primers para sequenciar os 12 éxons de até 379 bp, juntamente com o sequenciamento foram encontrados 7 mutações de caráter benigno.

O número de mutações descritas no gene da PCSK9 é baixo representando menos de 3%, porém com o desenvolvimento de novas drogas que atuam especialmente na PCSK9, diminuindo sua função, foi visto a importância de se conhecer o perfil genético da população de Ribeirão Preto e região, a fim de se encontrar mutações relacionadas a este gene e submeter tais pacientes a um tratamento mais seguro e eficaz.

As estatinas são a base para a redução do colesterol LDL, mas apesar da sua potência e eficácia no cenário do ensaio clínico, não conseguem impedir a maioria dos eventos cardiovasculares. Além disso, alguns pacientes são intolerantes às estatinas devido a efeitos colaterais. Portanto, há uma exigência de novos medicamentos que possam ser usados sozinhos, ou em combinação com terapias existentes.

A Hipercolesterolemia familiar (FH) é caracterizada por níveis elevados de LDL-c e doença cardiovascular aterosclerótica prematura. Pacientes portadores de mutações PCSK9 tendem a uma hipercolesterolemia mais grave do que os pacientes com mutações no LDLR e são difíceis de tratar com estatinas (Naoumova, 2005). Nos modelos de ratos, a inativação do PCSK9 foi associada com reduzido acúmulo de ésteres de colesterol na aorta, enquanto a superexpressão de PCSK9 aumentou a aterosclerose (DENIS et al., 2012)

Estudos cinéticos em humanos mostraram que as mutações PCSK9 com perda de função da PCSK9 aumentam a taxa catabólica do LDL (CARIOU et al., 2009). Estes achados sugerem

que a inibição da PCSK9 pode ser uma estratégia eficaz para reduzir o LDL-c no plasma e aumentar a capacidade de redução de LDL-c das estatinas.

Segundo Cohen et al.(2006) em trabalhos realizados em pessoas com decréscimo natural da expressão do gene PCSK9, comprovou-se a diminuição conjunta dos níveis séricos de LDL-c, concluindo, por meio desta observação, que medicamentos que atuam diminuindo a expressão dessa enzima aumentam o número de LDLR e auxiliam a queda de níveis séricos de colesterol.

Recentemente, os resultados de um ensaio em pacientes com hipercolesterolemia familiar heterozigótica comprovaram que o anticorpo monoclonal AMG145, aqui administrado na dose de 140 mg a cada duas semanas ou 420 mg mensalmente reduziu em 60% os níveis de LDL-c em relação aos testes com placebo. Ao mesmo tempo, portadores de hipercolesterolemia familiar homozigótica tratados com doses de 420 mg de AMG145, administradas a cada quatro semanas, tiveram redução significativa do LDL-c em relação aos testes com o placebo. Enfim, a administração subcutânea de AMG145 a cada duas semanas conduziu a uma redução significativa e sustentada dos níveis de LDL-c, que varia entre 41% a 66%, e AMG145 em combinação com estatinas em pacientes com ou sem FH reduziu entre 29% a 73% os níveis de LDL-c em relação aos valores de referência, sem relatos de eventos adversos graves relacionados com o tratamento (CUI et al., 2015).

Um dos pontos fortes desse trabalho, é que foi o pioneiro em nosso meio na investigação de mutações no gene PCSK9, sendo o Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da USP um centro de referência em pesquisa, isso pode servir como referencial de ponto de partida para novas investigações na Hipercolesterolemia Familiar.

Como limitações, tivemos a baixa adesão de pacientes que puderam comparecer ao estudo no período determinado. Como sugestão para uma nova pesquisa, podemos recrutar mais pacientes no dia da consulta de rotina ao hospital.

8. CONCLUSÕES

Nessa pesquisa encontramos mutações do tipo polimorfismo, portanto benignas, indicando que os pacientes enquadrados no estudo não apresentam mutações patogênicas no gene PCSK9, porém não exclui o diagnóstico de Hipercolesterolemia Familiar, uma vez que mutações em outros genes associados a HF encontram-se disponível para novos rastreamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTMANN, S.W.; DAVIS, H.R.; ZHU, L.J. et al. Niemann-Pick C1 like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. **Science**, 303(5661):1201-4, 2004.
- ALVES, A.C.S. **Base Genética da Hipercolesterolemia Familiar**. 2014. 241f. Tese (doutorado em bioquímica), Universidade de Lisboa, Lisboa, 2014.
- ALVES, A.C.; MEDEIROS, A.M.; FRANCISCO, V. et. al. Molecular diagnosis of familial Hypercholesterolaemia: an important tool for cardiovascular risk stratification. **Rev Port Cardiol**, 29(6):907-92, 2010.
- ARTENSTEIN, A.W.; OPAL, S.M. Proprotein convertases in health and disease. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 26, p. 2507–2518, 2011.
- BANDER, N.H. Monoclonal antibodies in urologic oncology. **Cancer**, 60, pp. 658-667, 1987.
- BOTHAM, K.M. Síntese, transporte e excreção do colesterol. Bioquímica Ilustrada de Harper, **Ed. Artmed**, 30 edição, cap. 26, pag 266-276, 2017.
- CATAPANO, A.L.E.; PAPADOPOULOS, N. The safety of therapeutic monoclonal antibodies: implications for cardiovascular disease and targeting the PCSK9 pathway. **Atherosclerosis**, 228, pp. 18-28, 2013.
- COHEN, M.H., et al. FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. **Oncologist**, 14, pp. 1131-1138, 2009.
- DENIS, M.; MARCINKIEWICZ, J.; ZAID, A. et al. Gene inactivation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces atherosclerosis in mice. **Circulation**, 125:894-901, 2012.
- CAMPO, V.L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 425–430, abr. 2007.
- CARIOU, B.Z.Y., et al. PCSK9 dominant negative mutant results in increased LDL catabolic rate and familial hypobetalipoproteinemia. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 29:2191-7, 2009.
- CHRISTIAN, D.A.S.; GABRIEL, J.T.G. Terapia com anticuerpos monoclonales em Cardiología y Medicina interna. **Revista Colombiana de Cardiología**, v. 23, n. 4, p. 293---300, 2016.

COELHO, V.; CAETANO, L; LIBERATORE JÚNIOR, R.; CORDEIRO, J.; SOUZA, D. Perfil lipídico e fatores de risco para doenças cardiovasculares em estudantes de medicina. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, n. 1, p. 57–62, 2005.

CORBETT RESEARCH. HRM – High Resolution Melt Assay Design and Analysis. Disponível em: < <http://www.gene-quantification.de/hrm-protocol-cls.pdf>, 2006>. Acesso em 14 de julho de 2018.

CORBETT. High resolution melt assay design and analysis: Rotor gene 6000. CorProtocol,c p. 1-24, 2006.

COHEN, D.E.; ARMSTRONG, E. J. Farmacologia do metabolismo do colesterol e das lipoproteínas. In: GOLAN, D. E. (Organizador) et al. Princípios de Farmacologia: A base fisiológica da farmacoterapia. 2 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, cap. 23. p. 384 - 403, 2009.

COHEN, J.C.; BOERWINKLE, E.; MOSLEY, J.R.. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. **N Engl J Med**, 354(12):1264-72), 2006.

CRID, 2014. Disponível em: <<http://crid.fmrp.usp.br/site/2014/11/04/a-aterosclerose/>> Acesso em 1 de julho de 2018.

CUI, C.-J. et al. PCSK9 and its modulation. **Clinica Chimica Acta**. v. 440 p. 79– 86, Fev. 2015. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898114004914>>. Acesso em: 15 de julho de 2018.

CUPPARI, L.; Nutrição Clínica no adulto. 2.ed. Barueri, SP: Manole, 2005.

LIPSCHITZ, D. A. Screening for nutritional status in the elderly. **Primary Care**, v. 21, n. 1, p. 55-67, 1994.

LLOYD JONES, B.H.; NAM , R.B.; D’AGOSTINO, S.R. et al. . Doença cardiovascular parental como fator de risco para doenças cardiovasculares em adultos de meia-idade: uma perspectiva estudo de pais e prole. **JAMA**, v. 291, p. 2204–2211, 2004.

FALUDI, A.A.; BERTOLAMI, M. C. Como diagnosticar e tratar dislipidemias. **Revista Brasileira de Medicina**, p. 6–11, 1998.

FARNIER, M. PCSK9: From discovery to therapeutic applications. **Archives of Cardiovascular Diseases**, v. 107, n. 1, p. 58–66, 1 jan. 2014.

FRISANCHO, A. R. Anthropometric standards for the assessment of growth and nutritional status. Ann Arbor, Michigan: University of Michigan Press, 1990.

GASPAR, I. M. O fenótipo da Hipercolesterolemia Familiar grave: casos clínicos, **Revista Fatores de Risco**, p. 27–33, 2015.

GINSBURG, H.N.; GOLDBERG, I.J. Distúrbios do Metabolismo das Lipoproteínas. In: FAUCI et al Harrison Medicina Interna Vol II. 14. Ed. Rio de Janeiro: **Editora McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda.**, p. 2270-2281, 1998.

GIUGLIANO, R. P.; SABATINE, M. S. THE PRESENT AND FUTURE Are PCSK9 Inhibitors the Next Breakthrough in the Cardiovascular Field? **Journal of the American College of Cardiology**, v. 65, p. 2638–2651, 2015a.

GIUGLIANO, R. P.; SABATINE, M. S. Are PCSK9 Inhibitors the Next Breakthrough in the Cardiovascular Field? **Journal of the American College of Cardiology**, v. 65, n. 24, p. 2638–2651, 23 jun. 2015b.

GO, G. W.; MANI, A. Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 85, n. 1, p. 19–28, 2012.

GOLDSTEIN, J.K.; HOBBS, H.H. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8. ed. New York: **Mc Graw-Hill**, 2001.

GUNDRY, C.N. et al. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. **Clin Chem**. v.49, n.3, Mar. p.396-406, 2003.

GUEDES, R. F. et al. Análise do perfil lipídico e dos fatores de risco associados a doenças cardiovasculares em acadêmicos da área da saúde de Juiz de Fora. HU **Revista de Juiz de Fora**, v. 42, p. 159–164, 2016.

GUPTA, A. K.; SEXTON, R. C.; RUDNEY, H. Differential regulation of low density lipoprotein suppression of HMG-CoA reductase activity in cultured cells by inhibitors of cholesterol biosynthesis. **J Lipid Res**, v. 31, n. May 1988, p. 203–215, 1990.

HANSEL, T.T.; KROPSHOFER, H.; CANTOR, T.; MITCHELL, J.A. A segurança e os efeitos colaterais dos anticorpos monoclonais. **Rev Drug Discov**, v. 9, n. 4, p. 325–338, 2010.

HANUKOGLU, I. Enzimas esteroidogênicas: estrutura, função e papel na regulação da biossíntese de hormônio esteróide. **Steroid Biochem Mol Biol.**, v. 8, n. 43, p. 779 – 804, 1992.

HENRIQUE, M. et al. Atividade terapêutica do anticorpo monoclonal evolocumab contra proteínas pcsk9 na modulação do colesterol ldl: revisão sistemática. **Rev. Aten. Saúde**, v. 15, p. 72–77, 2017.

HOLANDA, L.B.; FILHO, A. A. B. Métodos aplicados em inquéritos alimentares. **Rev Paul Pediatría**. Campinas, V. 24, p. 62-70, cap.1, 2006.

HORTON, J.D.; COHEN, J.C.; HOBBS, H.H. Molecular Biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. **Trends Biochem Science**, 32(2):71-7, 2006.

KRYPUY, M. ;AHMED, A.A.; ETEMADMOGHADAM, D.; et al. High resolution melting for mutation scanning of TP53 exons 5-8. **BMC Cancer**, 7:168, 2007.

KWITEROVICH, P. O. et al. Clinical Implications of the Molecular Basis of Familial Hypercholesterolemia and Other Inherited Dyslipidemias. **Circulation**, v. 123, p. 1153–1155, 21 mar. 2011.

LEANÇA, C. C. et al. HDL: o yin-yang da doença cardiovascular HDL: the yin-yang of cardiovascular disease. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 5454, n. 99, p. 777–84, 2010.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger principles of biochemistry. 5. ed. New York: W.H. Freeman, 2008.

LEITÃO, R. G. **Estudo Bioquímico e Molecular de Famílias com Hipercolesterolemia Familiar**. 212, 129f, Dissertação (mestrado em biologia humana e ambiente) UNIVERSIDADE DE LISBOA, 2012.

MACEDO, A. **avaliação de parâmetros clínicos e nutricionais em pacientes com Hipercolesterolemia Hamiliar heterozigótica**. 129f, Dissertação (mestrado) Universidade São Paulo, 2006.

MANSUR, A. Análise do Componente Genético da Doença Coronariana. **Arq Bras Cardiol**, v. 74, n. 6, p. 531–533, 2000.

MARCHINI, J. S. et al. Método Antropométricos para Avaliação do Estado Nutricional de Adultos. PUCCAMP. Campinas, v.5, n.2, p.121-142, 1992.

MARKS, D.; THOROGOOD, M.; NEIL, H.A.; HUMPHRIES, S.E. A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolaemia. **Atherosclerosis** 168: 1–14, 2003.

MATOS, L.S. DE et al. Gênese da aterosclerose em crianças e adolescentes: artigo de revisão. p. 27–35, 2012.

MESQUITA, R.A.; ANZAI, E.K.; OLIVEIRA, R.N.; NUNES, F.D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesqui Odontol Bras**, v. 15, n. 4, p. 314-319, out./dez. 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional. Classificação do Estado Nutricional. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. Disponível em :<

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/orientacoes_coleta_analise_dados_antropometricos.pdf> Acesso em 30 de maio de 2018.

NAOUMOVA, R.P.; TOSI, I.; PATEL, D. et al. Severe hypercholesterolemia in four British families with the D374Y mutation in the PCSK9 gene: long-term follow-up and treatment response. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2005;25:2654-60.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH publication n.00-4084). The practical guide identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults, Bethesda, MD: 2000.

NEWSOME, B. W. E ERNSTOFF, M. S. (2008). The clinical pharmacology of therapeutic monoclonal antibodies in the treatment of malignancy; have the magic bullets arrived? *Br J Clin Pharmacol*, 66, pp. 6-19.

OLSO. Descoberta das lipoproteínas, seu papel no transporte de gordura e sua importância como fatores de risco. **J Nutr.**, v. 31, n. 2, p. 203–215, 1998.

PEREIRA, A.C. et al. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). **Arq. Bras. Cardiol.** vol.99 no.2 supl.2 São Paulo Aug. 2012.

PEREIRA, F.J.; CRUZ, A.A.V.; NETO, H.P.H.; LUDVIG, C.C. Blefaroplastia associada a enxertia de pele autóloga para xantelasmas extensos: relato de caso. **Arq. Bras. Oftalmol.** vol.71, n. 14, São Paulo, 2008.

PISCIOTTA, L.; OLIVA, C.P.; CEFALU, A.B.; et al. Additive effect of mutations in LDLR and PCSK9 genes on the phenotype of familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, p. 433-440. v. 186, 2006.

ROSS, R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 2, p. 115–126, 14 jan. 1999.

RUDENKO L.; DEISENHOFER J. O receptor de lipoproteínas de baixa densidade: ligandos, debates de folclore. **Curr Opin Struct Biol**, v. 6, p. 683–9, 2003.

SANTOS, R.D.; GAGLIARDI, A.C.M.; XAVIER, H.T.; CASELLA FILHO, A.; ARAÚJO, D.B.; CESENA, F.Y.; ALVES, R. J. et al. I Diretriz Brasileira De Hipercolesterolemia Familiar (HF). **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 99, n. 2, 2012.

SIQUEIRA, A.; ALMEIDA-PITITTO, B.; FERREIRA, S. Doença cardiovascular no diabetes mellitus: análise dos fatores de risco clássicos e não-clássicos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 2, p. 257–267, 2007.

SGRO, C. Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review. **Toxicology**, 105, pp. 23-29, 1995.

STERN, M. E HERRMANN, R. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. **Crit Rev Oncol Hematol**, 54, pp. 11-29, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Atualização Da Diretriz Brasileira De Dislipidemias E Prevenção Da Aterosclerose – 2017. **Revista Da Sociedade Brasileira De Cardiologia**, v. 109, n. 1, 2017.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. v. 99, n. 2, p. 1-28, 2012.

STEINBERG, D.1.; WITZTUM, J.L. .Inhibition of PCSK9: a powerful weapon for achieving ideal LDL cholesterol levels. **Proc Natl Acad Sci USA**,106(24):9546-7, 2009.

TALMUD, P.J.; SHAH, S.; WHITTALL, R. et al. Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: a case-control study. **Lancet** 381: 1293–301, 2013.

TAVORI, H.; RASHID, S.; FAZIO, S. On the function and homeostasis of PCSK9: Reciprocal interaction with LDLR and additional lipid effects. **Atherosclerosis**, v. 238, n. 2, p. 264–270, 1 fev. 2015.

TAYLOR, R.W.; JONES, I.E.; WILLIAMS, S.M.; GOULDING, A. Evaluation of waist circumference, waist-to-hip ratio, and the conicity index as screening tools for high trunk fat mass, as measured by dual-energy X-ray absorptiometry, in children aged 3-19 y. **Am J Clin Nutr** 2000; 72:490-5

VARRET, M. et al. Genetic heterogeneity of autosomal dominant hypercholesterolemia. **Clinical Genetics**, v. 73, n. 1, p. 1–13, 19 nov. 2007.

VASCONCELOS, K. A. DA S. **Identificação de mutações no gene do receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDLR) em pacientes com hipercolesterolemia familiar**. 2015, 84 p. Tese (doutorado em clínica médica) Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

VIEBIG, R.F.;VALERO,M.P. Desenvolvimento de um questionário de frequência alimentar para o estudo de dieta e doenças não transmissíveis. **Revista Saúde Pública**, Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil, 2003.

VITOLO, M.R. Nutrição da gestação ao envelhecimento. Rio de Janeiro: **Rubio**, 2008.

WHO. Estadísticas Sanitarias Mundiales. 2011.

WHO, World Health Organization. Obesity status: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. Geneva, 1998.

World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a World Health Organization Consultation. Geneva: World Health Organization, 2000. p. 256. WHO Obesity Technical Report Series, n. 284.

WIEGMAN, A. et al. Familial hypercholesterolaemia in children and adolescents: gaining decades of life by optimizing detection and treatment. **European Heart Journal**, v. 36, n. 36, p. 2425–2437, 2015.

WHITTAL, 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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity: preventing and managing the global epidemic of obesity. Report of the WHO Consultation on Obesity. Geneva, 3-5 June, 1997.

World Health Organization. (WHO). World Health Statistics 2015. Geneva; 2015.

WITZTUM, J. L. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 9. ed. Rio de Janeiro: **McGraw Hill**, 1997.

XAVIER, H. T. et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n. 4, p. 01-22, 2013.

ZÁRATE, A.L.M. Colesterol e aterosclerose. Considerações e tratamento histórico. **Arch. Cardiol. Mex.**, v. 86, n. 2, 2016.

ANEXOS

ANEXO 1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO
RIBEIRÃO PRETO/SP – BRASIL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: “Triagem, diagnóstico e caracterização genética da Hipercolesterolemia Familiar em pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo”.

O motivo que nos leva a estudar a hipercolesterolemia familiar, que é uma doença de causa genética herdada pelos pais, se justifica uma vez que as deficiências no diagnóstico e tratamento da hipercolesterolemia familiar indicam a necessidade de muito maior sensibilização e compreensão desta doença, tanto por parte do público assim como dos profissionais de saúde, assim, com o diagnóstico dessa doença, podemos estar indicando o melhor tratamento para cada indivíduo para que possam ter uma melhor qualidade de vida e restringir as chances de desenvolver doenças do coração. O objetivo desse projeto é diagnosticar e caracterizar a frequência e as alterações genéticas da hipercolesterolemia familiar em pacientes e familiares atendidos no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

Os procedimentos de avaliação nutricional e coleta de sangue serão da seguinte forma:

Você será convidado a vir ao Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto em local, dia e hora marcada, onde faremos um questionário de frequência alimentar, de hábitos alimentares e estilo de vida, onde o mesmo não é invasivo, podendo fornecer diversas informações

fundamentais sobre a alimentação, você será solicitado a responder com que frequência cada item da lista de alimentos é consumido em número de vezes, por dia, por semana, por mês, ano, em que a avaliação do consumo habitual de grupos específicos de alimentos, terá o objetivo de buscar alguma correlação com alguma doença crônicas não-transmissível, como diabetes, hipertensão, hipercolesterolemia e etc.

Por meio da aplicação deste questionário, será possível determinar as características de consumo alimentar e estilo de vida que sugerem possíveis correlações com hipercolesterolemia e doenças crônicas.

Após o questionário de frequência alimentar, será realizado um questionário incluindo aspectos como hábitos de vida e história clínica. Depois, faremos uma avaliação antropométrica, onde serão aferidos o seu peso e estatura, calculado o Índice de massa corpórea- IMC, medidas das circunferências abdominal, quadril, braço, pregas cutâneas tricipital, bicipital, subescapular e suprailíaca. Para a aferição dessas medidas, os voluntários estarão com a bexiga vazia, roupas leves, descalços e em jejum. Juntamente com essas medidas, em que usaremos fita métrica e um aparelho de medir a gordura subcutânea, será realizado a avaliação da composição corporal pela bioimpedância tetrapolar que calcula a massa magra e gorda corporais.

Após todos esses procedimentos, faremos uma coleta de amostra de 5ml de sangue, equivalente a uma colher de chá, para detectar colesterolemia e análise de DNA, para então diagnosticar as causas genéticas da hipercolesterolemia, então será necessário que você esteja em jejum de pelo menos 12 horas.

Os questionários, a avaliação nutricional e as coletas de sangue serão realizadas por pessoal especializado.

Se você aceitar participar, todas as dúvidas sobre a pesquisa serão respondidas. Caso você queira desistir durante a pesquisa, não haverá nenhum problema e o tratamento que você estava fazendo antes continuará da mesma forma. Quanto aos resultados obtidos neste estudo, meu telefone está escrito nesta folha, e você poderá me ligar a qualquer hora para tirar suas dúvidas.

DESCONFORTOS E RISCOS E BENEFÍCIOS: No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da pele. Complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente de pequeno porte. Se houver pequena perda de sangue da veia no local da punção geralmente há um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias, porém a coleta de sangue é muito importante para o diagnóstico da hipercolesterolemia familiar e com isso fazer tratamento adequado.

Este estudo poderá no futuro beneficiar as famílias dos afetados através do aconselhamento nos quais fatores de risco genéticos poderão ser identificados, contribuindo no diagnóstico e estimativa de risco de ocorrência de outros casos nestas famílias.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA: O atendimento clínico e as informações sobre o aconselhamento genético da família serão realizadas pelos pesquisadores. As coletas de sangue serão realizadas por pessoal especializado. Caso você apresente algum problema em seu exame de sangue, você será encaminhado para tratamento adequado da seguinte maneira.

- a) Receberá orientações nutricionais adequadas;
- b) Receberá orientações de tratamento medicamentoso adequado para sua doença.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO: Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados do exame clínico e laboratorial da pesquisa serão entregues para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Você receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre Esclarecido, assinado e rubricado em todas as páginas por você e pelo pesquisador, outra via será arquivada com os pesquisadores da Universidade de São Paulo.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS: Todas as despesas com pesquisa serão compensadas pela própria instituição, com exceção de gastos com transporte, alimentação, tempo, creche, etc. Na qual não haverá qualquer compensação financeira ao participante.

DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELA PARTICIPANTE: para indivíduos vulneráveis como pessoas com capacidade mental ou com autonomia reduzida e menores de idade devem ter um representante legal, sem prejuízo de sua autorização. Menores de 12 a 18 anos deverão assinar o Termo de Assentimento Livre e seus responsáveis assinarão o Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

Eu, _____ fui informada (o) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. A professora orientadora Vivian Marques Miguel Suen, os professores colaboradores José Ernesto dos Santos, Maria Cristina Foss de Freitas e a aluna Aldrina Laura da Silva Costa certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar a estudante Aldrina Laura da Silva Costa, a professora orientadora Vivian Marques Miguel Suen ou o professor colaborador José Ernesto dos Santos no telefone (16) 3602-2366 ou o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e Secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, situado no HCRP, FMRP-USP, Avenida Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, cep. 14048-900 fone (16) 36022228, Ribeirão Preto, SP.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante	Data
------	----------------------------	------

Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
------	---------------------------	------

Nome	Assinatura da Testemunha	Data
------	--------------------------	------

ANEXO 2 - Termo de Assentimento

TERMO DE ASSENTIMENTO

(No caso do menor entre 12 a 17 anos)

Eu, _____, portador do RG nº. _____, atualmente com _____ anos, residindo na _____, após leitura minuciosa do Termo de Consentimento Livre Esclarecido, devidamente explicada pela equipe de pesquisadores Vivian Marque Miguel Suen, Aldrina Laura da Silva Costa, José Ernesto dos Santos e Maria Cristina Foss de Freitas, tendo o consentimento do meu responsável já assinado, firmo meu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em participar da pesquisa proposta, e consinto na realização dos questionários, da antropometria, bioimpedência e coleta de sangue para exames de lipidograma e extração de DNA. Consinto também como o uso científico e didático dos dados, preservando a minha identidade. Fui informado sobre, tenho acesso à Resolução CNS 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde, e estou ciente de que todo trabalho realizado torna-se informação confidencial guardada por força do sigilo profissional. A qualquer momento, posso solicitar a minha exclusão da pesquisa. Posso apresentar queixa de abuso ou uso irregular dos dados ao Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, telefone (16) 36022228, e à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep) (61) 33152150, 33152151 e 33153566, cns@saude.gov.br. Ciente do conteúdo assino o presente termo.

Ribeirão Preto/SP, _____ de _____ de 20____.

Nome	Assinatura do Participante	Data
Nome	Assinatura do Responsável	Data
Nome	Assinatura do Pesquisador	Data

ANEXO 3- Lista das sequências de primers para o gene PCSK9 modificada de Pisciotta et al., 2006

Amplified Region	Forward Primer	Reverse Primer	Size (bp)
Exon 1	CTTCAGCTCCTGCACAGTC	TGAGGCCCCGAGAGGAAA	393
Exon 2	GGGTGAGATAAAGTACACCTAGG	CCCTATCAGGAAGTGCCATTCC	304
Exon 3	GGGACAGGTTTGTATCAGGTAAG	AATGGATTTCAGCTCAGATGGG	269
Exon 4	CTTTATGCTCATTCCTCCTCTC	CCACCCACCTCCAGGAT	242
Exon 5	CCAGCCACCTGCTGATTT	TTCTTGGTTAGGAGACATTAGCTC	314
Exon 6	CCATCACTCTGTGCCTGTAAG	CCCACGTGCCACAAGAA	379
Exon 7	CTCTCTTGGGCTCCTTTCTCTGC	CGGCACAGACCCTGACT	300
Exon 8	GCCATCACCATCTTTCACCATTCA	AAGGGAGAGACTGTCAAGGTCACA	285
Exon 9	CTCCTCTCTCCTACCATGAATA	CTTACAGAAGAGCTGGAGTCTGGAG	372
Exon10	GTTGATCCTGTCTAGTCCCTTTC	TGAGTCTCATGGATCACACTTG	358
Exon 11	GAGACGGAGCATCCCAGCATTCA	CAGAAAAGCTGTGCAGGAGAGACA	297
Exon 12	GATGTCGGAGGGAGAAATGAAG	GGGACAAGTCGGAACCATTT	374

APENDICES

APÊNDICE 1: Curvas HRM seguido do seqüenciamento dos exóns mutados nos pacientes.

Exon 1 2746 p.Glu57Lys[GAG>AAG] (G/A)

p.Glu57Lys[GAG/AAG](G/A)

Exon 5, 2694 0805060K p.Gly240Gly[GGC>GGT] (C/T)

Exon 7, 2542, 0762415B p.Gln342Gln [CAA>CAG] (A/G)

p.Gln342Gln[CAA>CAG](A/G)

Exon 7, 2545, 0043967J p.Gln342Gln [CAA>CAG] (A/G)

p.Gln342Gln[CAA>CAG](A/G)

Exon 7, 2576, 1221107E p.Gln342Gln [CAA>CAG] (A/G)

p.Gln342Gln[CAA>CAG](A/G)

Exon 7, 2593, 0432625H p.Gln342Gln [CAA>CAG] (A/G)

Exon 7, 2610, 0424133A p.Gln342Gln [CAA>CAG] (A/G)

Exon 7, 2611, 12100880D p.Gln342Gln [CAA>CAG] (A/G)

Exon 7, 2731, 1171555H p.Gln342Gln [CAA>CAG] (A/G)

Exon 7, 2733, 0452286D p.Gln342Gln [CAA>CAG] (A/G)

p.Gln342Gln[CAA>CAG](A/G)

Exon 9, 2564, 1241900A p.Val474Ile[GTC>ATC] (G/A)

p.Val460Val[GTA/GTG](A/G)

Exon 9, 2569, 0163219-J p.Val474Ile[GTC>ATC] (G/A)

Exon 9, 2694, 0805060K p.Val474Ile[GTC>ATC] (G/A)

p.Val474Ile

Exon 9, 2752 0139775H, p.Val474Ile

Exon 11, 2592, 0792563K p.Ala617Ala

Exon 12, 2694, 0805060K p.His644His[CAC >CAT] (C/T)

Gene: PCSK9

p.His644His

Exon 12, 2746, 1264019I p.Gly670Glu[GGG >GAG] (A/A)

Gene: PCSK9

p.Gly670Glu

APÊNDICE 2: Questionário de Frequência Alimentar

Questionário de Frequência Alimentar**Paciente:****Prontuário:****Idade:**

Alimento	Frequência de consumo							
	Quantidade	Nunca	1x/mês	1-3 x/mês	1 x/semana	2-3 x/semana	4-5 x/semana	Diariamente
Presunto	() 1 fatia () 2 fatias () 3 fatias () + de 3							
Salame, salsicha, lingüiça	() 1 un () 2 un () 3 un () + de 3 un							
Cachorro quente	() 1 un () 2 un () 3 un () + de 3 un							
Bacon	() 1 colher () 2 col () 3 ou + col							
Hambúrguer	() 1 un () 2 un () 3 un () + de 3 un							
Lanche c/ hamburguer	() 1 un () 2 un () 3 un () + de 3 un							
Caldos concentrados (carne, galinha, picanha...)	() 1 un por preparação () 2 ou + un por preparação							
Biscoito de água e sal	() 1-3 () 4-5							
Salgadinho “chips”	() 1 pacote							

	() 2 pacotes () 3 ou + pacotes							
Milho/ervilha enlatados	() 1 colher () 2 col () 3 ou + col							
Macarrão instantâneo tipo “Miojo”	() 1 a 2 um () 3 ou + un							
Chocolate	() 1 a 2 um () 3 ou + un							
Maionese tipo “Hellmann’s”	() 1 colher () 2 col () 3 ou + col							
Queijos amarelos	() 1 fatia () 2 fatias () 3 fatias () 3 ou + fatias							
Extrato de tomate	() 1 col por preparação () 2 ou + col por preparação							
Manteiga	() 1 colher () 2 col () 3 ou + col							
Margarina	() 1 colher () 2 col () 3 ou + col							
Bolacha recheada	() 1-4 () 5-9 () Pacote inteiro							

APÊNDICE 3: Avaliação Antropométrica, Bioimpedância e lipidograma

Nome:
Prontuário:
Data:
Horário:

Antropometria

Sexo	
Idade	
Peso	
Estatura	
IMC	
Circunferência do quadril	
Circunferência da cintura	
Circunferência do braço	

Bioimpedância

% Gordura	
Peso gordura	
TMB	
Massa Magra Kg	
Água corporal (Litros e %)	
Biorresistência	
Reactância	
IMC	

Lipodograma

Elemento	Resultado	Referência	Unidade
Colesterol		VN<200	mg/dl
Triglicérides		VN<150	
HDL		VN>35	
LDL		VN<130	

APÊNDICE 4 : Questionário Socioeconômico

Questionário Socioeconômico

Paciente:

Prontuário:

Idade:

1 - Situação Econômica da Família

Faixa salarial	Pontos	
1 - acima de 24 SM (muito/rica)	10	()
2 - entre 16 e 24 SM (rica)	7	()
3 - entre 08 e 16 SM (média)	5	()
4 - entre 04 e 08 SM (remediada-média)	3	()
5 - entre 02 e 04 SM (remediada)	1	()
6 - abaixo de 02 SM (pobre)	0	()

2 - Número de Membros da Família

Número de Membros	Pontos	
1 a 2	8	()
3 a 4	5	()
5 a 7	3	()
acima de 7	0	()

3 - Grau de Instrução dos Chefes

Nível	Pontos	
Superior completo	8	()
Superior incompleto	7	()
Colegial completo	6	()
Colegial incompleto	5	()
Ginasial completo	4	()
Ginasial incompleto	3	()
Primário completo	2	()
Primário incompleto	1	()
Analfabeto e Semi-alfabetizado	0	()

4 - Habitação

Habitação	Pontos	
Casa própria	4 a 8	()
Residência compromissada	4 a 6	()
Casa cedida por benefício	3 a 5	()
Casa alugada	2 a 6	()
Casa cedida por necessidade	2	()

5 - Profissão do Chefe

Profissão	Pontos	
Grande industrial, comerciante, fazendeiro, empresário	10	()
Profissional liberal, oficial, funcionário de nível superior	7	()
Médio industrial, comerciante, agricultor, empresário, profissional de nível médio e/ou técnico, médio funcionário	5	()

Funcionário ou empregado de nível inferior (empregado burocrático e outros), mestre oficial, pequeno comerciante e pequeno agricultor (autônomo)	3	()
Pequeno funcionário ou trabalhador; operário, trabalhador rural, suboficial e outros	2	()
Subemprego: trabalhador volante ou ambulante (rural, etc)	0	()

6 - Sistema de Pontos para Classificação Sócio-Econômica

Código	Classe sócio-econômica	Pontos	Intervalo	
BI	Classe Baixa Inferior	0 a 5	5	()
BS	Classe Baixa Superior	6 a 11	5	()
MI	Classe Média Inferior	12 a 20	8	()
M	Classe Média	21 a 29	8	()
MS	Classe Média Superior	30 a 38	8	()
A	Classe Alta	39 ac.	/	()

Apêndice 5: Aprovação do Comitê de Ética

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

www.hcrp.fmrp.usp.br

PROJETO DE PESQUISA

Ribeirão Preto, 14 de março de 20 14.

Ilustríssima Senhora
Dr.^a Marcia Guimarães Villanova
MD. Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

Sistema UPC nº 7778

Senhora Coordenadora,

Encaminho em anexo o projeto de pesquisa intitulado

Imagem, diagnóstico e caracterização genética de
hipercolesterolemia em pacientes atendidos no
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

juntamente com a documentação necessária para avaliação ética deste Comitê.

O projeto acima mencionado será desenvolvido no (a) departamento de
clínica médica

Informo também que o pesquisador responsável e o orientador possuem currículo Lattes.

O orçamento do presente projeto foi analisado pela equipe técnica da UPC antes da submissão ao Comitê e foi aprovado.

Equipe Técnica UPC

Atenciosamente,

Aldemir Laura da Silva Costa Honorato

Pesquisador Principal ou Aluno (nome completo e assinatura)

Vinicius M. Miguel Fuen

Pesquisador Principal ou Orientador (nome completo e assinatura)

De acordo:

Prof.^a Dra. Margaret de Castro
Chefe do Departamento de Clínica Médica

Chefe de Departamento (assinatura e carimbo)

Vinicius M. Miguel Fuen
Chefe do Ambulatório/ Laboratório (assinatura e carimbo)

Obs.: Caso algum chefe possua vínculo com a pesquisa, deverá ser solicitada assinatura do suplente.

Após assinatura em todos os campos, digitalizar toda a documentação do check list e encaminhar ao CEP via Plataforma Brasil.

HC - Campus Universitário
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

UNIDADE DE PESQUISA CLÍNICA
Fone: (16) 3602-2632 FAX: 3602-2962