Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Renato Augusto Zorzo

Análise do perfil de metilação dos genes LDLR, APOB e
PCSK-9 em portadores de Hipercolesterolemia Familiar sem
alterações moleculares

Ribeirão Preto

2020

Renato Augusto Zorzo

Análise do perfil de metilação dos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK-9* em portadores de Hipercolesterolemia Familiar sem alterações moleculares

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

(Versão corrigida. A original encontra-se disponível tanto na biblioteca do Departamento de Puericultura e Pediatria quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)).

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente (Endocrinologia)

Orientador: Prof. Dr. Raphael Del Roio Liberatore Jr

Ribeirão Preto

2020

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

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central do Campus de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

Zorzo, Renato Augusto

Análise do perfil de metilação dos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK-9* em portadores de Hipercolesterolemia Familiar sem alterações moleculares. Ribeirão Preto, 2020.

117 p. : il.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientador: Liberatore Jr, Raphael Del Roio

1. Colesterol. 2. Epigenética. 3. Metilação. 4. Criança.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Zorzo, Renato Augusto

**Análise do perfil de metilação dos genes
LDLR, *APOB* e *PCSK-9* em portadores de
Hipercolesterolemia Familiar sem
alterações moleculares**

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

Área de concentração: Saúde da Criança e do
Adolescente (Endocrinologia)

Aprovado em 16 de dezembro de 2020

Banca examinadora

Prof. Dr. Raphael Del Roio Liberatore Júnior (orientador)
Departamento de Puericultura e Pediatria – FMRPUSP
Presidente da Banca Julgadora

Prof. Dr. Paulo Henrique Manso
Departamento de Puericultura e Pediatria – FMRPUSP
Julgamento: *Aprovado*

Prof. Dr. Raul Dias dos Santos Filho
Instituto do Coração (InCor) – FMUSP
Julgamento: *Aprovado*

Prof. Dr. Carlos Alberto Nogueira de Almeida
Departamento de Medicina – UFSCar
Julgamento: *Aprovado*

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus filhos, **Ariele** e **Enrico**.*

Sei que este trabalho exigiu sacrifício de muito tempo, que poderíamos ter curtido juntos.

Desejo que, quando maturidade tiverem, compreendam a minha perseverança em continuar a trilhar um caminho cheio de percalços, “sempre em frente”.

Que vocês saibam que houve muitas dificuldades, e muitos motivos para desistir, e que prosseguir foi uma escolha de cada dia.

Que vocês saibam que houve “n” quedas, mas principalmente que o caminho da vitória foi determinado por “n+1” reerguidas.

Que tenham em suas recordações o pai nesta época da vida, administrando trabalho, decisões difíceis, vicissitudes que grande pandemia de 2020 trouxe para a nossa realidade, porém buscando seu caminho, sem abandonar o que é de mais precioso na vida: a família.

Charles Chaplin dizia que a perseverança é o caminho para o êxito. A vitória não exige que sejamos grandes heróis, mas uma decisão a ser tomada a cada dia, a cada momento. Lembrem-se do Remy: “Qualquer um pode cozinhar!”

Deixo a vocês o exemplo de que a busca pelos nossos sonhos é fazer um pouquinho todos os dias. Escolher a vitória dia após dia, ano após ano. E jamais se esqueçam do bem mais sagrado de todos: a Família.

Este é o meu legado para vocês.

*Com muito Amor,
Vosso pai, em setembro de 2020.*

Agradecimentos

Ao Grande Arquiteto do Universo, por ter me proporcionado o Dom da Vida, e a oportunidade de aprender e melhorar como pessoa a cada amanhecer;

Aos meus pais (meu pai ainda me acompanhando nesta esfera e minha mãe zelando por mim em outra dimensão), pelo empenho e investimento na minha formação, que sintam minhas conquistas como suas;

À Juliana, mais que esposa, minha referência e meu porto seguro;

À Didi, pela convivência diária, apoio incondicional e compreensão;

Ao meu irmão adotivo e sócio Thiago Hirose, por acreditar na minha capacidade mesmo nos momentos em que eu mesmo não acredito;

Ao estatístico Davi Aragon, pela disponibilidade de várias reuniões desde o início do projeto, contribuindo para os rumos desta pesquisa;

À bióloga Veridiana Kill Suazo, a quem atribuo o crédito de ter realizado o trabalho em laboratório, pelos momentos de convivência e pela paciência de ter me inserido no universo da biologia molecular;

Ao Prof. Raphael Liberatore, a quem chamo hoje de amigo, pela acolhida fraternal como orientando, pela compreensão sobre minhas limitações e por ter sempre acreditado no meu trabalho;

Aos Professores da Banca Examinadora, pela disponibilidade na arguição desta tese em defesa pública;

E à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio na realização da pesquisa que resultou nesta tese.

Every breaking wave

By U2

(uma reflexão sobre as lutas da vida)

*Every breaking wave on the shore
Tells the next one there'll be one more
And every gambler knows that to lose
Is what you're really there for*

*Summer, I was fearlessness
Now I speak into an answer phone
Like every falling leaf on the breeze
Winter wouldn't leave it alone*

*Every sailor knows that the sea
Is a friend made enemy
And every shipwrecked soul knows what it is
To live without intimacy
I thought I heard the captain's voice
But it's hard to listen while you preach
Like every broken wave on the shore
This is as far as I could reach*

*The sea knows where are the rocks
And drowning is no sin
You know where my heart is
The same place that yours has been
We know that we fear to win
And so, we end before we begin...*

*If you go your way and I go mine
Are we so helpless against the tide?
Baby, every dog on the street
Knows that we're in love with defeat
Are we ready to be swept off our feet?
And stop chasing
Every breaking wave*

RESUMO

Zorzo, RA. Análise do perfil de metilação dos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK-9* em portadores de Hipercolesterolemia Familiar sem alterações moleculares. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2020.

A Hipercolesterolemia Familiar (HF) é uma doença autossômica codominante que tem prevalência estimada de 1:500 na população geral. Quando não diagnosticada precocemente, seus desfechos na doença arterial coronariana e encefálica tendem a ter apresentação precoce, com alto risco de morte. Sua origem está relacionada a mutação nos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK-9*, entretanto em 20 a 40% dos casos não são encontradas alterações estruturais nesses genes. A hipótese deste estudo é que, nesses pacientes, um evento epigenético, especificamente padrões de DNA metilados, poderiam explicar a origem do fenótipo. O grupo de estudo foi composto por 47 amostras de DNA de pacientes com diagnóstico clínico de HF pelos Critérios da *Dutch Lipid Clinic Network* (DCLN) e com estudo de metilação negativo para os três genes. O grupo controle foi composto por 46 amostras de pacientes com lipidograma normal. As amostras foram submetidas a pesquisa de metilação das regiões promotoras dos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK-9*. As prevalências de doentes entre os expostos e entre os não expostos foram comparadas. Não foram observadas diferenças com significância estatísticas nos padrões de metilação dos genes *APOB* e *PCSK-9*. No gene *LDLR*, houve presença de metilação total em 47 amostras no grupo de estudo e em 29 no grupo controle. A prevalência de doentes entre os expostos foi 61,8% e entre os não expostos 15%. A razão de prevalências encontrada foi 4,12 (IC95% 1,43-11,88). Levando em consideração o papel fisiológico do gene *LDLR* no metabolismo das lipoproteínas, concluímos que esse resultado aponta para uma possível associação entre o perfil de metilação do gene *LDLR* e a apresentação clínica da HF nos pacientes que não apresentam alterações estruturais nos genes relacionados à doença.

Palavras-chave: Colesterol. Epigenética. Metilação. Criança.

ABSTRACT

Zorzo, RA. Analysis of the methylation profile of *LDLR*, *APOB* and *PCSK-9* genes in patients with familial hypercholesterolemia without molecular modifications. Ribeirão Preto: University of São Paulo, Ribeirão Preto School of Medicine; 2020.

Familial Hypercholesterolemia (FH) is an autosomal codominant disease that has an estimated prevalence of 1: 500 in the general population. When not diagnosed early, its outcomes in coronary artery and brain disease tend to have an early presentation, with a high risk of death. Its origin is related to a mutation in the *LDLR*, *APOB* and *PCSK-9* genes, however, in 20 to 40% of cases, no structural changes are found in these genes. The hypothesis of this study is that, in these patients, an epigenetic event, specifically methylated DNA patterns, could explain the origin of the phenotype. The study group consisted of 47 DNA samples from patients with a clinical diagnosis of FH by the Dutch Lipid Clinic Network (DCLN) Criteria and with a negative methylation study for the three genes. The control group was composed of 46 samples from patients with normal lipidogram. The samples were submitted to methylation research of the promoter regions of the *LDLR*, *APOB* and *PCSK-9* genes. The prevalence of patients among the exposed and the unexposed was compared. No statistically significant differences were observed in the methylation patterns of the *APOB* and *PCSK-9* genes. In the *LDLR* gene, total methylation was present in 47 samples in the study group and in 29 in the control group. The prevalence of patients among the exposed was 61.8% and among the unexposed 15%. The prevalence ratio found was 4.12 (95% CI 1.43-11.88). Taking into account the physiological role of the *LDLR* gene in the metabolism of lipoproteins, we conclude that this result points to a possible association between the methylation profile of the *LDLR* gene and the clinical presentation of HF in patients who do not show structural changes in the disease-related genes.

Keywords: Cholesterol. Epigenetics. Methylation. Children.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura molecular de do ciclo-pentano peridrofenantreno.....	18
Figura 2 -	Estrutura molecular do colesterol.....	19
Figura 4 -	Estrutura típica de uma lipoproteína de baixa densidade.....	22
Figura 5 -	Relação entre densidade relativa de receptores de LDL e níveis séricos de LDL.....	31
Figura 6 -	Alterações metabólicas da HF.....	32
Figura 7 -	Patogênese da HF.....	33
Figura 8 -	Prevalência esperada de HF em alguns países, comparativamente com a prevalência diagnosticada.....	35
Figura 9 -	Metilação da citosina.....	40
Figura 10 -	Influência da metilação de DNA na transcrição gênica.....	41
Figura 11 -	Relações entre estados de metilação da acetilação de histonas na transcrição gênica.....	42
Figura 12 -	Identificação de ilhas CpG em regiões promotoras dos genes <i>LDLR</i> , <i>APOB</i> e <i>PCSK-9</i>	50
Figura 13 -	Como os <i>primers</i> são desenhados.....	51
Figura 14 -	Um ciclo de PCR.....	55
Figura 15 -	Produtos dos vários ciclos de PCR.....	55
Figura 16 -	Atividade do agente fluorescente na técnica MS-HRM.....	57
Figura 17 -	Curva de <i>melting</i>	57
Figura 18 -	Correlação entre percentual de metilação e T_m	59
Figura 19 -	Princípio utilizado para o cálculo dos percentuais de metilação.....	59
Figura 20 -	Fluxograma de trabalho.....	63
Figura 21 -	<i>Flowchart</i> de recrutamento das amostras do grupo de estudo.....	67
Figura 22 -	<i>Flowchart</i> de recrutamento das amostras do grupo controle.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores de referência (em mg/dL) dos lípides séricos para adultos.....	27
Tabela 2 -	Valores de referência (em mg/dL) dos lípides séricos de 2-19 anos.....	28
Tabela 3 -	Genes defeituosos na HF.....	34
Tabela 4 -	Critérios diagnósticos da HF (Critérios da <i>Dutch Lipid Clinic Network</i> , DCLN).....	37
Tabela 5 -	Desenhos dos <i>primers</i> utilizados neste estudo.....	52
Tabela 6 -	Características clínicas dos grupos de estudo (HF+) e controle (HF-).....	69
Tabela 7 -	Médias e Desvios Padrão (DP) da idade e níveis séricos de LDL dos grupos.....	69
Tabela 8 -	Tm e Met% das amostras HF+ do <i>amplicon LDLR/Ilha-1</i>	70
Tabela 9 -	Tm e Met% das amostras HF- do <i>amplicon LDLR/Ilha-1</i>	71
Tabela 10 -	Tm e Met% das amostras HF+ do <i>amplicon LDLR/Ilha-2</i>	72
Tabela 11 -	Tm e Met% das amostras HF- do <i>amplicon LDLR/Ilha-2</i>	73
Tabela 12 -	Financiamento do projeto.....	105

LISTA DE SIGLAS

ABC-A1	<i>ATP binding cassette 1</i>
Apo	Apolipoproteína
APOB	Gene que codifica Apolipoproteína B-100
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CETP	Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol
CT	Colesterol total
DAC	Doença arterial coronariana
DCLN	<i>Dutch Lipid Clinic Network</i>
DM	Diabetes mellitus
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPP	Departamento de Puericultura e Pediatria
FAEPA	Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do HCFMRP-USP
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HAT	Histona acetil transferase
HCRP	Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
HDAC	Histona deacetilase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HF	Hipercolesterolemia Familiar
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril Coenzima A
IC	Intervalo de Confiança
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
InCor	Instituto do Coração
LBM	Laboratório de Biologia Molecular
LCAT	Lecitina-Colesterol Acil-Transferase
LDL	Lipoproteína da baixa densidade
<i>LDLR</i>	Gene que codifica o receptor de LDL
LLP	Lipoproteína Lipase
Met%	Percentual de metilação
MTP	Proteína de Transferência de Triglicérides Microsomal

PCSK-9	Pró-proteína Convertase Subtilisina/Kexina Tipo 9
RA	Risco Absoluto
RNA	Ácido Ribonucleico
RP	Razão de Prevalências
RR	Risco Relativo
SREBP	Proteína de Ligação ao Elemento Regulador de Esteróis
TAG	Triacilglicerol
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TG	Triglicérides
T _m	Temperatura de <i>melting</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
TSH	Hormônio Tireo-Estimulante
UPC	Unidade de Pesquisa Clínica
USP	Universidade de São Paulo
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Colesterol	18
1.2 Aterosclerose	24
1.3 Dislipidemias	26
1.3.1 Definição	26
1.3.2 Classificação laboratorial	26
1.3.3 Classificação etiológica	27
1.3.4 Dislipidemias em crianças	28
1.4 Hipercolesterolemia Familiar	29
1.4.1 Definição	29
1.4.2 Patogênese	29
1.4.3 Epidemiologia	34
1.4.4 Diagnóstico	35
1.5 Epigenética	38
1.5.1 Conceito	38
1.5.2 Histórico	38
1.5.3 Mecanismos	39
1.5.3.1 Metilação do DNA	40
1.5.3.2 Metilação e acetilação de histonas	40
1.5.4 Epigenética e HF	42
1.6 Justificativa	43
1.7 Objetivos	44
1.7.1 Objetivo primário	44
1.7.2 Objetivos secundários	44
2 MÉTODOS	45
2.1 Considerações éticas	46
2.2 Desenho do estudo	46
2.3 População de referência	46

2.4 Critérios de inclusão.....	47
2.4.1 Grupo de estudo.....	47
2.4.2 Grupo controle.....	47
2.5 Critérios de não inclusão e de exclusão.....	47
2.6 Amostras.....	48
2.6.1 Origem das amostras do grupo de estudo.....	48
2.6.2 Origem das amostras do grupo controle.....	49
2.7 Identificação das ilhas CpG.....	49
2.8 Estudo de metilação.....	50
2.8.1 Desenho dos <i>primers</i>	50
2.8.2 Reação com Bissulfito de sódio.....	52
2.8.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	53
2.8.3.1 Desnaturação.....	53
2.8.3.2 Anelamento.....	53
2.8.3.3 Extensão da fita de DNA.....	54
2.8.3.4 Repetição dos ciclos.....	54
2.8.4 Determinação da Curva de <i>Melting</i>	56
2.8.5 Interpretação dos dados da curva de <i>melting</i>	58
2.9 Análise estatística.....	60
2.9.1 Comparação das médias de idade e níveis séricos de LDL entre os grupos.....	60
2.9.2 Conceitos.....	60
2.9.3 Construção da tabela de contingência.....	61
2.9.4 Determinação da prevalência em cada grupo.....	61
2.9.5 Cálculo da Razão de Prevalências (RP).....	62
2.9.6 Cálculo do Intervalo de Confiança (IC).....	62
2.9.7 Construção do teste de hipóteses.....	63
2.10 Fluxograma de trabalho.....	63
3 RESULTADOS.....	64
3.1 Descrição dos grupos.....	65
3.1.1 Grupo de estudos (HF+).....	65
3.1.2 Grupo controle (HF-).....	67
3.2 Análise os perfis de metilação segundo as categorias definidas.....	70

3.2.1 <i>Amplicon LDLR/Ilha-1</i>	70
3.2.1.1 Formação dos grupos.....	70
3.2.1.2 Padrões de metilação.....	70
3.2.2 <i>Amplicon LDLR/Ilha-2</i>	71
3.2.2.1 Formação dos grupos.....	71
3.2.2.2 Padrões de metilação.....	72
3.2.3 <i>Amplicon APOB</i>	74
3.2.3.1 Formação dos grupos.....	74
3.2.3.2 Padrões de metilação.....	74
3.2.4 <i>Amplicon PCSK-9</i>	75
3.2.4.1 Formação dos grupos.....	75
3.2.4.2 Padrões de metilação.....	75
3.3 Análise estatística.....	75
3.3.1 <i>Amplicon LDLR/Ilha-1</i>	75
3.3.1.1 Construção da tabela de contingência.....	75
3.3.1.2 Cálculo da RP.....	75
3.3.1.3 Cálculo do IC.....	76
3.3.2 <i>Amplicon LDLR/Ilha-2</i>	76
3.3.2.1 Construção da tabela de contingência.....	76
3.3.2.2 Cálculo da RP.....	77
3.3.2.3 Cálculo do IC.....	77
3.3.3 <i>Amplicon APOB</i>	78
3.3.3.1 Construção da tabela de contingência.....	78
3.3.3.2 Cálculo da RP.....	78
3.3.4 <i>Amplicon PCSK-9</i>	78
3.3.4.1 Construção da tabela de contingência.....	78
3.3.4.2 Cálculo da RP.....	79
4 DISCUSSÃO	80
4.1 Sobre a possível origem epigenética da HF.....	81
4.2 Sobre o desenho do estudo.....	83
4.3 Sobre a formação dos grupos e das amostras.....	85
4.4 Sobre os resultados encontrados.....	86
4.4.1 Análise de metilação.....	86

4.4.2 Análise estatística.....	87
4.5 Limitações e pontos positivos deste estudo.....	89
5 CONCLUSÕES.....	94
5.1 Conclusões parciais.....	95
5.2 Conclusão final.....	95
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
7 APÊNDICES.....	104
APÊNDICE A – Cronograma de execução dos trabalhos.....	105
APÊNDICE B – Financiamento do projeto.....	106
APÊNDICE C – Resumo do artigo submetido a publicação.....	107
8 ANEXOS.....	108
ANEXO A – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP.....	109
ANEXO B – Aprovação da Unidade de Pesquisa Clínica do HCRP.....	110
ANEXO C – Termo de doação das amostras do InCor para este Estudo.....	111
ANEXO D – Ficha do Aluno (Doutorado) emitida pelo sistema de Pós-Graduação da FMRP-USP.....	112
ANEXO E – Ficha do Aluno (Mestrado) emitida pelo sistema de Pós-Graduação da FMRP-USP.....	115

1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Colesterol

O corpo humano tem seu funcionamento baseado em reações bioquímicas intra e extracelulares. O equilíbrio destas reações depende da ingestão dietética de nutrientes quem contêm moléculas fundamentais, como água, vitaminas, minerais, carboidratos, proteínas e lipídeos.¹

Os lipídeos chamam a atenção por apresentarem propriedade hidrofóbica, sendo esta característica física, mais do que sua estrutura química, o que os define como grupo. Eles apresentam algumas particularidades em comum: são isolantes térmicos e elétricos e conferem alto valor energético na dieta.²

Os lipídeos podem ser classificados segundo sua estrutura em lipídeos simples (gorduras e ceras) e complexos (fosfolipídeos, glicolipídeos, entre outros); segundo sua função bioquímica em lipídeos precursores (ácidos graxos, esteroides, entre outros) e derivados (vitaminas lipossolúveis, hormônios, entre outros); segundo as ligações moleculares em saturados (ausência de duplas ligações na cadeia principal), monoinsaturados (presença de uma dupla ligação) e poli-insaturados (duas ou mais duplas ligações).²

Os esteroides são um grupo específico de lipídeos precursores. A característica comum a este grupo é a presença de um núcleo cíclico em comum, denominado ciclo-pentano peridrofenantreno, constituído por três anéis hexagonais e um pentagonal (Figura 1).²

Figura 1 - Estrutura molecular de 19 carbonos do ciclo-pentano peridrofenantreno.

Fonte: Adaptado de Botham et al, 2017.²

Seu núcleo assimétrico permite diversas formas de isomeria, o que, somado ao fato de permitir várias cadeias em sua composição, possibilita que seja precursor de inúmeras moléculas de importância fisiológica, como por exemplo os ácidos biliares, os hormônios sexuais, os hormônios adrenais e a vitamina D. Quando, neste núcleo, ocorre a ligação de uma molécula de hidroxila, sem nenhum grupamento carbonila ou carboxila, a estrutura passa a se comportar como álcool e é denominada esterol.²

O colesterol é o precursor de todos os esteróis.² Além desta importante função, que por si só já o define como substância indispensável à vida humana, o colesterol tem outro atributo tão ou mais nobre: é um importante componente estrutural da membrana plasmática de todas as células do corpo, onde se encontra dissolvido na bicamada lipídica.^{3,4} Neste local, o colesterol é o principal responsável pela regulação da permeabilidade da membrana aos constituintes hidrossolúveis dos líquidos corporais, além de moléculas como oxigênio, nitrogênio e dióxido de carbono. A proporção entre o colesterol e os fosfolípidios na membrana celular é o fator determinante de sua fluidez.^{5,6}

A estrutura química do colesterol é representada pelo núcleo esteroide, com presença de um radical hidroxila no carbono 3 mais uma estrutura de oito carbonos ligada ao carbono 17, totalizando 27 carbonos (Figura 2). Pode ocorrer de forma isolada ou esterificado, situação em que um ácido graxo de cadeia longa se liga à hidroxila, sendo esta a sua forma mais comum de transporte e armazenamento intracelular.^{2,7}

Figura 2 - Estrutura molecular do colesterol.

Fonte: Adaptado de Botham et al, 2017.²

O colesterol é uma molécula encontrada exclusivamente em animais, não existindo no reino vegetal. A fonte dietética para o metabolismo provém de alimentos de origem animal, como carnes, vísceras, ovos e derivados lácteos. Entretanto, a origem principal do colesterol utilizado no organismo humano é a produção endógena, pois todas as células nucleadas são capazes de sintetizá-lo, sendo o fígado responsável por 10% de todo o colesterol produzido. O corpo humano sintetiza cerca de 700mg por dia, o que corresponde a 60-80% do colesterol corporal total. Sua biossíntese é realizada a partir do Acetil-CoA, molécula da qual se originam todos os carbonos de sua estrutura.⁷⁻⁹

O colesterol intracelular se apresenta em duas estruturas químicas: o livre e o esterificado. O livre é utilizado para funções celulares, como integrar a estrutura da membrana celular e síntese de esteróis. O esterificado é a forma de armazenamento quando não está sendo utilizado.⁷

O aumento da concentração de colesterol livre no interior da célula acontece de três formas: 1) pela captação do colesterol circulante, 2) pela hidrólise do colesterol esterificado intracelular e 3) pela biossíntese celular.⁷

O colesterol chega à célula na forma de lipoproteínas circulantes, as quais possuem uma área proteica de superfície denominada Apolipoproteína B-100, que é reconhecida pela clatrina, uma região especializada na superfície celular onde se encontra o receptor de LDL. Após a ligação, o complexo receptor-lipoproteína é internalizado para o citossol e então transferido para os lisossomos, onde tanto o receptor de LDL quanto os ésteres de colesterol são hidrolisados. A seguir, o receptor de LDL é reciclado e retorna para a superfície celular, e o colesterol livre é transferido para o interior da célula. A reciclagem do receptor de LDL é regulada por um fator chamado pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (*PCSK-9*), que codifica a proteína NARC-1, a qual tem a função de direcionar o receptor de LDL reciclado para degradação, diminuindo sua expressão na superfície celular. A Figura 3 ilustra esses mecanismos.^{7,10-12}

Na medida em que o colesterol livre aumenta a sua concentração intracelular, tanto ele quanto seus metabólitos (em especial o mevalonato) ativam a transcrição da enzima responsável pela esterificação do colesterol e da Proteína de Ligação ao Elemento Regulador de Esteróis (SREBP). Esta última tem duas funções: 1) inibição de biossíntese intracelular no início da via metabólica, através da inibição da enzima

Hidroximetilglutaril-CoA Redutase (HMG-CoA Redutase), e 2) inibição da expressão do receptor de LDL, o que resulta em diminuição de sua captação externa.⁷

Figura 3 – Metabolismo intracelular do colesterol. 1) A LDL chega até a célula pela circulação e tem sua molécula Apo B-100 reconhecida pelo receptor de superfície celular na região da clatrina. 2) O conjunto LDL + receptor é incorporado. 3) O receptor de LDL é reciclado, ora retornando à superfície celular, ora sendo degradado, processo que é controlado pelo fator *PCSK-9*. 4) A molécula de LDL é degradada e suas frações (aminoácidos e colesterol livre) são reaproveitados para o metabolismo celular. 5) O lisossomo é degradado.

Fonte: Modificado de Brunzell & Faylor, 2010.¹²

O colesterol é transportado no plasma através das lipoproteínas, que são ultraestruturas capazes de acondicionar moléculas lipossolúveis em um meio hidrossolúvel. As lipoproteínas são classificadas de acordo com a sua respectiva densidade quando separadas por centrifugação, que em verdade corresponde à proporção entre proteínas e lipídeos presentes nas respectivas estruturas.⁷⁻⁹

A Figura 4 ilustra uma estrutura típica de uma lipoproteína de baixa densidade.¹²

Há quatro tipos de lipoproteínas:⁷⁻⁹

- VLDL = Lipoproteína de muito baixa densidade
- IDL = Lipoproteína de densidade intermediária

- LDL = Lipoproteína de baixa densidade
- HDL = Lipoproteína de alta densidade

Figura 4 – Estrutura típica de uma lipoproteína de baixa densidade.

Fonte: Modificado de Brunzell et al, 2010.¹²

Os lipídeos provenientes da dieta estão principalmente sob a forma de ésteres de colesterol ou triacilglicerol (TAG). Na luz intestinal, o colesterol esterificado é hidrolisado e absorvido pelos enterócitos, que voltam a esterificá-lo e, juntamente com o colesterol livre produzido por eles e com os TAG, ganham o sistema linfático sob a forma de quilomícrons. Esta partícula, que possui na sua estrutura duas importantes apolipoproteínas (Apo-B48 e Apo-E), é composta por pequenas quantidades de colesterol esterificado e fosfolípides, e quase 90% de TAG. Ao ganharem a circulação sistêmica via Ducto Torácico, os quilomícrons entram em contato com a Lipoproteína Lipase (LLP) presente nos capilares do tecido periférico, em especial tecido adiposo, músculo esquelético e coração. A função da LLP é hidrolisar os TAG, fornecendo ácidos graxos e glicerol para o tecido periférico. A ação da LLP é estimulada pela Apo-C2 e inibida pela Apo-C3. Após perderem a maior parte de TAG de seu core, os quilomícrons remanescentes são capturados pelo fígado, que aproveitará o colesterol ainda presente neles.^{6,7,10}

O transporte principal do colesterol e do TAG é realizado pelas lipoproteínas sintetizadas pelo fígado. A VLDL é construída a partir da Apo-B100, com a transferência de TAG e colesterol esterificado pela ação da Proteína de Transferência de Triglicérides Microsomal (MTP), resultando em um glóbulo que é liberado para a circulação.⁹ Esta lipoproteína é constituída por grande quantidade de TAG e concentrações moderadas de colesterol. Na circulação, a VLDL sofre ação de duas enzimas: 1) LLP, que remove os TAG para os tecidos; e 2) Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol (CEPT), responsável pelo transporte de colesterol esterificado da HDL para a VLDL em troca de TAG. Na medida em que a VLDL circula e vai perdendo TAG para os tecidos e para a HDL, sua concentração diminui e consequentemente a concentração de colesterol vai aumentando. Este processo continua até que a maior parte dos VLDL remanescentes são removidos pelo fígado.^{6,7,10}

Parte da VLDL dá origem à IDL, quando a maioria do TAG foi liberado. Esta lipoproteína é rapidamente captada pelos tecidos, por isso seu tempo de vida é extremamente curto e normalmente não é detectada no plasma.¹⁰

Das IDL surgem as LDL, a partir do momento em que a concentração de TAG é apenas residual. Além desta origem, parte das LDL circulantes são produzidas diretamente pelo fígado. Esta lipoproteína é composta por uma única apolipoproteína (Apo-B100), e tem alta concentração de colesterol e quantidade moderada de fosfolípides. É a lipoproteína de maior circulação no plasma, tendo como função principal o transporte de colesterol para todo o corpo. Durante a circulação, sofre influência da CEPT e, nos tecidos, é reconhecida pelo receptor de LDL, sendo interiorizada da forma já explicada anteriormente.^{7,10,11}

As HDL são lipoproteínas sintetizadas pelo fígado e lançadas à circulação, contendo as apolipoproteínas Apo-A1 e Apo-A2. Em comparação às outras lipoproteínas, têm dimensões pequenas e 50% de sua massa é representada por proteína, tendo assim alta densidade. Seu papel é o chamado transporte reverso do colesterol. A HDL capta o colesterol das outras lipoproteínas e do tecido periférico e o transporta até o fígado, onde é reconhecida pelos receptores SR-B1 e retirada da circulação.^{6,7}

A captação periférica de colesterol pela HDL é facilitada pelo complexo *ATP binding cassette 1* (ABC-A1). A seguir, o colesterol ganha o interior da HDL e encontra a Lecitina-Colesterol Acil-Transferase (LCAT), enzima responsável pela sua

esterificação, e que tem a Apo-A1 como cofator. Com a esterificação, é criado um gradiente de concentração de colesterol livre, potencializando maior captação deste a partir do tecido periférico. A HDL também sofre ação da CEPT, transferindo seu colesterol esterificado pela LCAT para as outras lipoproteínas, em troca de TAG. A HDL tem outras ações que contribuem para proteção cardiovascular, como remoção de LDL oxidado, estimulação de liberação de óxido nítrico e inibição de adesão de células inflamatórias no endotélio.^{10,11}

Todos esses mecanismos possibilitam que a célula mantenha um controle estreito da quantidade de colesterol livre no seu interior.⁷

1.2 Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença multifatorial resultante da agressão inflamatória endotelial crônica.¹⁰

Sua patogênese se inicia com uma agressão ao endotélio que pode ser derivada de tabagismo, hipertensão arterial, ou simplesmente aumento dos níveis circulantes de LDL. Seja qual for a injúria inicial, a patologia se desenvolve conforme as partículas de LDL penetram no espaço subendotelial, evento cuja intensidade é diretamente proporcional aos níveis circulantes da lipoproteína. De qualquer maneira, sabe-se que a aterosclerose tem relação direta com os níveis de LDL circulante, e que a inflamação ocorre somente quando a LDL é oxidada.^{10,13}

Uma vez interiorizada no espaço subendotelial, a LDL sofre oxidação e se torna imunogênica, estimulando o endotélio a produzir moléculas de adesão que atraem monócitos para este nicho, onde se diferenciam em macrófagos, que têm a capacidade de fagocitar a LDL oxidada de forma descontrolada até ficarem túrgidos, forma que à microscopia recebem o nome de células espumosas. Os macrófagos ativados secretam citocinas inflamatórias e enzimas proteolíticas capazes de degradarem o colágeno tecidual, e neste momento um processo inflamatório crônico já está estabelecido.^{10,13}

O processo inflamatório é perpetuado por Linfócitos T CD4+, macrófagos, células espumosas com elevada transcrição de metaloproteinases, osteoblastos, citocinas, selectinas, mieloperoxidases e moléculas de adesão vascular, com estímulo à proliferação de fibras de músculo liso na camada média arterial. Estas são recrutadas a migrarem para a camada íntima, onde produzem matriz extracelular,

mais citocinas e fatores de crescimento. Todos esses eventos vão convergir na formação da placa aterosclerótica, formada por núcleo lipídico e necrótico, com entorno de células inflamatórias e uma capa fibrótica externa originada da matriz extracelular, além de cristais de cálcio que tornam a placa rígida e contribuem para a perda de elasticidade do vaso. As placas ateroscleróticas podem ser instáveis ou estáveis, dependendo da composição predominante e de sua atividade inflamatória. Placas instáveis possuem predomínio de células inflamatórias e capa fibrótica delgada, enquanto placas estáveis têm predomínio de colágeno e pouca inflamação.^{10,13,14}

Quando a placa fibrótica se rompe, ocorre a exposição à circulação do core lipídico que estimula a formação de trombo local, evento conhecido como aterotrombose, responsável por diminuição ou até interrupção da circulação local. A isquemia tecidual resultante deste processo determina a manifestação clínica final da doença aterosclerótica, de acordo com a perda de função do órgão afetado.^{10,15}

A relação entre os níveis elevados de colesterol circulante e a doença aterosclerótica é bem estabelecida na literatura científica. As evidências advêm tanto de pesquisas em modelos animais quanto em ensaios clínicos com seres humanos. Vários ensaios clínicos já forneceram evidências irrefutáveis de que o tratamento de redução do colesterol é fator de proteção contra a aterosclerose.¹⁶

A doença aterosclerótica é uma preocupação em saúde pública, uma vez que o processo fisiopatológico é silencioso, e aproximadamente metade dos indivíduos que portam a morbidade apresenta como primeira manifestação clínica um evento coronariano agudo, com risco real de óbito. As duas maiores taxas de mortalidade em adultos no Brasil em 2017 foram doença isquêmica do coração e doença cerebrovascular (80,0% e 56,6% respectivamente), duas manifestações clínicas que são decorrentes da aterosclerose.^{10,17}

Vários estudos têm demonstrado que manifestações da doença estão presentes em populações jovens suficientemente expostas aos fatores de risco, em especial portadores de obesidade e doenças relacionadas a hipercolesterolemias severas. Lesões típicas de aterosclerose já foram identificadas em crianças, como aumento de espessura de camadas média-intimal das carótidas em ultrassonografias de crianças obesas.^{18,19}

1.3 Dislipidemias

1.3.1 Definição

Conceitua-se dislipidemias como as alterações dos níveis plasmáticos dos lipídeos, seja acima ou abaixo do considerado intervalo de normalidade. São classificadas de acordo com a alteração laboratorial ou com sua etiologia.²⁰

1.3.2 Classificação laboratorial

A classificação laboratorial leva em consideração a(s) fração(ões) alterada(s). A coleta de sangue para dosagem deve ser realizada sem uso de medicações que alterem os níveis séricos dos lipídeos circulantes há pelo menos quatro semanas, e com jejum de pelo menos 12 horas quando se deseja determinar a dosagem de triglicérides (TG) ou quando o resultado do LDL é calculado pela Fórmula de Friedewald.^{10,20}

Assim, temos a seguinte classificação laboratorial:^{10,20}

- Hipercolesterolemia isolada: elevação isolada do LDL acima de 160mg/dL;
- Hipertrigliceridemia isolada: elevação isolada dos TG acima de 150mg/dL, refletindo em aumento de concentração sérica ou volumétrico de VLDL, IDL e/ou quilomícrons;
- Hiperlipidemia mista: Valores aumentados de TG e de LDL;
- HDL baixo (em homens < 40mg/dL e em mulheres < 50mg/dL), que pode ser uma alteração isolada ou em associação com hipercolesterolemia e/ou hipertrigliceridemia.

A Tabela 1 mostra a classificação laboratorial adotada no Brasil.¹⁰

Tabela 1 – Valores de referência (em mg/dL) dos lípides séricos para adultos.

Variável	Ótimo	Desejável	Limítrofe	Alto	Muito alto
CT		< 200	200-239	≥ 240	
LDL	< 100	100-129	130-159	160-189	≥ 190
HDL		> 60			
TG		< 150	150-200	200-499	≥ 500
Colesterol não HDL	< 130	130-159		160-189	≥ 190

Fonte: Modificado de Xavier et al, 2013.¹⁰

A Fórmula de Friedewald é utilizada quando o maquinário do laboratório não executa a dosagem direta de LDL. Muitos estudos clínicos também a utilizam.¹⁰

O cálculo do LDL pela Fórmula de Friedewald é: $LDL = CT - (HDL + TG/5)$.⁹

Existe uma limitação na confiabilidade da fórmula, quando o TG dosado está acima de 400mg/dL. Nesses casos, o diagnóstico de hipercolesterolemia pode ser feito quando a dosagem do CT for maior que 200mg/dL.¹⁰

1.3.3 Classificação etiológica

As dislipidemias podem ser classificadas, segundo sua etiologia, em primárias ou secundárias.²⁰

As primárias são resultantes de causas genéticas, e podem se manifestar desde a primeira infância ou em função de algum gatilho ambiental ao longo da vida.²⁰

Compreendem as hiperlipidemias ou hipolipidemias:²⁰

- Hipercolesterolemia familiar;
- Hipercolesterolemia poligênica;
- Hipertrigliceridemia familiar;
- Hiperquilomicronemia familiar;
- Hiperlipidemia familiar combinada;
- Disbetalipoproteinemia familiar (aumento da IDL);
- Hipolipidemias primárias: diminuição do LDL, diminuição do HDL, Doença de Tangier.

As dislipidemias secundárias são associadas a doenças ou a fatores externos, como por exemplo:²⁰

- Obesidade;
- Diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2;
- Hipotireoidismo;
- Síndrome nefrótica;
- Insuficiência renal crônica;
- Hepatopatia colestática crônica;
- Hiper cortisolismo;
- Anorexia nervosa;
- Medicamentos (exemplos: diuréticos, anticoncepcionais, beta-bloqueadores, corticosteroides, anabolizantes, isotretinoína, ciclosporina, anti-retrovirais, etc);
- Etilismo crônico.

1.3.4 Dislipidemias em crianças

O conceito de dislipidemias na população pediátrica é semelhante ao de adultos, com a particularidade de que os níveis de lipídeos considerados normais até os 20 anos são diferentes. Fatores como aleitamento materno, nutrição ao longo da infância e alimentação da mãe enquanto gestante são fatores importantes para a proteção ou gatilhos que podem aumentar risco de dislipidemia nas crianças.^{11,21}

A Tabela 2 mostra os níveis considerados normais para a população pediátrica.¹¹

Tabela 2 – Valores de referência (em mg/dL) dos lípides séricos de 2-19 anos.

Variável	Desejável	Limítrofe	Elevado
CT	< 150	150-169	≥ 170
LDL	< 100	100-129	≥ 130
HDL	≥ 45		
TG	< 100	100-129	≥ 130

Fonte: Modificado de Santos et al, 2012.¹¹

Os valores da Tabela 2 devem ser considerados a partir de dois anos de idade, pois antes desta idade existe um aumento fisiológico nos níveis circulantes das lipoproteínas. Crianças em aleitamento materno exclusivo, que é rico em gorduras saturadas, apresentam maiores concentrações séricas de LDL, porém na idade adulta evoluem com maior competência na regulação lipídica fisiológica.²²

A preocupação com relação à dosagem de lipídeos na infância se deve ao fato de que correlações entre hipercolesterolemia e presença de lesões ateroscleróticas em necropsias já tenham sido estabelecidas. Além disso, a presença de dislipidemias e/ou doença arterial coronariana (DAC) em familiares é considerado um critério para investigação de hipercolesterolemia na criança também.^{11,22}

Recomenda-se que aos dez anos de idade todas as crianças devam ser submetidas a análise do perfil lipídico, se nunca tiverem feito anteriormente. Caso haja outros fatores de risco, a dosagem deve ser realizada no momento de sua identificação, como por exemplo nos casos de sobrepeso e obesidade infantil, diagnóstico que tem crescido na população pediátricas nos últimos anos.^{11,23}

1.4 Hipercolesterolemia Familiar (HF)

1.4.1 Definição

Dentre as causas primárias de hipercolesterolemia na faixa etária pediátrica, a mais frequente é a HF. Trata-se de uma doença genética do metabolismo das lipoproteínas, cuja herança é autossômica dominante, e que se caracteriza por níveis séricos muito elevados de LDL desde o nascimento, pela presença de sinais clínicos característicos e risco aumentado de DAC prematura.¹¹

1.4.2 Patogênese

O estudo da patogênese da HF foi possibilitado pelo Projeto Genoma Humano, que trouxe várias informações novas acerca da associação entre o perfil lipídico e os genes responsáveis pela síntese de enzimas envolvidas em determinadas rotas metabólicas. Os níveis séricos de LDL, HDL e TG de cada indivíduo são determinados por fatores tanto genéticos quanto epigenéticos, e estima-se que a sua

taxa de herdabilidade aproximada seja em torno de 60 a 70%, o que significa que a influência dos fatores externos seja cerca de 30 a 40%.²⁴

A HF é uma das doenças monogênicas herdáveis mais comuns na população geral.¹¹

A relação direta entre os níveis circulantes de colesterol e mortalidade é bem estabelecido na literatura científica. Tal aumento de risco é detectado em todas as idades, independentemente de sexo ou etnia.^{25,26}

Na década de 1980, resultados do Estudo Framingham demonstraram um aumento de mortalidade geral em 5% para cada 10mg/dL de incremento no CT, em adultos com menos de 50 anos.²⁵

Em 2019, um estudo de coorte com mais de 12 milhões de sujeitos demonstrou que em adultos com dosagem de CT maior que 200mg/dL, cada incremento de 39mg/dL no CT resulta em 7% de aumento na mortalidade geral. Estratificando por idade, o incremento de 39mg/dL no CT resulta nos seguintes aumentos de mortalidade, respectivamente (em indivíduos com CT inicial acima de 200mg/dL):²⁶

- 18-34 anos: aumento na mortalidade em 14%;
- 35-44 anos: aumento na mortalidade em 13%;
- 45-54 anos: aumento na mortalidade em 8%;
- 55-64 anos: aumento na mortalidade em 7%;
- 65-74 anos: aumento na mortalidade em 6%;
- 75-99 anos: aumento na mortalidade em 3%.

Por outro lado, indivíduos com CT total entre 50-199mg/dL apresentam redução de risco de mortalidade com o aumento dos níveis de CT, o que demonstra a existência de uma faixa ótima de manutenção dos lipídeos séricos.²⁶

O conhecimento genético acerca da HF é bem estabelecido, e foi possibilitado após descobertas do metabolismo da LDL, durante a década de 1980. Utilizando indivíduos com diagnóstico de HF, foi possível demonstrar que os níveis séricos circulantes da LDL guardam relação inversamente proporcional à densidade de receptores celulares disponíveis, podendo chegar a valores acima de 600mg/dL em homozigotos. A Figura 5 ilustra esta relação.²⁷

Figura 5 – Relação entre densidade relativa de receptores de LDL e níveis séricos de LDL. A área sob a curva vermelha representa a relação entre indivíduos normais na população. As setas azuis demonstram diminuição dos receptores e aumento de LDL em indivíduos com HF heterozigótica e a seta verde indivíduos com densidade quase nula de receptores e aumento severo de LDL em homozigotos.

Fonte: Modificado de Brown & Goldstein, 1984.²⁷

Estudos posteriores demonstraram que a alteração no metabolismo da LDL relacionada à HF está relacionada a defeitos na expressão de pelo menos um de três genes que codificam proteínas com ações diretas no metabolismo da LDL, os chamados genes canônicos da HF. São eles:^{11,28}

- Gene *LDLR*: localizado no braço curto do cromossomo 19, codifica o receptor celular de LDL; é sede de mais de 1.600 mutações descritas e responsável pela maioria das alterações que levam a HF;
- Gene *APOB*: codifica a apolipoproteína B-100 que, quando defeituosa, expressa menor afinidade pelo receptor de LDL, contribuindo para resistência na sua entrada nas células e aumento dos seus níveis circulantes;
- Gene *PCSK-9*: codifica a proteína NARC-1, responsável pelo catabolismo do receptor de LDL que, quando sofre mutação com ganho de função, resulta em destruição acelerada do receptor, e consequente subutilização de LDL pela célula.

Para cada defeito genético, uma proteína será codificada de forma anômala, levando a prejuízo na regulação metabólica do colesterol, o que resulta no aumento dos seus níveis circulantes. A Figura 6 ilustra as etapas metabólicas defeituosas resultantes das alterações nos três genes.^{11,28}

Figura 6 – Alterações metabólicas da HF. 1) A Apo-B100 defeituosa do glóbulo de LDL impede o acoplamento com o receptor de LDL. 2) O receptor de LDL defeituoso impede o acoplamento da Apo-B100 da LDL. 3) Uma mutação da *PCSK-9* com ganho de função diminui sobremaneira a expressão do receptor LDL na superfície celular.

Fonte: Modificado de Santos et al, 2012.¹¹

A penetrância da alteração genética se aproxima de 100%, ou seja, basta que um único alelo esteja alterado para que a manifestação fenotípica seja expressa. Nesses indivíduos, os níveis circulantes de LDL estarão elevados desde o nascimento e ao longo de toda a sua vida, e transmitirão o defeito genético a metade de seus descendentes de primeiro grau.¹¹

Com um alelo defeituoso, o metabolismo passa a trabalhar apenas com metade de sua capacidade funcional de incorporação do colesterol nas células do corpo, e quando ambos alelos estão defeituosos, o aproveitamento orgânico do colesterol é mínimo.^{11,29}

A Figura 7 resume a patogênese da HF.

Figura 7 – Patogênese da HF.

Fonte: Modificado de Nordestgaard et al, 2013.²⁸

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, foi possível a verificação de alterações estruturais nos três genes relacionados, sendo que em 60-80% dos casos a detecção de pelo menos um desses genes é demonstrada. Entretanto, em 20-40% dos pacientes com critérios clínicos de HF a pesquisa de alterações genéticas é negativa. A Tabela 3 resume essas informações.²⁸

Tabela 3 – Genes defeituosos na HF.

Gene	Proporção de HF atribuída ao gene	Método descrito
<i>LDLR</i>	60-80%	Sequenciamento, deleção e duplicação
<i>APOB</i>	1-5%	Sequenciamento, deleção, duplicação, análise dirigida para variantes patogênicas
<i>PCSK-9</i>	0-3%	Sequenciamento, deleção, duplicação e análise dirigida para variantes patogênicas
Desconhecido	20-40%	

Fonte: Modificado de Youngblom et al, 2014.²⁸

1.4.3 Epidemiologia

Estima-se que na população branca as prevalências de HF heterozigótica e homozigótica sejam, respectivamente, em torno de 1:500 e 1:1.000.000 de indivíduos. Algumas populações têm maior prevalência, supostamente devido a um suposto efeito fundador, como sul-africanos (1:100), libaneses (1:170) e franco-canadenses (1:270).¹¹

Por conta da raridade da forma homozigótica, e também pelo padrão dominante da herança, convencionalmente a prevalência populacional da HF é considerada a mesma da heterozigótica, ou seja, 1:500. A partir desta frequência, é possível comparar em diversos países a quantidade teórica de pessoas na população portadoras de HF contra a quantidade efetivamente diagnosticada.²⁹

A Figura 8 demonstra o *gap* entre o a quantidade teórica de pessoas com HF versus a quantidade de pessoas efetivamente diagnosticadas. Nota-se que, no Brasil, menos de 1% das pessoas que teoricamente portariam a HF estão de fato identificadas.²⁹

A doença é subdiagnosticada em vários países, e não somente no Brasil. O fato de ser uma entidade com curso silencioso e insidioso, levando muitas vezes décadas para que uma primeira manifestação clínica aconteça, são fatores que levam à dificuldade no diagnóstico precoce. Uma dosagem de perfil lipídico seria suficiente para que o curso clínico da doença fosse amenizado.^{11,30}

Figura 8 – Prevalência esperada de HF em alguns países, comparativamente com a prevalência diagnosticada.

Fonte: Nordestgaard et al, 2013.²⁹

Apesar de não haver estudo desenhado especificamente para determinação de prevalência de HF na população pediátrica, infere-se que seja a mesma para a população geral, pelo fato de ser uma doença genética e congênita. A estimativa é que haja 35 milhões de pacientes com HF no mundo, dos quais 20-25% sejam crianças e adolescentes. Estatisticamente, nasce 1 bebê com HF por minuto em algum lugar do mundo.³¹

1.4.4 Diagnóstico

O quadro clínico das dislipidemias em geral é silencioso, não raras vezes, a primeira manifestação é um evento coronariano agudo.¹⁰

Entretanto, como na HF os níveis circulantes de LDL são extremamente elevados, os achados de exame físico podem aparecer precocemente na vida. Tais achados são xantomas tendíneos (tumorações esféricas em superfície de tendões, em especial o Tendão de Aquiles), xantelasma palpebrais (manchas amarelas nas pálpebras superiores) e arco corneano (halo hipocrômico presente na extremidade externa da íris). Tais achados resultam de acúmulo de colesterol nesses sítios e, embora não sejam patognomônicos da HF, sugerem-na fortemente quando presentes, em especial quando presentes antes dos 45 anos de idade.¹¹

Os portadores de HF, quando não diagnosticados em tempo hábil, evoluem com alto risco de desenvolvimento de DAC precoce, tipicamente na sexta década de

vida no caso dos heterozigotos, e no final da segunda década no caso dos homozigotos. Sem tratamento, 50% dos homens e 12% das mulheres com HF desenvolverão DAC antes dos 50 anos, e 85% dos homens e 50% das mulheres terão algum evento cardiovascular antes de 65 anos.^{29,30}

O diagnóstico laboratorial da HF é iniciado pela determinação do perfil lipídico. Os indivíduos heterozigotos tendem a desenvolver níveis séricos de LDL acima de 300mg/dL, enquanto os homozigotos podem superar 1.000mg/dL. Em pacientes menores de 20 anos com LDL sérico maior que 190mg/dL, a probabilidade da existência de HF chega a 80%.^{10,29,30}

Os critérios diagnósticos para HF definidos para o Brasil contemplam parâmetros clínicos e laboratoriais, definindo o “fenótipo HF”. Considera-se um ponto de partida para o diagnóstico, uma dosagem de LDL acima de 190mg/dL. Os critérios diagnósticos, elaborados pela *Dutch Lipid Clinic Network* (DCLN), envolvem parâmetros clínicos e análise de mutação de ácido desoxirribonucleico (DNA), e estão descritos na Tabela 4. Em geral, a presença do fenótipo HF é relacionada a uma alteração em pelo menos um dos três genes acima descritos, sendo o *LDLR* o gene mais frequentemente afetado.¹¹

Acredita-se que a HF seja subdiagnosticada, uma vez que as notificações disponíveis em diversos países mostram números bastante inferiores dos estimados, considerando a prevalência teórica de 1:500 (Figura 7). Além disso, a alta incidência de DAC precoce (homens abaixo de 55 anos e mulheres abaixo de 60 anos), também corrobora com tal suspeita.^{11,30}

Os rastreamentos populacionais foram uma estratégia bastante eficiente para a busca e detecção precoce de pacientes de risco. Há duas estratégias que podem ser utilizadas: rastreamento universal e rastreamento em cascata.^{11,30}

O rastreamento universal prevê que todas as crianças acima de 10 anos de idade deverão ter seu perfil lipídico coletado, independentemente de história clínica ou antecedentes familiares. Entretanto, o exame deverá ser realizado aos dois anos de idade nas seguintes situações: a) quando houver história familiar de doença aterosclerótica prematura (antes dos 55 anos em homens ou antes dos 65 anos em mulheres) e/ou de dislipidemia; b) se a própria criança apresentar xantomas ou arco corneano, fatores de risco (hipertensão arterial, diabetes mellitus, obesidade) ou doença aterosclerótica.¹¹

Tabela 4 – Critérios diagnósticos da HF (Segundo critérios da *Dutch Lipid Clinic Network*, DCLN).¹¹

Parâmetro	Pontos
História familiar	
Parente de 1º grau portador de doença vascular / coronária prematura (homem < 55 anos, mulher < 60 anos), ou	1
Parente adulto de 1º ou 2º grau com CT > 290mg/dL	
Parente de 1º grau portador de xantoma tendinoso e/ou arco corneano, ou	2
Parente de 1º grau < 16 anos com CT > 260mg/dL	
História clínica	
Paciente portador de DAC prematura (homem < 55 anos, mulher < 60 anos)	2
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 sérico de LDL	
> 330mg/dL	8
250-329mg/dL	5
190-249mg/dL	3
155-189mg/dl	1
Análise do DNA	
Presença de mutação funcional dos genes <i>LDLR</i> , <i>APOB</i> ou <i>PCSK-9</i>	8
Diagnóstico de HF	
Certeza se pontuação	> 8
Provável se pontuação	6-8
Possível se pontuação	3-5

Fonte: Santos et al (2012).¹¹

O rastreamento em cascata consiste na determinação do perfil lipídico em todos os parentes de primeiro grau (pai, mãe e irmãos) de pacientes diagnosticados como HF. Justifica-se esta técnica pelo fato de a probabilidade de identificação de outros portadores da doença ser de 50% em familiares de primeiro grau, 25% de segundo grau e 12,5% de terceiro grau.^{11,30}

Para a estratificação de risco cardiovascular, o escore de Framingham, comumente utilizado para este fim, não deve ser usado para pacientes portadores de HF, pois subestima o risco real. O *Simon Broome Register Group* propõe que sejam considerados pacientes de alto risco cardiovascular aqueles que tenham qualquer uma das seguintes características:¹¹

- DAC ou doença cardiovascular estabelecida;

- Tabagistas;
- Portadores de *diabetes mellitus* (DM);
- História familiar de DAC prematura (parentes de primeiro ou segundo grau com manifestação de DAC antes de 45 anos no sexo masculino e 55 anos no sexo feminino).

Mesmo sem os fatores de risco acima, o paciente portador de HF deve ser considerado paciente de alto risco em longo prazo.¹¹

1.5 Epigenética

1.5.1 Conceito

Epigenética é o estudo das mudanças na expressão gênica que ocorrem na ausência de alterações na estrutura do DNA. Um determinado gene pode ter sua expressão alterada quando um evento bioquímico ocorre de forma a modificar o fenômeno da transcrição, mas sem mudança na sequência de bases nitrogenadas, resultando em inibição da sua expressão. Os eventos bioquímicos epigenéticos mais conhecidos são a metilação do DNA, modificações de histonas e ações dos micro RNAs (micro-RNAs) não codificantes.³²

1.5.2 Histórico

A citação do termo “Epigenética” foi originada pelo pesquisador britânico Conrad Waddington (1905-1975), que o definiu como “interação causal entre genes e ambiente na determinação fenotípica”. No ano de 1956, um artigo seu foi publicado na revista *Evolution*, no qual Waddington descrevia que características fenotípicas adquiridas pela interação com o ambiente poderiam ser transmitidas a gerações futuras.³³

A hereditariedade de características biológicas se dá através do DNA. Logo, pela demonstração de Waddington, as influências ambiental e nutricional teriam um impacto bioquímico na leitura do DNA, e de forma que esta modificação seria passível de transmissão hereditária.^{33,34}

Desde então, os conhecimentos científicos sobre o tema Epigenética têm sido crescentes. Os estudos sobre os efeitos da carência extrema de comida que

³³Francis R. Epigenetics: the ultimate mystery of inheritance. New York: Norton & Company, 2011.

acometeu a população rural da Holanda ocidental sob ocupação alemã durante os últimos anos da Segunda Guerra Mundial, descrita por Francis (2011) *apud* Silva & Duarte, são um bom exemplo. Os descendentes das mulheres que estavam gestantes na época da fome holandesa constituíram um grupo de estudo observacional, e com o tempo foi notado que aos 50 anos de idade os descendentes destas mulheres apresentavam maior risco de desenvolverem doenças cardíacas, hipertensão arterial e DM2. As descendentes mulheres especificamente apresentavam maior risco de câncer de mama, doenças pulmonares e renais.³⁵

Na década de 1990, o epidemiologista britânico David Barker publicou suas observações de que fetos que experimentavam um ambiente de subnutrição intrauterino eram mais propensos a desenvolver doença coronariana quando adultos, supostamente explicada por fenômenos epigenéticos. Barker resgatara os conceitos de Waddington, sob uma nova óptica.³⁶

1.5.3 Mecanismos

O funcionamento do metabolismo humano resulta do somatório do potencial genético com as interações ambientais. Desde o ambiente intrauterino, o ser humano está susceptível à influência externa, de forma que estímulos nutricionais, ambientais, emocionais e físicos da gestante são capazes de interagir com o DNA em formação a por meio dos eventos epigenéticos.³²

Particularmente quando esses estímulos, em especial nutricionais, ocorrem no período sensível dos eventos epigenéticos, os impactos são mais consistentes e duradouros. Tal período sensível, também chamado de janela de oportunidades, compreende o período do momento da concepção até o final do segundo ano de vida, os chamados primeiros 1.000 dias de vida.^{37,38}

Em humanos, os fenômenos epigenéticos ocorrem em regiões específicas do DNA, onde sequências de dinucleotídeos citosina-guanina estão presentes, segmentos denominados Ilhas CpG. Tais ilhas estão tipicamente inseridas nas regiões promotora dos genes, ou próximas a elas, que são os locais onde a transcrição gênica é iniciada. A citosina metilada faz com que o gene seja impedido de interagir com as proteínas associadas à transcrição, resultando assim no silenciamento da expressão daquele gene (Figura 9).³²

Figura 9 – Metilação da citosina.

Fonte: Modificado de Fontelles et al, 2014.³²

Vários mecanismos epigenéticos têm sido descritos. Alguns exemplos são: metilação da base citosina em Ilhas CpG, modificações nas histonas resultando no impedimento de sua abertura plena (metilação, acetilação, fosforilação e ubiquitinação), ações de micro-RNA não codificantes e compactação de cromatina.^{32,39-43}

Uma vez que o DNA foi submetido a um padrão epigenético durante o período sensível, este padrão tende a permanecer por toda a vida do indivíduo, sendo inclusive passível de ser transmitido para gerações futuras, por repetição do padrão durante o ciclo celular.⁴⁴

Os principais mecanismos epigenéticos são a metilação de DNA, a metilação e a acetilação de histonas, que serão detalhados a seguir.³²

1.5.3.1 Metilação do DNA

É o mecanismo mais estudado e provavelmente o mais frequente. A ligação de um radical metil (CH_3) em uma base nitrogenada Citosina que antecede uma Guanina resulta em uma modificação de cargas iônicas que afastam os fatores de transcrição do DNA, de forma que a leitura do gene não é realizada, e dizemos que esse gene é “silenciado”. A Figura 10 ilustra este processo.³²

1.5.3.2 Metilação e acetilação de histonas

As histonas são proteínas cilíndricas onde o DNA se enovela, permanecendo em estado compactado quando não está sendo transcrito. O estado de enovelamento

do DNA na histona é regulado por pequenas modificações bioquímicas em sua estrutura, sendo os mais conhecidos a metilação e a acetilação.³²

Para que o DNA seja transcrito, a dupla fita localizada no núcleo celular deve se desenrolar da histona, ficando então exposta ao contato com os fatores de transcrição. O fenômeno de transcrição irá originar o RNA mensageiro, que migra para o citoplasma, onde interagirá com o RNA de transferência, responsável por selecionar e transportar os aminoácidos correspondentes à sequência de bases nitrogenadas do RNA mensageiro.^{32,45}

Figura 10 – Influência da metilação de DNA na transcrição gênica. A) O DNA não metilado é normalmente transcrito. B) A Citosina metilada impede a transcrição do gene.

Fonte: Modificado de Fontelles et al, 2014.³²

Entretanto, dependendo do estado de metilação ou acetilação da histona, o DNA enovelado torna-se incapaz de se desenrolar da estrutura, por conta da força das ligações bioquímicas que estão interagindo. Dessa forma, o DNA não é expresso e o gene é silenciado.^{32,46}

A acetilação e a metilação das histonas funcionam como contra-regulares entre si. A transcrição do DNA é permitida quando a histona está em estado de maior acetilação e menor metilação, e vice-versa.^{32,46}

A Figura 11 ilustra as relações entre os estados de metilação e acetilação e a viabilização da transcrição do DNA.⁴⁶

Figura 11 – Relações entre estados de metilação da acetilação de histonas na transcrição gênica. A) A histona está em estado intermediário, o desfecho de transcrição dependerá de qual das duas enzimas estará ativa neste momento. B) A histona acetilada e não metilada está pronta para permitir o desnovelamento do DNA, que será transcrito. C) A histona não acetilada sofrerá metilação, estado que impede o desnovelamento do DNA que, portanto, não será transcrito. HDAC: Histona deacetilase. HAT: Histona acetil transferase.

Fonte: Adaptado de Eberharter & Becker, 2002.⁴⁶

1.5.4 Epigenética e HF

Vários estudos demonstraram associação entre fenômenos epigenéticos e controle metabólico fisiológico, como a homeostase dos lipídios e a progressão de doenças como DM2, esteatohepatite não alcoólica, obesidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares, para citar alguns exemplos.^{40,47,48}

Há estudos em população pediátrica relacionando mecanismos epigenéticos com dislipidemias.^{39,42}

Um estudo transversal conduzido em 2013 em Roma, Itália, com 88 crianças obesas testou a correlação entre padrão de metilação do gene IGF-2 e dislipidemia. Os autores observaram que as crianças que apresentavam padrão de hipometilação de IGF-2 (menos de 10% de DNAs metilados na ilha CpG) também tinham aumento de TG e de relação TG/HDL.³⁹

Um outro estudo transversal foi conduzido em 2014 em Rotterdam, Holanda, com 120 crianças de 17 meses de idade. Os autores observaram que os pacientes com menores proporções de metilação nos genes de TNF- α e de leptina também apresentavam maiores variações de HDL, e concluíram que os resultados mostrariam uma possível correlação entre baixas porcentagens de metilação desses dois genes com controle dos níveis de HDL.⁴²

Não existe ainda consenso na literatura sobre a origem da HF nos pacientes cujo estudo genético-molecular foi negativo. A origem poligênica já foi aventada como possível gênese. Entretanto, essa conclusão é meramente especulativa, uma vez que não se encontram estudos desenhados especificamente para este fim.⁴⁹

De qualquer forma, cerca de 1/3 dos portadores de HF diagnosticados pelos critérios da DCLN não têm diagnóstico genético confirmado.²⁸

1.6 Justificativa

Segundo o último censo demográfico brasileiro, realizado em 2010 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, a população brasileira somava 190.755.799 habitantes, dos quais 62.923.633 tinham menos de 20 anos de idade.⁵⁰

Dada a frequência teórica de HF na população de 1:500, a expectativa é que no Brasil haja mais de 380 mil pessoas portadoras de HF, das quais aproximadamente 125 mil na faixa etária pediátrica. Considerando de 20-40% deste montante não teriam alterações genético-moleculares, o estudo de outras gêneses para a doença tem potencial de beneficiar cerca de 126 mil brasileiros.

Justifica-se este estudo pela relevância clínica da HF e pela ausência de estudos desenhados especificamente para responder à questão central deste trabalho: existiria uma associação entre metilação em pelo menos um dos genes *LDLR*, *APOB* e/ou *PCSK-9* e a presença de fenótipo HF?

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo primário

- Verificar se existe associação entre o perfil de metilação de pelo menos um dos genes *LDLR*, *APOB* e/ou *PCSK-9* com o fenótipo HF nos pacientes em que o estudo de alterações moleculares nestes genes é negativo.

1.7.2 Objetivos secundários

- Determinar o estado de metilação dos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK-9* em amostras de pacientes com diagnóstico clínico de HF segundo os critérios da DCLN e sem alterações moleculares nestes genes.
- Determinar o estado de metilação dos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK-9* em amostras de pacientes sem dislipidemia.
- Comparar as duas proporções com ferramentas estatísticas, para verificar a presença de associação entre a variável independente (DNA metilado) e a dependente (fenótipo HF).

2. Métodos

2 MÉTODOS

2.1 Considerações éticas

O presente estudo foi conduzido seguindo os princípios éticos que regem a pesquisa com seres humanos contidos na Declaração de Helsinque e os termos descritos pela Portaria 196/96 complementados pela Resolução 304 de 09/08/2000 do Conselho Nacional de Saúde.

O estudo é parte da linha de pesquisa sobre dislipidemias da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

O projeto obteve aprovações do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP), conforme Processo HCRP nº 8077/2016 (Anexo A), e da Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) do HCRP, conforme documento de 09/03/2016 (Anexo B).

As amostras utilizadas para o grupo de estudo foram cedidas pelo Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo C).

2.2 Desenho do estudo

Para testar a hipótese levantada, adotamos o desenho analítico transversal, com a presença de um grupo de estudo e um grupo controle.⁵¹

2.3 População de referência

O estudo parte da população de referência considerada como todas as pessoas que possuem diagnóstico clínico de HF (“provável” ou “certeza”, segundo os Critérios da DCLN)¹¹ e não têm alteração genético-molecular em nenhum dos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK-9*.

2.4 Critérios de inclusão

2.4.1 Grupo de estudo

Para o grupo de estudo, os critérios mínimos de inclusão estabelecidos foram:

- LDL > 190mg/dL em dosagem com jejum de pelo menos 12 horas;
- Escore pelos Critérios da DCLN maior ou igual a 6;¹¹
- Ausência de alterações genético-moleculares nos três genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK-9*.

2.4.2 Grupo controle

Para o grupo controle, os critérios mínimos de inclusão foram:

- Idade mínima de dois anos completos;
- Pelo menos duas dosagens de LDL sérico em jejum de 12 horas menores que 100mg/dL;
- Ausência de histórico de uso de medicamentos que alterem níveis séricos de colesterol;
- Ausência de atividade de doenças congênitas ou adquiridas que cursem com alteração nos níveis séricos de colesterol no momento da coleta.

2.5 Critérios de não inclusão e de exclusão

Não foram incluídas amostras de pacientes nas seguintes situações:

- Escore diagnóstico de HF menor que 6, segundo critérios da DCLN;
- Quantidade insuficiente de material genético das amostras;
- Amostras com estudo de mutação positivo;
- Amostras que não foram submetidas a estudo de mutação;
- Presença de doenças ou uso de medicamentos que interferissem nos níveis séricos de colesterol (para hipotireoidismo foi considerado TSH > 5,0mUI/L.);
- Dados clínicos não disponíveis ou insuficientes.

Após submetidas ao ensaio de metilação, foram excluídas amostras que apresentaram anômalas. As anomalias encontradas foram padrão de dupla curva de metilação e percentuais de metilação menores que zero ou maiores que 120%.

2.6 Amostras

2.6.1 Origem das amostras do grupo de estudo

As amostras dos pacientes do grupo de estudo foram provenientes do biorrepositório do InCor. A instituição abriga o Programa Hipercol-Brasil, sediado na cidade de São Paulo e financiado pelo Ministério da Saúde. O objetivo do programa é identificar e orientar indivíduos com HF por sistema de rastreamento genético em cascata.⁵²

Qualquer pessoa com dosagem de LDL acima de 210mg/dL e que tenha um parente com LDL maior que 190mg/dL é elegível para o programa. A estratégia utilizada pela equipe é a dosagem de perfil lipídico de outras pessoas da família e realização de teste genético visando identificação de alterações estruturais nos genes canônicos.⁵²

Um total de 299 amostras foram cedidas do InCor para este estudo. Todas elas apresentavam dosagem de LDL acima de 190mg/dL e haviam sido previamente testadas negativas para presença de alterações estruturais nos genes canônicos. Juntamente com as amostras, foi fornecida uma planilha descritiva com dados clínicos, antropométricos e resultados de exames dos pacientes com identificação de cada amostra. Esse material possibilitou a triagem de quais amostras seriam incluídas no estudo, selecionadas a partir dos critérios de inclusão previamente estabelecidos.

Todas as amostras foram de pacientes com dosagem de LDL acima de 190mg/dL e com outros parâmetros que somassem score igual ou superior a 6 nos Critérios da DCLN. Todas as amostras já haviam sido testadas para análise de alterações genético-moleculares nos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK-9*, com resultados negativos para todos os três.

2.6.2 Origem das amostras do grupo controle

As amostras que compuseram o grupo controle foram provenientes do biorrepositório sob a guarda do Departamento de Puericultura e Pediatria (DPP) da FMRP-USP. Um total de 60 amostras foram disponibilizadas para este estudo.

Tais amostras eram provenientes de diversos pacientes de várias divisões do Departamento, e que em virtude de outras pesquisas em andamento já haviam sido submetidas a extração de DNA. Todos os pacientes tinham prontuário no HCFMRP-USP, o que possibilitou a consulta de dados fundamentais para a seleção das amostras que entrariam no estudo, de acordo com os critérios de inclusão previamente estabelecidos.

Como as amostras já tinham DNA extraído, estavam já prontas para a fase de preparação para os testes de metilação.

2.7 Identificação de Ilhas CpG

Através da ferramenta digital *Genome Browser Gateway* da Universidade da Califórnia em Santa Cruz, foi possível identificar no genoma humano a existência de Ilhas CpG nas respectivas regiões promotoras do gene *LDLR* (duas ilhas), *APOB* (uma ilha) e *PCSK-9* (uma ilha). A Figura 12 ilustra a localização das quatro ilhas identificadas.⁵³

Figura 12 – Identificação de ilhas CpG em regiões promotoras dos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK-9*. A) Presença de 2 ilhas CpG no gene *LDLR*, uma no íntron 1 e outra no éxon 4. B) Ilha CpG no gene *APOB*. C) Ilha CpG no gene *PCSK-9*.

Fonte: *Genome Browser Gateway*, da Universidade da Califórnia em Santa Cruz, Estados Unidos da América.⁵³

2.8 Estudo de metilação

No presente estudo, a determinação do estado de metilação dos DNAs foi realizada pela técnica *Methylation Sensitive High Resolution Melting* (MS-HRM).

A técnica se desenvolve em alguns passos, que são detalhados a seguir.

2.8.1 Desenho dos primers

Um *primer* é uma curta sequência pré-definida de nucleotídeos que funciona como o ponto de partida para a síntese de DNA, através da ação da enzima DNA

Polimerase. Em estudos laboratoriais com sequenciamento de DNA, o *primer* tem a importância de delimitar o fragmento de interesse.⁵⁴

Os *primers* utilizados neste estudo foram desenhados a partir da descrição de Laurie e George (2009) para o gene *LDLR*, e do programa *Methyl Primer Express* (ThermoFisher®) para os genes *APOB* e *PSCK-9*.⁵⁵

Para cada ilha CpG de interesse, dois *primers* foram desenhados, cada qual delimitando uma extremidade do fragmento. Chamados o *primer* referente ao início do fragmento de *forward* (F) e ao término do fragmento de *reverse* (R).⁵⁶⁻⁵⁸

A Figura 13 ilustra a posição de cada *primer* na dupla fita de DNA.

Figura 13 – Como os *primers* são desenhados. A) o fragmento de interesse é determinado ao longo da fita de DNA. B) Em um processo que envolve desnaturação da dupla fita de DNA, os *primers forward* e *reverse* são desenhados, determinando respectivamente o início e o término do fragmento de interesse.

Fonte: Modificado de Khan Academy, 2020.⁵⁸

A Tabela 5 mostra os desenhos dos *primers* utilizados neste estudo.

Tabela 5 – Desenhos dos *primers* utilizados neste estudo.

Ilha CpG	Desenho do <i>primer</i>
<i>LDLR</i> , Ilha 1, F	GTT ATT TTT TTT GTT TAA TGT GAG G
<i>LDLR</i> , Ilha 1, R	ACA AAA TAA AAC TCA AAC TTC C
<i>LDLR</i> , Ilha 2, F	TTT GTA TTT TTT AGT TGT GGG TT
<i>LDLR</i> , Ilha 2, R	CAA AAA CTA CTA TCC CCT TAA AAC AC
<i>PCSK-9</i> , F	AGT TTG GAG GAG TGA GTT AGG TAG T
<i>PCSK-9</i> , R	CAA AAA CTA AAA TTC AAA AAC AAA AC
<i>APOB</i> , F	TTG TAG TTT GGG TTT TTT ATA AAT GG
<i>APOB</i> , R	CCA ACA ACA ACA ACA ACA AC

Fonte: primers desenhados pela equipe do Laboratório de Biologia Molecular (LBM) do HCFMRP-USP.

2.8.2 Reação com bissulfito de sódio

O princípio da técnica MS-HRM se baseia na identificação de diferentes temperaturas de abertura de fitas de DNA.⁵⁹

A reação com bissulfito de sódio possibilita a diferenciação dessas temperaturas entre as fitas de DNA metilado e não metilado.⁶⁰

Neste estudo, procedemos à modificação das amostras de 2µg de DNA genômico com bissulfito de sódio utilizando o kit *EpiTect Bissulfite* (Qiagen®), seguindo as instruções do fabricante. Os passos sequenciais da reação são:⁶⁰

1. Sulfonação: adição do bissulfito na ligação 5-6 da citosina;
2. Deaminação por hidrólise: as bases citosina-bissulfito não metiladas sofrem hidrólise e são convertidas em uracila-bissulfito, enquanto as bases citosina metiladas são refratárias à hidrólise e permanecem como citosina;
3. Dessulfonação alcalina: tratamento do DNA em meio alcalino para remoção o grupo sulfonato.
4. Final do processo: as bases citosina não metiladas foram transformadas em uracila, enquanto as bases citosina metiladas, resistentes às reações, permaneceram como citosina.

2.8.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR é um procedimento laboratorial que permite a amplificação *in vitro* de um fragmento específico de DNA que se queira estudar.^{58,61}

A técnica se baseia em uma sequência de três etapas que se repetem ciclicamente, sendo que ao final de cada ciclo a quantidade de fragmentos de DNA é dobrada. Ao fim de alguns ciclos, é possível obter uma quantidade grande o suficiente para possibilitar a próxima fase do estudo.⁶¹

As etapas sequenciais da técnica de PCR são a desnaturação, o anelamento e a extensão do DNA.⁵⁸

Neste estudo, o protocolo de PCR utilizado foi a elevação da temperatura do meio para 95°C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de:

- a. Desnaturação: 95°C durante 15 segundos;
- b. Anelamento: 58°C durante 1 minuto;
- c. Extensão: 72°C durante 1 minuto.

2.8.3.1 Desnaturação

O objetivo da etapa de desnaturação é a abertura da dupla fita de DNA, tornando-o duas fitas simples. O processo é realizado com o aumento da temperatura do meio.^{58,61}

O processo de desnaturação e abertura da dupla fita de DNA em duas fitas simples é denominado *melting*.^{58,61}

2.8.3.2 Anelamento

Após a desnaturação da dupla fita de DNA em duas fitas simples, é necessário que os *primers* se acoplem aos locais específicos das fitas, fenômeno denominado anelamento.^{58,61}

A temperatura de anelamento é a temperatura do meio que permite que o fenômeno ocorra com mais eficiência, porém impedindo a reconstituição das duas fitas simples do DNA em fita dupla novamente.^{58,61}

2.8.3.3 Extensão da fita de DNA

Uma vez anelados, os *primers* servem de início para a construção de um novo fragmento de DNA. Isto ocorre com o incremento em extensão do *primer*, através de adição de nucleotídeos sequenciais tendo como molde a fita inicial do DNA.^{58,61}

Esta reação é realizada a altas temperaturas, por isso é necessário que se utilize uma polimerase termoestável. Neste estudo, utilizamos uma polimerase extraída da bactéria *Thermus aquaticus*, a Taq DNA Polimerase.^{58,61}

A Taq DNA Polimerase estende a fita de DNA do fragmento de interesse. Ao término do ciclo, os produtos gerados na fase de extensão servem como molde para o início do novo ciclo.^{58,61}

2.8.3.4 Repetição dos ciclos

Nos primeiros ciclos, o anelamento dos *primers* F e R iniciam a extensão da fita molde original a partir desses pontos e até o seu final. Como os anelamentos ocorrem em fitas diferentes, os produtos inicialmente formados ainda são maiores do que simplesmente o fragmento de interesse.^{57,58}

Entretanto, após alguns ciclos, novos *primers* se anelam a esses produtos maiores, limitando a extensão destes ao fragmento real de interesse, que será então molde para novos ciclos. Após vários ciclos, o fragmento de interesse predomina em quantidade sobre os outros produtos.^{57,58}

O fragmento de interesse produzido pela PCR é denominado *amplicon*. Ao final de 40 ciclos, são produzidos aproximadamente 10^{12} *amplicons*.⁵⁶

As Figuras 14 e 15 ilustram o processo de PCR.

Figura 14 – Um ciclo de PCR. As etapas sequenciais de Desnaturalização, Anelamento e Extensão produzem o dobro de fragmentos do molde original presentes no início do processo. Ao final do ciclo, os produtos servem de molde para o próximo ciclo.

Fonte: Adaptado de Khan Academy Brasil.⁵⁸

Figura 15 – Produtos dos vários ciclos de PCR. Ao final de cada ciclo, a quantidade original de fragmentos é duplicada. Ao final do 3º ciclo, moldes do fragmento de interesse (*amplicons*) já estão presentes.

Fonte: Adaptado de Khan Academy Brasil.⁵⁸

2.8.4 Determinação da Curva de Melting

Após a etapa de PCR, o padrão de metilação dos DNAs dos dois grupos foi determinado através do ensaio MS-HRM, utilizando o kit MeltDoctor HRM Master Mix (ThermoFisher®) e o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems®), seguindo as instruções do fabricante.

O princípio da técnica HRM é a diferenciação da temperatura de desnaturação de fitas de DNA que contenham *amplicons* diferentes. É uma técnica barata em comparação ao custo do sequenciamento genético, e sensível ao ponto de detecção de variações de temperatura menores que 1,0°C.⁶²

A técnica MS-HRM utiliza a PCR convencional com a adição de um corante (*dye*) que se intercala na dupla fita de DNA (fluoróforo), o qual libera fluorescência quando a dupla fita é submetida a desnaturação. A cada ciclo da PCR, o fluoróforo se acopla os novos *amplicons* produzidos.⁵⁹

O processo continua com o aumento gradual da temperatura no interior do tubo de reação, desnaturando a dupla fita de DNA, o que gera um decaimento da fluorescência, que é captado pelo leitor do aparelho (Figura 16). O computador do aparelho transforma a leitura do decaimento em uma curva de fluorescência em função da temperatura, a chamada Curva de *Melting* (Figura 17).⁵⁹

A temperatura na qual metade das cadeias de DNA estão na forma de dupla fita e metade na forma simples é denominada Temperatura de *Melting* (T_m). Cada *amplicon* tem uma T_m específica e gera uma Curva de *Melting* padrão.^{59,61}

A T_m depende tanto da quantidade quanto da sequência de nucleotídeos do *amplicon*. Isto porque as ligações de citosina com guanina (C+G) possuem três pontes de hidrogênio, demandando maior temperatura para se desnaturarem do que as ligações adenina com timina (A+T), que possuem somente duas. Quanto maior o número de ligações C+G no *amplicon*, mais termoestável ele é, maior será a T_m , e mais deslocada para a direita será a Curva de *Melting*.⁶²⁻⁶⁴

A T_m inicial para a previsão do ensaio foi calculada a partir da seguinte fórmula:⁶³

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 2x(\text{A}+\text{T}) + 4x(\text{C}+\text{G})$$

Figura 16 – Atividade do agente fluorescente na técnica MS-HRM. Em situação de baixa temperatura (A), o fluoróforo está saturado na dupla fita de DNA. Conforme a temperatura do meio vai aumentando, a temperatura de *melting* (T_m) é atingida, momento em que 50% do DNA está em dupla fita e 50% em fita única. Com a abertura do DNA (B), o fluoróforo se desprende da fita e ganha o meio (C), sendo captado pelo aparelho (D), o qual registra a intensidade em uma curva de fluorescência em função da temperatura.

Fonte: Adaptado de Tomaz et al, 2016.⁵⁹

Figura 17 – Curva de *melting*. T_1 = temperatura em que as fitas de DNA começam a desnaturar. T_2 = temperatura em que a desnaturação das fitas de DNA está completa. T_m = temperatura de *melting*. A) Curva bruta de porcentagem de DNA desnaturados em função da temperatura. B) Mesmos dados da curva anterior, apresentados como derivada negativa da fluorescência sobre derivada da temperatura ($-dF/dT$), em função da temperatura. Esta apresentação permite a visualização precisa da T_m , apresentada como o pico da curva.

Fonte: Modificado de Patterson et al, 2011 e Cousins et al, 2012.^{60,65}

As placas utilizadas para o estudo de metilação continham 96 poços, sendo os três últimos reservados respectivamente para uma amostra padrão 100% metilada, uma amostra padrão 0% metilada e um controle negativo (somente água ultrapura utilizada na eluição do DNA modificado).

Em seguida, curvas de *melting* foram estabelecidas para cada amostra. A T_m de cada uma delas foi determinada com nível de precisão de 0,1°C pelo próprio *software* do equipamento.

2.8.5 Interpretação dos dados da curva de melting

Após a determinação das T_m de todas as amostras, procedemos à classificação de cada uma em função do percentual de metilação, da seguinte forma:

- Amostra totalmente metilada = percentual de metilação $\geq 90\%$;
- Amostra parcialmente metilada ou não metilada = percentual de metilação $< 90\%$;

Para a determinação do percentual de metilação, utilizamos a T_m de cada amostra.

O percentual de metilação de uma amostra pode ser previsto a partir da posição em que a sua T_m se encontra no intervalo entre as T_m dos padrões 0% e 100% metilados. Quanto maior o percentual de metilação da amostra, mais sua T_m se aproxima do padrão 100% metilado e vice-versa. Determinando a posição relativa da T_m , pode-se acessar indiretamente o percentual de metilação com excelente precisão.⁶⁶

A Figura 18A mostra a T_m calculada a partir de várias amostras com percentuais de metilação previamente conhecidos, e a Figura 18B mostra a existência de correlação linear entre diferentes proporções de metilação e a T_m amostral.⁶⁶

Figura 18 – Correlação entre percentual de metilação e T_m . A) Curvas *melting* de fluorescência em função da temperatura de moléculas com diversas porcentagens de metilação. B) Correlação linear entre a porcentagem de *amplicons* metilados e respectivas T_m . T_m = temperatura de *melting*.

Fonte: Modificado de Smith et al, 2009.⁶⁶

Os percentuais de metilação de cada amostra foi calculado por regra de proporcionalidade, utilizando as T_m da amostra (T_{m_A}), do padrão 100% metilado (T_{m_M}) e do padrão 0% metilado (T_{m_U}), conforme ilustrado abaixo:

Figura 19 – Princípio utilizado para o cálculo dos percentuais de metilação. O intervalo entre as T_m do padrão 100% metilado (T_{m_M}) e o padrão 0% metilado (T_{m_U}) é dado pela diferença entre estas temperaturas. O intervalo entre a T_m da amostra (T_{m_A}) e a T_{m_U} representa a posição relativa da T_{m_A} no intervalo entre os referenciais T_{m_M} e T_{m_U} .

Fonte: Figura elaborada pelo autor.

A posição relativa da T_{m_A} no intervalo entre os referenciais T_{m_M} e T_{m_U} se correlaciona linearmente com o percentual de metilação.⁶⁶

Assim, o cálculo do percentual de metilação (Met%) de cada amostra pôde ser determinado a partir da proporcionalidade entre os intervalos acima.⁶⁷

O Met% foi determinado para seguinte equação:

$$\text{Met\%} = \frac{(\text{TmA} - \text{TmU})}{(\text{TmM} - \text{TmU})} \times 100$$

Algumas amostras apresentaram percentual de metilação maior que 100%. Para estas, consideramos uma tolerância de até 120%, e amostras com percentual maior que este foram excluídas da análise estatística.

2.9 Análise estatística

2.9.1 Comparação das médias de idade e níveis séricos de LDL entre os grupos

Para a comparação das médias de idade e níveis séricos de LDL entre os grupos de estudo e controle, foi utilizado o teste *t* de Student com $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade.⁶⁸

Consideramos como nível de significância $\alpha < 0,05$.

2.9.2 Conceitos

Para a análise, padronizamos os seguintes conceitos:

- Expostos (Met+): amostras classificadas como metiladas.
- Não expostos (Met-): amostras classificadas como não metiladas.
- Doentes (HF+): pacientes com fenótipo HF presente.
- Não doentes (HF-): pacientes sem fenótipo HF.

2.9.3 Construção da tabela de contingência

A partir das quatro categorias acima, uma tabela de contingência 2x2 foi construída da seguinte forma:⁶⁹

<i>Amplicon</i>		Doença		Total
		HF+	HF-	
Exposição	Met+	a	b	a + b
	Met-	c	d	c + d
Total		a + c	b + d	a + b + c + d

2.9.4 Determinação da prevalência em cada grupo

A determinação da prevalência e todas as análises estatísticas posteriores foram realizadas separadamente para cada *amplicon* relacionado a cada ilha CpG, de forma que quatro categorias foram constituídas:

- *Amplicon LDLR/Ilha-1*;
- *Amplicon LDLR/Ilha-2*;
- *Amplicon APOB*;
- *Amplicon PCSK-9*.

Para cada categoria, as prevalências de doentes e de não doentes foram calculadas da seguinte forma:⁶⁹

- Prevalência de doentes entre expostos:

$$P[\text{Amplicon}]_{HF+|Met+} = \frac{a}{(a + b)}$$

- Prevalência de doentes entre não expostos:

$$P[\text{Amplicon}]_{HF+|Met-} = \frac{c}{(c + d)}$$

2.9.5 Cálculo da Razão de Prevalências (RP)

A RP foi calculada a partir da seguinte fórmula:⁷⁰

$$RP = \frac{P(HF+|Met+)}{P(HF+|Met-)}$$

A RP estima a magnitude da associação entre a exposição ao fator de risco (metilação) e o desfecho (presença de HF), indicando quantas vezes a ocorrência de HF nos expostos é maior do que aquela entre os não expostos. Em outras palavras, a RP estima a probabilidade de os indivíduos doentes terem sido expostos ao fator de risco em relação aos não doentes.^{70,71}

Para cada categoria, as notações foram realizadas separadamente e analisadas como resultados específicos. Adotando esta estratégia, foi possível definir a RP de associação entre exposição à metilação e evento HF+ para cada ilha CpG.

2.9.6 Cálculo do Intervalo de Confiança (IC)

O teste de hipóteses utilizado neste estudo foi o Intervalo de Confiança (IC).

Este método foi escolhido para avaliar se a RP encontrada nesse estudo tem representatividade perante a população geral.^{70,72}

Neste estudo, o nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$.

A determinação do IC foi realizada a partir da seguinte equação:⁷⁰

$$IC = \exp [\ln(RP) \pm Z_{\alpha} \times EPln(RP)]$$

onde,

$$EPln(RP) = \sqrt{\left[\frac{1}{a} - \frac{1}{a+b}\right] + \left[\frac{1}{c} - \frac{1}{c+d}\right]}$$

e Z_{α} = limite crítico bicaudal para a distribuição normal.

2.9.7 Construção do teste de hipóteses

A construção do teste de hipóteses foi:^{73,74}

- H_0 = indivíduos E e NE têm a mesma probabilidade de apresentarem o fenótipo HF.
- H_A = indivíduos E e NE têm probabilidades diferentes de apresentarem o fenótipo HF.

Onde H_0 = hipótese nula e H_A = hipótese alternativa.

A partir do resultado do IC, o teste de hipóteses foi confrontado.

Para os ICs que contivessem o valor 1,0, a nulidade da associação seria uma possibilidade, e H_0 não seria descartada. Opostamente, se o valor 1,0 não estivesse contido no IC, a associação se mostraria verdadeira, confirmando assim a H_A .^{71,73,74}

2.10 Fluxograma de trabalho

O estudo foi conduzido no Laboratório de Biologia Molecular (LBM) do DPP da FMRP-USP. O fluxograma de trabalho está ilustrado na Figura 20.

Figura 20 – Fluxograma de trabalho.

Fonte: Figura elaborada pelo autor.

3. Resultados

3 RESULTADOS

3.1 Descrição dos grupos

3.1.1 Grupo de estudo (HF+)

O grupo de estudo original era composto por amostras de 218 indivíduos. Deste total, 156 indivíduos não foram incluídos pelos seguintes motivos: 87 amostras eram provenientes de pacientes com critérios de DCLN com escore menor que 6, 82 amostras não tinham quantidade suficiente de material genético para prosseguimento das técnicas, 16 amostras apresentavam mutação, 16 amostras por não apresentar dados clínicos suficientes na planilha de dados, 15 amostras não haviam sido submetidas a teste de mutação, e duas amostras eram de pacientes que apresentavam TSH > 5,0mUI/L.

O grupo de estudo final foi composto por 62 indivíduos. Destes, 32 (51,6%) eram do sexo feminino e 30 (48,4%) do sexo masculino. A distribuição de etnia foi de 36 indivíduos brancos (58,1%), 4 negros (6,5%) e 2 pardos (3,2%). A identificação não constava em prontuário em 20 pacientes (32,3%).

A faixa etária do grupo variou de 25 a 79 anos completos, com média de 56,5 anos e desvio padrão de 12,2 anos. Nenhum indivíduo tinha idade inferior a 20 anos, 11 (17,7%) tinham idade entre 21 e 40 anos, 29 (46,8%) entre 41 e 60 anos e 22 (35,5%) mais que 60 anos.

Quanto à origem geográfica dos indivíduos, 46 (74,2%) residiam no estado de São Paulo, 6 (9,7%) no estado do Ceará, 3 (4,8%) no estado do Rio de Janeiro, e 1 (1,6%) em cada um dos seguintes estados: Rio Grande do Sul, Paraná, Minas Gerais, Sergipe, Pará, Mato Grosso e Bahia.

Quanto à classificação de índice de massa corporal (IMC) na ocasião da coleta das amostras, 2 indivíduos (3,2%) apresentavam IMC < 20,0kg/m², 13 (21,0%) IMC entre 20,1 e 25,0kg/m², 32 (51,6%) IMC entre 25,1 e 30,0kg/m², 12 (19,4%) IMC entre 30,1 e 35,0kg/m², 2 (3,2%) IMC entre 35,1 e 40,0kg/m² e apenas 1 indivíduo (1,6%) IMC > 40,0kg/m².

A dosagem sérica de LDL para inclusão no grupo variou de 208,2 a 754,0mg/dL, tendo como média 260,4mg/dL e desvio padrão 80,9mg/dL.

Considerando as faixas de LDL classificatórias dos critérios da DCLN, 22 indivíduos (35,5%) apresentavam dosagem entre 190 e 249mg/dL, 36 indivíduos (58,1%) entre 250 e 329mg/dL e 4 indivíduos (6,4%) igual ou maior que 330mg/dL.

Com relação aos antecedentes familiares, 56 indivíduos (90,3%) apresentavam pelo menos um parente com pelo menos uma das seguintes características: história familiar conhecida de DAC precoce (homens com menos de 55 anos e/ou mulheres com menos de 60 anos), portador de xantoma tendinoso ou arco corneano, parente adulto de primeiro ou segundo grau com CT maior que 290mg/dL ou parente menor de 16 anos com CT maior que 260mg/dL.

Sobre os antecedentes clínicos, 32 indivíduos (51,6%) apresentavam história pregressa positiva de DAC precoce, ou doença arterial cerebral ou periférica precoce.

Apenas 3 indivíduos (4,8%) apresentavam xantoma tendinoso ao exame físico, e em apenas 1 paciente (1,6%) foi identificado arco corneano antes dos 45 anos de idade.

Todas as amostras incluídas foram provenientes de pacientes com escore segundo os critérios da DCLN igual ou maior que 6.

Após a análise de metilação, houve necessidade de exclusão de algumas amostras nos grupos formados pelos quatro *amplicons*. O *flowchart* da formação dos grupos de estudo está detalhado na Figura 21.

Figura 21 – *Flowchart* de recrutamento das amostras do grupo de estudo.

Fonte: Figura elaborada pelo autor.

3.1.2 Grupo controle (HF-)

O grupo controle original era composto por 60 amostras. Após a revisão de prontuário, 10 amostras não foram incluídas por serem provenientes de pacientes com dosagem sérica de TG maior que 150mg/dL, e três por não apresentarem material genético suficiente.

O grupo controle final foi constituído por 47 amostras. Destes, 27 indivíduos (57,4%) eram do sexo feminino e 20 indivíduos (42,6%) do sexo masculino. A distribuição de etnia foi de 38 indivíduos brancos (80,9%) e 9 pardos (19,1%).

A faixa etária do grupo controle variou de 3 a 31 anos completos, com média de 15,0 anos e desvio padrão de 6,2 anos. Do total, 37 indivíduos (78,7%) tinham entre 5 e 20 anos de idade, e 10 (21,3%) tinham entre 21 e 40 anos.

Com relação à origem geográfica, 43 indivíduos (91,5%) eram residentes no estado de São Paulo, 3 (6,4%) eram procedentes do estado de Minas Gerais (1 de

cada um dos seguintes municípios: Conceição da Aparecida, Guaxupé e Sacramento) e 1 (2,1%) do estado de Mato Grosso do Sul (município de Cassilândia). Dos procedentes do estado de São Paulo, a cidade mais frequente foi Ribeirão Preto com 10 indivíduos, seguida por Jardinópolis com 4 indivíduos, Pitangueiras com 3, São Carlos e Cravinhos com 2 cada uma e outros 22 municípios com 1 indivíduo cada. Se considerarmos um raio de 100km de Ribeirão Preto, 34 pacientes (79,0%) eram residentes nesta área.

Nos prontuários consultados, as informações sobre peso e estatura dos indivíduos não estavam disponíveis.

A dosagem sérica de LDL no grupo variou de 24,0 a 103,0mg/dL, tendo como média 86,0mg/dL e desvio padrão 15,2mg/dL.

Após a análise de metilação, houve necessidade de exclusão de algumas amostras nos grupos formados pelos quatro *amplicons*. O *flowchart* da formação dos grupos controle está detalhado na Figura 22.

Figura 22 – *Flowchart* de recrutamento das amostras do grupo controle.

Fonte: Figura elaborada pelo autor.

As Tabelas 6 e 7 mostra o resumo das características dos dois grupos.

Tabela 6 – Características clínicas dos grupos de estudo (HF+) e controle (HF-).

Característica		Grupo HF+ (n=62)	Grupo HF- (n=47)
Gênero	Masculino	30 (48,4%)	27 (42,6%)
	Feminino	32 (51,6%)	27 (57,4%)
Faixa etária	2-20 anos	-	37 (78,7%)
	21-40 anos	11 (17,7%)	10 (21,3%)
	41-60 anos	29 (46,8%)	-
	> 60 anos	22 (35,5%)	-
Etnia	Branços	36 (58,1%)	38 (80,9%)
	Negros	4 (6,5%)	-
	Pardos	2 (3,2%)	9 (19,1%)
	Não identificado	20 (32,2%)	-
Procedência (UF)	São Paulo	46 (74,2%)	43 (91,5%)
	Ceará	6 (9,7%)	-
	Rio de Janeiro	3 (4,8%)	-
	Minas Gerais	-	3 (6,4%)
	Mato Grosso do Sul	-	1 (2,1%)
	Outros	7 (11,3%)	-
IMC (kg/m ²)	< 20	2 (3,2%)	ND
	20-25 (normal)	13 (21,0%)	ND
	25-30 (sobrepeso)	32 (51,6%)	ND
	30-35 (obesidade grau 1)	12 (19,4%)	ND
	35-40 (obesidade grau 2)	2 (3,2%)	ND
	> 40 (obesidade grau 3)	1 (1,6%)	ND
LDL sérico	< 100mg/dL	-	100%
	190-249 mg/dL	22 (35,5%)	-
	250-329 mg/dL	36 (58,1%)	-
	≥ 330 mg/dL	4 (6,4%)	-
Presença de antecedentes familiares		56 (90,3%)	NA
Presença de antecedentes clínicos		32 (51,6%)	NA
Presença de alterações de exame físico		4 (6,4%)	NA

NA = Não se aplica. ND = Dados não disponíveis.

Fonte: tabela elaborada pelo autor.

Tabela 7 – Médias e Desvios Padrão (DP) da idade e níveis séricos de LDL dos grupos (Teste *t* de Student com $n1 + n2 - 2$ graus de liberdade).

Variáveis	Grupo HF+ (n=62)		Grupo HF- (n=47)		p valor
	Média	DP	Média	DP	
Idade (anos)	56,5	12,2	15,0	6,2	0,0001
LDL sérico (mg/dL)	260,4	80,9	86,0	15,2	0,0001

Fonte: tabela elaborada pelo autor.

3.2 Análise dos perfis de metilação segundo as categorias definidas

3.2.1 Amplicon LDLR/Ilha-1

3.2.1.1 Formação dos grupos

No grupo HF+, 42 amostras foram excluídas por apresentarem padrão de metilação de dupla curva. Outras 7 amostras foram excluídas por apresentarem Met% acima de 120%. O grupo final de estudo (HF+) foi composto por 13 amostras.

No grupo HF-, 13 amostras foram excluídas por apresentarem Met% negativa, restando 34 amostras para o grupo final de análise.

3.2.1.2 Padrões de metilação

No grupo HF+, foi observado padrão de metilação positivo em 3 amostras, e negativo em 10 delas.

No grupo HF-, foi observado padrão de metilação positivo em 8 amostras, e negativo em 26 delas.

Os dados de Tm e Met% das amostras dos grupos HF+ e HF- estão mostrados respectivamente nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 8 – Tm e Met% das amostras HF+ do amplicon LDLR/Ilha-1

Amostra	Tm (°C)	Met%	Interpretação
2037	72,7	100%	Metilado
2379	73,1	104%	Metilado
2441	69,5	70%	Não metilado
2487	62,3	4%	Não metilado
2541	69,4	69%	Não metilado
2873	61,9	0%	Não metilado
2876	72,8	101%	Metilado
3001	69,2	68%	Não metilado
3053	68,3	59%	Não metilado
3056	67,7	54%	Não metilado
3064	65,3	31%	Não metilado
3080	68,4	60%	Não metilado
3101	69,9	74%	Não metilado

Fonte: tabela elaborada pelo autor.

Tabela 9 – Tm e Met% das amostras HF- do *amplicon LDLR/Ilha-1*

Amostra	Tm (°C)	Met%	Interpretação
35	73,4	20%	Não metilado
38	73,5	30%	Não metilado
45	73,7	50%	Não metilado
55	73,5	30%	Não metilado
58	73,2	0%	Não metilado
80	73,6	40%	Não metilado
95	73,6	40%	Não metilado
97	73,4	20%	Não metilado
99	73,7	50%	Não metilado
100	73,7	50%	Não metilado
113	73,6	40%	Não metilado
115	73,5	30%	Não metilado
116	73,4	20%	Não metilado
133	73,5	30%	Não metilado
135	73,2	0%	Não metilado
154	73,5	30%	Não metilado
159	74,1	90%	Metilado
160	73,7	50%	Não metilado
163	74,2	100%	Metilado
169	74,2	100%	Metilado
173	74,3	110%	Metilado
178	73,6	40%	Não metilado
185	73,6	40%	Não metilado
192	73,4	20%	Não metilado
197	73,7	50%	Não metilado
200	73,4	20%	Não metilado
205	73,6	40%	Não metilado
231	74,1	90%	Metilado
233	74,2	100%	Metilado
234	74,2	100%	Metilado
236	73,7	50%	Não metilado
239	74,2	100%	Metilado
251	73,4	20%	Não metilado
268	73,4	20%	Não metilado

Fonte: tabela elaborada pelo autor.

3.2.2 Amplicon LDLR/Ilha-2

3.2.2.1 Formação dos grupos

No grupo HF+, 37 amostras foram excluídas por apresentarem Met% acima de 120% e 1 foi excluída por falta de material gnômico suficiente para o ensaio de MS-HSM. O grupo final de estudo (HF+) foi composto por 24 amostras.

No grupo HF-, 1 amostra foi excluída por apresentar Met% negativa, restando 46 amostras para o grupo final de análise.

3.2.2.2 Padrões de metilação

Os dados de Tm e Met% das amostras dos grupos HF+ e HF- estão mostrados respectivamente nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 10 – Tm e Met% das amostras HF+ do *amplicon LDLR/Ilha-2*

Amostra	Tm (°C)	Met%	Interpretação
2037	77,4	89%	Não metilado
2074	77,4	89%	Não metilado
2379	77,9	103%	Metilado
2390	77,3	86%	Não metilado
2441	77,9	103%	Metilado
2458	77,9	103%	Metilado
2466	78,1	108%	Metilado
2479	77,9	103%	Metilado
2487	77,9	103%	Metilado
2489	78,0	105%	Metilado
2503	78,4	116%	Metilado
2532	77,9	103%	Metilado
2541	77,8	100%	Metilado
2574	78,1	111%	Metilado
2579	78,2	114%	Metilado
2596	78,2	114%	Metilado
2599	78,2	114%	Metilado
2675	78,4	119%	Metilado
2677	78,2	114%	Metilado
2685	78,1	111%	Metilado
2691	78,4	119%	Metilado
2705	78,4	119%	Metilado
2732	78,2	114%	Metilado
2740	78,2	114%	Metilado
2746	78,4	119%	Metilado
2790	78,1	111%	Metilado
2791	77,7	100%	Metilado
2793	78,1	111%	Metilado
2794	78,2	114%	Metilado
2795	78,4	119%	Metilado
2798	78,4	119%	Metilado
2806	78,3	117%	Metilado
2812	78,1	111%	Metilado
2814	77,7	100%	Metilado
2823	78,2	114%	Metilado
2824	78,2	114%	Metilado

continua

conclusão

Amostra	Tm (°C)	Met%	Interpretação
2829	78,1	111%	Metilado
2851	77,5	94%	Metilado
2853	77,5	94%	Metilado
2858	77,9	106%	Metilado
2866	76,6	100%	Metilado
2873	76,8	106%	Metilado
2876	76,8	106%	Metilado
2882	77,1	116%	Metilado
2920	77,1	116%	Metilado
3001	76,6	100%	Metilado
3016	76,8	106%	Metilado
3068	77,1	116%	Metilado
3071	76,8	106%	Metilado
3080	76,8	106%	Metilado

Fonte: tabela elaborada pelo autor.

Tabela 11 – Tm e Met% das amostras HF- do *amplicon LDLR/Ilha-2*

Amostra	Tm (°C)	Met%	Interpretação
14	77,9	86%	Não metilado
23	77,9	86%	Não metilado
25	77,9	86%	Não metilado
32	77,9	86%	Não metilado
35	78,3	97%	Metilado
38	78,4	100%	Metilado
55	78,2	94%	Metilado
58	78,0	89%	Não metilado
80	77,9	86%	Não metilado
83	77,9	86%	Não metilado
86	77,8	83%	Não metilado
92	77,9	86%	Não metilado
94	77,5	74%	Não metilado
95	78,4	100%	Metilado
97	78,3	97%	Metilado
99	78,4	100%	Metilado
100	78,4	100%	Metilado
113	78,4	100%	Metilado
115	78,3	97%	Metilado
116	78,3	97%	Metilado
133	78,3	97%	Metilado
135	77,9	86%	Não metilado
140	77,9	86%	Não metilado
143	77,3	69%	Não metilado
153	77,9	86%	Não metilado
154	78,6	97%	Metilado
159	78,4	100%	Metilado
160	78,5	103%	Metilado
163	78,5	103%	Metilado
169	78,5	103%	Metilado

continua

conclusão

Amostra	Tm (°C)	Met%	Interpretação
173	78,4	100%	Metilado
178	78,4	100%	Metilado
185	78,3	97%	Metilado
192	78,2	94%	Metilado
197	77,9	86%	Não metilado
200	77,9	86%	Não metilado
205	78,4	100%	Metilado
231	78,4	100%	Metilado
233	78,6	106%	Metilado
234	78,6	106%	Metilado
236	78,6	106%	Metilado
239	78,5	103%	Metilado
251	78,0	92%	Metilado
260	77,8	86%	Não metilado
262	78,2	97%	Metilado
268	78,1	94%	Metilado

Fonte: tabela elaborada pelo autor.

3.2.3 Amplicon APOB

3.2.3.1 Formação dos grupos

No grupo HF+, 13 amostras foram excluídas por apresentarem Met% negativa. O grupo final de estudo (HF+) foi composto por 49 amostras.

No grupo HF-, 21 amostras foram excluídas por apresentarem Met% negativa, restando 26 amostras para o grupo final de análise.

3.2.3.2 Padrões de metilação

Todas as amostras remanescentes dos dois grupos referentes ao amplicon APOB mostraram padrão de não metilação.

3.2.4 Amplicon PCSK-9

3.2.4.1 Formação dos grupos

No grupo HF+, 1 amostra foi excluída por ausência de material genômico suficiente para proceder ao ensaio MS-HSM. O grupo final de estudo (HF+) foi composto por 61 amostras.

No grupo HF-, 2 amostras foram excluídas por apresentarem Met% negativa, restando 45 amostras para o grupo final de análise.

3.2.4.2 Padrões de metilação

Todas as amostras remanescentes dos dois grupos referentes ao *amplicon* PCSK-9 mostraram padrão de não metilação.

3.3 Análise estatística

3.3.1 Amplicon LDLR/Ilha-1

3.3.1.1 Construção da tabela de contingência

LDLR/Ilha-1		Doença		Total
		HF+	HF-	
Exposição	Met+	3 (27,3%)	8 (72,7%)	11
	Met-	10 (27,8%)	26 (72,2%)	36
Total		13	34	47

3.3.1.2 Cálculo da RP

A prevalência de doentes entre os expostos foi:

$$P[\text{LDLR/Ilha-1}]_{\text{HF+}}/\text{Met+} = 3 / 11 = 27,3\%$$

A prevalência de doentes entre os não expostos foi:

$$P[LDLR/Ilha-1]_{HF+|Met-} = 10 / 36 = 27,8\%$$

A Razão de Prevalências foi:

$$RP[LDLR/Ilha-1] = \frac{HF+|Met+}{HF+|Met-}$$

$$RP[LDLR/Ilha-1] = \frac{27,3\%}{27,8\%}$$

$$RP[LDLR/Ilha-1] = 0,982$$

3.3.1.3 Cálculo do IC

$$IC[LDLR/Ilha-1] = \exp [\ln(RP) \pm Z\alpha \times \sqrt{\left[\frac{1}{a} - \frac{1}{a+b}\right] + \left[\frac{1}{c} - \frac{1}{c+d}\right]}]$$

$$IC[LDLR/Ilha-1] = \exp [\ln(RP) \pm 1,96 \times \sqrt{\left[\frac{1}{3} - \frac{1}{13}\right] + \left[\frac{1}{8} - \frac{1}{34}\right]}]$$

$$IC[LDLR/Ilha-1] = 0,33 - 2,95$$

3.3.2 Amplicon LDLR/Ilha-2

3.3.2.1 Construção da tabela de contingência

LDLR/Ilha-2		Doença		Total
		HF+	HF-	
Exposição	Met+	47 (61,8%)	29 (38,2%)	76
	Met-	3 (15,0%)	17 (85,0%)	20
Total		50	46	47

3.3.2.2 Cálculo da RP

A prevalência de doentes entre os expostos foi:

$$P[LDLR/Ilha-2]_{HF+/Met+} = 47 / 76 = 61,8\%$$

A prevalência de doentes entre os não expostos foi:

$$P[LDLR/Ilha-2]_{HF+/Met-} = 3 / 20 = 15,0\%$$

A Razão de Prevalências foi:

$$RP[LDLR/Ilha-2] = \frac{61,8\%}{15,0\%}$$

$$RP[LDLR/Ilha-2] = 4,12$$

3.3.2.3 Cálculo do IC

$$IC[LDLR/Ilha-2] = \exp [\ln(RP) \pm Z\alpha \times \sqrt{\left[\frac{1}{a} - \frac{1}{a+b}\right] + \left[\frac{1}{c} - \frac{1}{c+d}\right]}]$$

$$IC[LDLR/Ilha-2] = \exp [1,41 \pm 1,96 \times \sqrt{\left[\frac{1}{21} - \frac{1}{24}\right] + \left[\frac{1}{29} - \frac{1}{46}\right]}]$$

$$IC[LDLR/Ilha-2] = 1,43 - 11,88$$

3.3.3 Amplicon APOB

3.3.3.1 Construção da tabela de contingência

APOB		Doença		Total
		HF+	HF-	
Exposição	Met+	0	0	0
	Met-	49 (65,3%)	26 (34,7%)	75
Total		49	26	75

3.3.3.2 Cálculo da RP

A prevalência de doentes entre os não expostos foi:

$$P[APOB]_{HF+|Met-} = 49 / 75 = 65,3\%$$

Pelo fato de nenhuma amostra ter apresentado padrão de metilação positiva, não foi possível determinar a prevalência de doentes entre os expostos, a prevalência de não doentes entre os expostos, a Razão de Prevalências e o Intervalo de Confiança.

3.3.4 Amplicon PCSK-9

3.3.4.1 Construção da tabela de contingência

PCSK-9		Doença		Total
		HF+	HF-	
Exposição	Met+	0	0	0
	Met-	61 (57,5%)	45 (42,5%)	75
Total		61	45	75

3.3.4.2 Cálculo da RP

A prevalência de doentes entre os não expostos foi:

$$P[PCSK-9]_{HF+|Met-} = 61 / 106 = 57,5\%$$

Pelo fato de nenhuma amostra ter apresentado padrão de metilação positiva, não foi possível determinar a prevalência de doentes entre os expostos, a prevalência de não doentes entre os expostos, a Razão de Prevalências e o Intervalo de Confiança.

4. Discussão

4 DISCUSSÃO

4.1 Sobre a possível origem epigenética da HF

A HF é a causa primária de hipercolesterolemia mais frequente na idade pediátrica.¹¹

Embora no ano de 2020 ainda não houvesse dados consistentes a respeito da prevalência de HF no Brasil, a frequência geral teórica de 1 portador para cada 500 pessoas mostra que se trata de uma situação frequente do ponto de vista epidemiológico. Por ser uma entidade que se apresenta absolutamente assintomática durante longos anos, a probabilidade de postergação do diagnóstico é alta, não sendo exagero afirmar que seja a regra. Ademais, crianças assintomáticas normalmente se consultam somente com o pediatra de referência, e se este não levantar a hipótese de HF com questionamento ativo sobre os antecedentes familiares, a suspeita diagnóstica pode passar despercebida. Em verdade, não raro o diagnóstico será realizado somente após um evento coronariano agudo, sendo que sinais bioquímicos poderiam ter sido utilizados para detecção da doença muito tempo antes. Se corretamente aplicadas, as diretrizes de triagem da hipercolesterolemia em idades precoces poderiam minimizar o impacto de suas complicações para o paciente, além de diminuir o impacto financeiro para os sistemas de saúde público e privado.

Uma simples dosagem sérica de colesterol total e frações é suficiente para consolidar a suspeita de HF. A coleta massiva do exame não se faz necessária, porém o levantamento de história familiar de risco se faz um bom descritor para indicação de qual paciente deve ser investigado.

A hipercolesterolemia já foi descrita por diversos autores como fator isolado relacionado a aumento de mortalidade geral a partir de 18 anos de idade.²⁶ Apesar de o evento que leva à morte raramente acontecer antes dos 30 anos, as alterações teciduais que o aumento do LDL circulante provoca aparecem desde a infância.¹¹

Mais do que o simples aumento do CT e do LDL, a variação dos níveis circulantes de LDL ao longo do tempo também se apresenta como fator de impacto em desfechos de doença cardiovascular.⁷⁵

O aumento da incidência de obesidade infantil nas primeiras décadas do século XXI trouxe consigo o aumento concomitante das suas complicações, dentre elas a

dislipidemia.²³ Alguns estudos foram capazes de demonstrar que alterações orgânicas relacionadas a estas morbidades, como esteatohepatite não alcoólica e aumento de espessura de camada íntima em artérias coronárias, já estão presentes e passíveis de serem detectadas em idade pediátrica.^{18,76}

Esses achados mostram a importância de se haver uma preocupação com relação à triagem precoce de dislipidemias, em especial na presença de história familiar de DAC precoce.¹¹ Os conhecimentos acerca do *conceito Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD) vêm a alertar sobre a necessidade de urgência no diagnóstico precoce de entidades que se expressam em tenra idade.⁷⁷ No caso da HF, quanto antes o diagnóstico de hipercolesterolemia for realizado, menor o impacto do tempo de variabilidade lipêmica e de possibilidade de alterações de órgãos alvo relacionados.

O conhecimento sobre os efeitos da programação metabólica intensifica a preocupação de detecção e manejo precoce na vida de doenças crônicas não transmissíveis com origem na infância.

A fisiopatologia da HF está relacionada a pequenos defeitos genéticos que resultam em anomalias metabólicas fatais em longo prazo. O defeito em apenas um de três genes relacionados ao metabolismo do colesterol (*LDLR*, *APOB* e *PCSK-9*) já é suficiente para o desfecho de níveis circulantes bastante elevados, elevando em muito o risco de mortalidade.¹¹

Entretanto, os estudos genéticos mostram que em 20 a 40% dos pacientes com diagnóstico clínico de HF nenhuma alteração estrutural é encontrada.²⁸ Esse número é uma proporção considerável dentro do universo da entidade. Por ser uma doença que demanda vigilância clínica, contribuições acerca de sua gênese são fundamentais para a sua compreensão e para futuras investigações terapêuticas.

A descoberta dos mecanismos epigenéticos de controle da expressão gênica trouxe novas possibilidades investigativas, e novas hipóteses podem ser geradas sobre doenças cujas origens ainda não puderam ser explicadas a partir da genética.

Neste contexto, poderia um mecanismo epigenético explicar a origem da HF nos pacientes sem alteração estrutural nos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK-9*?

Esta pergunta norteou o desenvolvimento deste estudo.

Vários são os mecanismos epigenéticos possíveis, entretanto o mais frequente e mais estudado é a metilação em ilhas CpG na região promotora de um gene. Quando este evento molecular ocorre, os fatores de transcrição são impedidos de se

acoplarem à fita de DNA, resultando na não expressão (ou silenciamento) do gene em questão.³²

Estudos moleculares dos três genes, viabilizados pelo Projeto Genoma, possibilitaram a descrição de presença de ilhas CpG em todos eles, o que significa que todos são teoricamente passíveis de sofrerem mecanismos epigenéticos relacionados a metilação.⁵³

Levando-se em consideração o papel de cada gene no metabolismo do colesterol, poderíamos inferir os possíveis padrões epigenéticos que estariam relacionados ao fenótipo HF, conforme descrito abaixo.

- Gene *LDLR* → Se metilado, a síntese de receptores celulares de LDL estaria prejudicada, resultando em não reconhecimento da lipoproteína e aumento dos seus níveis circulantes;
- Gene *APOB* → Se metilado, a síntese da apolipoproteína B-100 estaria modificada, resultando em não reconhecimento da LDL pelo receptor celular, e aumento dos seus níveis circulantes;
- Gene *PCSK-9* → Se não metilado, o catabolismo do receptor celular de LDL estaria potencializado, resultando em menor densidade de receptores de superfície, não sendo suficientes para a captação da LDL circulante.

A comparação estatística de proporções de metilação de cada um desses genes entre pacientes com e sem diagnóstico clínico de HF pôde direcionar a uma resposta.

4.2 Sobre o desenho do estudo

Este estudo foi desenhado com a finalidade de testar a associação entre a variável independente DNA METILADO e a variável dependente FENÓTIPO HF.

O método se baseou na comparação das prevalências de doentes entre expostos e entre não expostos. Nesta situação, tanto o desenho retrospectivo do tipo caso-controle quanto transversal foram inicialmente considerados.

O plano de trabalho para o desenho caso controle com amostras pareadas seria coleta de dados de indivíduos provenientes da mesma população tanto para o grupo de casos quanto para o de controles. Esta realidade abriria a possibilidade de comparação das variáveis entre os grupos com menores fatores de confusão e vieses.

A ferramenta estatística *Odds-Ratio* determinaria a força de exposição de genes metilados no desfecho HF.⁵¹

Neste caso, o planejamento de determinação do grupo de estudo consistiria em: 1) levantamento de sujeitos na população de Ribeirão Preto com dosagens de LDL maiores que 190mg/dL, valor compatível com a suspeita clínica de HF, 2) recrutamento desses pacientes, 3) aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e do Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE), 4) coleta de amostra biológica (sangue) dos voluntários, 5) pesquisa de mutação nos três genes relacionados, 6) inclusão somente dos sujeitos com pesquisa negativa para as mutações citadas e, finalmente, 6) pesquisa de metilação nos três genes deste grupo.

O planejamento de determinação do grupo controle seria: 1) recrutamento de pacientes randomizados residentes nas proximidades de cada paciente incluído no grupo de estudo, 2) recrutamento, 3) aplicação do TCLE e do TALE, 4) coleta de amostra biológica (sangue), 5) inclusão somente dos sujeitos com dosagens normais de perfil lipídico.

A viabilização do planejamento descrito demandaria a seguinte contabilidade: para cada sujeito incluído, seriam necessárias determinações de metilação das quatro ilhas CpG em mais outros dois (considerando que aproximadamente 30% dos diagnósticos clínicos de HF são negativos para metilação).²⁸ Com isso, a formação dos grupos necessitaria pesquisa de mutação de 12 *amplicons* para cada inclusão.

Este estudo sofreu limitação financeira, de forma que o custo do planejamento de um estudo caso-controle se tornou impraticável.

Como solução, foi adotado o desenho transversal, o qual possibilitou a análise da razão de prevalências entre grupos, porém de forma mais compatível com as limitações vivenciadas. O estudo perdeu a possibilidade de determinação de *Odds-Ratio*, entretanto abriu-se a oportunidade de testar a associação entre as variáveis independente e dependente. Estes resultados foram suficientes para que os objetivos do estudo fossem satisfeitos.

Há que se considerar que o desenho transversal foi assim definido porque tanto a determinação do perfil lipídico quanto a pesquisa de metilação foram realizados na mesma amostra, ou seja, na mesma linha temporal.⁵¹ Entretanto, a ciência já conhece que a metilação de DNA não é um evento que ocorre por toda a vida do indivíduo, pois a região promotora está mais sensível a esta ocorrência na janela dos primeiros dois anos de vida.³⁸ Este conhecimento não pode ser desconsiderado.

O desenho transversal entrega uma associação de eventos. Porém, a inferência que pode ser feita é que existe a possibilidade de que os eventos epigenéticos sejam a causa do fenótipo HF, e não o contrário.

4.3 Sobre a formação dos grupos e as amostras

Uma parceria com o InCor possibilitou que fossem incluídas amostras de pacientes com diagnóstico clínico de HF e já testados para presença de mutação nos três genes, poupando o dispêndio desta fase do processo. Quase todas as amostras destinadas a este estudo já eram sabidamente negativas para mutações nos genes canônicos, estando prontas para serem submetidas ao estudo de metilação. As poucas amostras que apresentavam mutação positiva ou que não haviam sido submetidas ao teste de mutação não foram incluídas no estudo. Estes dados estavam disponíveis na planilha de dados clínicos fornecida pela equipe HiperCol Brasil juntamente com as amostras.

Os dados clínicos também foram a ferramenta para a avaliação de cada amostra segundo os critérios da DCLN. Apenas as amostras de sujeitos com escore igual ou superior a 6 foram incluídas.

As amostras do grupo de estudo foram, portanto, de conveniência. Porém, todas cumpriram integralmente os critérios de inclusão inicialmente propostos.

A origem das amostras do grupo de estudo impossibilitou a formação de um grupo controle na mesma população, o que foi mais um limitador para o desenho caso-controle.

O grupo controle foi selecionado a partir de amostras do biorrepositório do HCFMRP-USP utilizadas em outros estudos, também com DNA previamente extraído e prontas para o teste de metilação. Foram, também, amostras de conveniência. Todos os sujeitos deste grupo tinham registro no HCFMRP-USP, de forma que todos os dados necessários estavam disponíveis em prontuário.

Todas as amostras que compuseram este grupo foram triadas para que possíveis fatores de confusão fossem excluídos. A composição do grupo foi feita somente por amostras de sujeitos que certamente não apresentavam doenças e nem estavam em uso de medicações que interferissem nos níveis séricos de lipídeos. Foram incluídos somente sujeitos que tinham pelo menos duas dosagens séricas normais de colesterol total e frações. Desta forma, mesmo que as amostras não

tenham sido provenientes de sujeitos de mesma origem populacional do grupo de estudo, o que seria a situação ideal, ainda assim houve a garantia de que não havia ninguém com diagnóstico clínico de HF.

Por conta das origens diferentes, os grupos tiveram algumas características bastante distintas. As médias de idade dos grupos HF+ e HF- se mostraram bastante diferentes ($p = 0,0001$), mostrando importante heterogeneidade nesta variável. Esta diferença deve ser levada em consideração na interpretação dos resultados, pois impossibilitou a análise de grupos suficientemente homogêneos. Por outro lado, os conhecimentos no ano de 2020 trazem vozes convergentes que as modificações epigenéticas ocorrem dentro dos primeiros 1.000 dias de vida. O grupo controle foi composto exclusivamente por indivíduos já fora deste período de plasticidade do DNA, uma vez que o paciente mais jovem apresentava mais de três anos no momento da coleta da amostra sanguínea.

Um ponto positivo da seleção foram as faixas de LDL utilizadas para a inclusão nos grupos. A diferença dos níveis séricos foi bastante diferente ($p < 0,0001$) entre os grupos, situação pretendida pelos autores. Esta diferença se deveu ao critério de inclusão de 190mg/dL para o grupo de estudo e de LDL < 100mg/dL para o grupo controle. A exigência de extremos de LDL para a composição de cada grupo, neste caso, foi fundamental para que não houvesse risco de incluir no grupo controle uma amostra com eventual mutação nos genes canônicos. Recorrendo mais uma vez aos marcos teóricos da HF vigentes no ano de 2020, a dosagem de LDL em níveis normais em pacientes maiores de dois anos em tese seria suficiente para afastar o diagnóstico de HF do indivíduo.¹¹ O filtro de LDL menor que 100mg/dL foi considerado mesmo para indivíduos acima de 20 anos, cujo valor normal seria LDL < 130mg/dL. Mais ainda, houve o cuidado de se exigir pelo menos duas dosagens de LDL < 100mg/dL registradas em prontuário para a inclusão da amostra, a fim de minimizar um eventual erro laboratorial de dosagem.

Em função de todas essas análises, os autores consideraram que os critérios de inclusão de ambos os grupos foram suficientemente eficientes para a adequada composição dos grupos e para a comparação dos resultados pretendidos para este estudo.

O objetivo inicial foi trabalhar com 50 amostras em cada grupo. Após o filtro dos critérios de inclusão e de exclusão, foram selecionadas 47 amostras para o grupo de estudo e 62 para o grupo controle. Para uma prevalência populacional de HF de 0,2%

(1:500) e o coeficiente de confiança de 95%, este tamanho amostral gerou um erro relativo de 53%. Embora maior do que a expectativa, foi o possível para as condições do estudo.

Entretanto, uma discussão fundamental é que as amostras foram submetidas a critérios de inclusão que garantiram ao máximo a semelhança das características de interesse à população geral. Assim, mesmo com os numéricos limitados, a relação entre a expressão do fenótipo HF com o epigenótipo de interesse estava garantida, de forma que o comportamento dos grupos se assemelhava ao da população geral.⁷⁸

Por esses motivos, os resultados do estudo, mesmo com as limitações vivenciadas, são dignos de serem levados em consideração.

4.4 Sobre os resultados encontrados

4.4.1 Análise de metilação

A fase de determinação da metilação foi realizada a partir de padrões 0% e 100% metilados, o que permitiu estimar estados intermediários de metilação.

Em geral, a curva de metilação do *amplicon* é comparada com curvas padrão de estados intermediários de metilação previamente determinadas, de 10%, 20%, 30% e assim por diante.⁶⁶

Uma das formas de determinação das curvas padrão de estados intermediários é através de diluições proporcionais dos padrões 0% e 100% metilados em volumes relativos ao percentil que se deseja obter. Por exemplo, para determinar uma curva de *melting* com padrão 10% metilado, basta diluir os padrões 0% e 100% na proporção 90:10; para o padrão 20% metilado dilui-se na proporção 80:20, e assim por diante.⁶⁰

Outra estratégia para acessar os perfis intermediários de metilação é através de cálculos matemáticos de proporção usando como referência a T_m. A correlação entre os resultados observados por este método e o de diluição proporcional é maior que 0,94, o que garante geração de dados úteis e fidedignos para análise.⁶⁶ Este foi o método escolhido para determinação da Met% de cada amostra neste estudo.

Após os testes de metilação, houve amostras que apresentaram Met% maior que 100%. Um intervalo de 20% acima foi considerado como aceitável para manutenção da amostra no estudo, e as que apresentaram Met% acima de 120% foram consideradas como anômalas e excluídas.

O interesse deste estudo foi verificar um desfecho relacionado à variável independente DNA METILADO. A estratégia foi comparar amostras com estado de metilação total com as de estado de não metilação total. Foi considerado estado de metilação total as amostras com Met% acima de 90%, e de metilação parcial as com valores menores que 90%.

4.4.2 Análise estatística

O desenho transversal foi a matriz para a aplicação da Razão de Prevalências e o teste de hipóteses de Intervalo de Confiança.

As análises dos *amplicons* *LDLR/Ilha-1*, *APOB* e *PCSK-9* não mostraram diferenças com significância estatística entre os grupos. Nas amostras incluídas neste estudo, o perfil de metilação destes genes não explicou as diferenças fenotípicas encontradas.

Os motivos pelos quais a análise desses *amplicons* não mostrou resultados pode ser explicado por algumas hipóteses.

Quase metade das amostras mostraram curvas de metilação anômalas para o *amplicon* *LDLR/ilha-1*, de forma a não possibilitar a determinação do Tm. Essa foi uma perda numérica considerável, pois se todas elas tivessem apresentado Tm identificáveis, a análise estatística poderia ter apresentado um desfecho com significância estatística para um dos desfechos. Essas leituras anômalas podem ter sido decorrentes de quantidade insuficiente de material biológico nas amostras, visto que sua procedência foi de biorrepositório.

Houve também uma quantidade considerável de exclusões de amostras por padrões anômalos para o estudo do *amplicon* APO-B. Todas as amostras dos dois grupos mostraram padrão de não metilação total.

No caso do *amplicon* APO-B, as exclusões poderiam ter sido um problema se os resultados das amostras incluídas tivessem sido divididos entre estado de metilação total e estado de não metilação total. Porém, a totalidade das amostras apresentou padrão de não metilação total, o que provavelmente traz o significado que, para esses grupos, o gene APO-B não está envolvido na gênese da HF.

Para o *amplicon* *PCSK-9* quase não houve amostras excluídas. O resultado da análise de metilação pareceu promissor ao se verificar o estado de não metilação total nas amostras do grupo de estudo, o que faz sentido fisiopatológico para a gênese da

HF. No entanto, todas as amostras do grupo controle também mostraram o mesmo padrão de não metilação. É possível que possa ter existido algum viés de seleção do grupo controle que não foi identificado, e que estivesse associado à não metilação total do gene. Ou, analogamente ao APO-B, pode ser que a sua metilação não tenha envolvimento na gênese da HF.

A análise do *amplicon LDLR/Ilha-2*, nas amostras estudadas e com os critérios estabelecidos, mostrou diferença entre os grupos com significância estatística.

Para fins de estruturação da tabela de contingência, as amostras com perfil de metilação total foram consideradas como população exposta, pelos motivos já discutidos anteriormente.

A prevalência de pacientes com fenótipo HF entre os expostos foi 61,8%, enquanto a de doentes entre os não expostos foi 15,0%. O risco absoluto (RA) do grupo de expostos em apresentar concomitantemente o diagnóstico de HF foi de:

$$RA = 61,8\% - 15,0\% = 46,8\%$$

Ou seja, o fato de um sujeito apresentar estado de metilação total na ilha 2 do gene *LDLR* acrescentaria em média 46,8% de risco de desenvolvimento de HF quando comparado a sujeitos sem metilação total.

A RP calculada foi 4,12. Este número também representa o Risco Relativo (RR), ou força de exposição. O estado de metilação total na ilha 2 do gene *LDLR* impõe um risco 4,12 vezes maior de desenvolvimento de HF comparativamente a sujeitos sem metilação total.

O IC calculado foi 1,43 – 11,88. Observamos que a unidade não está contida no intervalo, o que garante neste caso o afastamento da hipótese nula. Para essas amostras e com este desenho de estudo, os pacientes com diagnóstico de HF tiveram associação positiva com estado de metilação total da ilha 2 do gene *LDLR*, com significância estatística. Do ponto de vista fisiopatológico, esta alteração faz sentido no desenvolvimento do fenótipo HF. Ao considerarmos o papel do receptor de LDL no metabolismo do colesterol, e também que o evento metilação silencia o gene, o defeito na produção de receptores de LDL levaria ao aumento substancial dos níveis séricos de LDL, ocorrendo o fenótipo HF.

O IC se mostrou bastante amplo. As limitações existentes neste estudo possibilitaram grupos menores do que inicialmente planejados, o que impacta os

limites do IC, uma vez que os denominadores de sua equação são alimentados pelas quantidades amostrais.⁷⁰

Novos estudos com desenho semelhante e números amostrais maiores certamente trarão resultados com melhores significâncias estatísticas, como IC mais curto e erro relativo menor. Particularmente, um estudo com desenho caso-controle e resultado em *Odds-Ratio* poderá agregar informações importantes acerca da origem epigenética da HF.

Um questionamento que este estudo levanta é se um ou mais mecanismos epigenéticos estariam envolvidos também na homeostase do colesterol em sujeitos sem fenótipo HF. Talvez mecanismos epigenéticos exerçam papéis importantes na regulação metabólica do colesterol, independente das origens genéticas da HF.

Embora não haja estudos publicados desenhados para o mesmo teste de hipóteses da presente investigação, podemos citar outros autores que buscaram a associação de fenômenos epigenéticos com desfechos metabólicos. Como exemplos temos os estudos de Wijnands (2014) e Deodati (2013), já explicados na introdução desta tese.^{39,42}

4.5 Limitações e pontos positivos deste estudo

A trajetória deste estudo teve uma duração de quatro anos (ver cronograma de execução em Apêndice A). O percurso se apresentou bastante dificultoso para que os resultados fossem alcançados, e vários imprevistos estiveram presentes. Os autores não mediram esforços para sanar a todos, evitando impacto negativo na qualidade dos resultados.

A começar pela falta de financiamento pelos órgãos públicos fomentadores de pesquisa, em vista da política nacional de corte de verbas que o país passava à ocasião. Os autores financiaram com recursos próprios 45% do valor de aquisição de insumos laboratoriais. A planilha de investimento do estudo está demonstrada em detalhes no Apêndice B.

A formação do grupo de estudo seguiu o planejamento inicial realizado. Os autores principais deste estudo viajaram até a cidade de São Paulo no dia 23/08/2016 para, em reunião com os responsáveis pelo Projeto HiperCol Brasil, selecionar amostras de pacientes seguidos pelo programa e que não apresentavam mutações nos genes canônicos. Do biorrepositório local, 218 amostras foram selecionadas

inicialmente, juntamente com um arquivo contendo as características clínicas de cada doador. A partir desse conjunto inicial, foi possível a seleção para os grupos conforme já descrito no capítulo Resultados.

A formação do grupo controle originalmente prevista seria através de convocação de 50 pacientes acompanhados em ambulatórios das divisões de Endocrinologia Pediátrica (DPP) e de Nutrologia (Departamento de Clínica Médica) do HCFMRP-USP, ambos sob responsabilidade de parceiros do estudo. A seleção seria realizada a partir de dosagens de lipidogramas anteriores, e seriam selecionados pacientes que tivessem LDL abaixo de 100mg/dL. A seguir, após aplicação de TCLE ou TALE, seriam colhidas amostras de sangue desses pacientes, que seriam submetidas a extração de DNA, pesquisa de mutação dos genes canônicos, e finalmente pesquisa de metilação das quatro ilhas CpG.

A limitação financeira já descrita impediu que fosse realizada essa sequência de procedimentos. Por isso, foi decidido que a formação do grupo controle seria viável a partir de amostras que já haviam sido submetidas a extração de DNA estando prontas para a fase do estudo de metilação. O DPP abriga um biorrepositório de amostras utilizadas em vários estudos anteriores, todas provenientes de pacientes com prontuário no HCFMRP-USP, o que possibilitou o levantamento dos dados necessários para os objetivos do estudo. Esta alternativa gerou um impacto negativo no método de randomização, uma vez que a amostra passou a ser não probabilística. Mas, por outro lado, viabilizou a composição de um grupo controle que satisfaz os critérios de inclusão previamente estabelecidos.

Outro ponto a ser considerado é a impossibilidade que houve de composição dos grupos de forma randomizada e de mesma origem do grupo de estudo. Tal limitação impactou negativamente a randomização dos grupos, limitando a força dos resultados finais das análises por *amplicon*. Entretanto, em vista das dificuldades experimentadas, a viabilização do estudo foi conseguida através da adoção de amostras de conveniência. Em vista deste fato, os autores estabeleceram critérios de inclusão rígidos, visando manter a integridade do foco de interesse do estudo, ou seja, ausência de alterações estruturais nos três genes canônicos.

À ocasião deste estudo, os conhecimentos acerca da HF mostravam que o portador da doença já apresentaria níveis sérios de LDL alterados desde os dois anos de idade.¹¹ O pré-requisito de cada sujeito do grupo controle ter pelo menos duas dosagens de colesterol menores que 100mg/dL, pôde, em tese, garantir a integridade

estrutural e molecular dos genes canônicos. O raciocínio utilizado para esta conclusão foi o inverso da literatura de referência da HF, pois se a doença cursa com alterações de LDL detectáveis já aos dois anos de idade, poderíamos inferir que o posto seria verdadeiro, ou seja, sujeitos acima de dois anos com LDL baixos em tese teriam seus genes canônicos íntegros e sem alterações moleculares.

Para a inclusão neste estudo, os sujeitos do grupo de estudo deveriam ter dosagens de LDL maiores que 190mg/dL, e os do grupo controle dosagens de LDL menores que 100mg/dL, independente da idade. A escolha de um nível sérico tão diferente foi adotada na busca do máximo possível de especificidade quanto a presença e ausência de HF nos grupos de estudo e controle, respectivamente.

Durante a fase de execução laboratorial, o desenho do *primer APOB* trouxe dificuldades. O desenho foi realizado a partir do programa *Methyl Primer Express* (ThermoFisher®), mesmo método utilizado para o desenho do *PCSK-9*, que não apresentou problemas. Entretanto, o *primer* inicialmente desenhado não cumpria a fase de anelamento, conforme esperado. Foram necessárias algumas reuniões dos autores com a equipe laboratorial e também com a equipe da Disciplina de Genética Médica da FMRP-USP a fim de revisão da técnica anteriormente utilizada para o desenho, e traçar novas estratégias para viabilização do *primer*. Somente o quarto *primer* desenhado cumpriu a fase de anelamento do processo, o que resultou em atraso no planejamento inicial e aumento do custo do projeto.

Apesar de todas as dificuldades e limitações, vários pontos positivos podem ser considerados neste estudo.

Em primeiro lugar, é de extrema importância citar o ineditismo desta investigação. Não há outros estudos publicados que foram desenhados para testar a hipótese de origem epigenética da HF. Em vista do aumento exponencial de publicações sobre epigenética ao longo da década de 2010, e da ausência de alterações estruturais nos genes canônicos em 20 a 40% dos pacientes com critérios clínicos positivos para HF, foi natural o levantamento desta possibilidade. O fato que não haver publicações relacionadas em meados de 2015 chamou a atenção dos autores, fomentando o desenho deste estudo.

Em segundo lugar, os critérios de inclusão, não inclusão e exclusão utilizados foram rigorosos, a fim de minimizar o risco de inclusão de sujeitos com alterações de colesterol não decorrente de HF. Por isso, amostras que deixassem dúvidas sobre outras origens da hipercolesterolemia ou que não tivessem todos os dados

disponíveis, não foram incluídas. Entre as opções de: 1) aumentar o número de amostras, porém com dados parciais, ou 2) garantir a qualidade dos dados e aumentar a confiabilidade dos critérios HF+ e HF-, abrindo mão da quantidade final de amostras, os autores escolheram a segunda assertiva.

Em terceiro lugar, apesar da heterogeneidade dos grupos, o nicho de exploração da hipótese foi preservado pelos filtros dos critérios de inclusão e de exclusão. Mesmo que os sujeitos que compuseram o grupo controle tivessem outras doenças, os filtros estabelecidos aumentaram a probabilidade de os genes de interesse estarem livres de influências externas, pois não foi incluído nenhuma amostra com LDL acima de 100mg/dL.

Em quarto lugar, todos os objetivos do projeto foram cumpridos, todas as ilhas planejadas de serem estudadas de fato o foram.

E em quinto lugar, houve um achado de associação positiva que afastou a hipótese nula do estudo, com significância estatística, para a população e critérios estabelecidos.

Vale considerar que, pelo fato de o desenho do estudo não ter sido perfeito, este achado pode ter sido fruto de variáveis que não foram possíveis de serem controladas. Por outro lado, os autores acreditam que o resultado encontrado é uma janela de oportunidades para investigações mais robustas sobre a origem epigenética da HF. Há muito o que ser explorado sobre a expressão dos genes canônicos: modificações de histonas (metilação, ubiquitinação, acetilação), ação de micro RNA não codificantes, e mesmo nova investigação de metilação das ilhas CpG em pacientes com metodologia de randomização mais próximos do ideal.

Poderíamos inferir, ainda, que eventos epigenéticos possam fazer parte do metabolismo normal do colesterol, mesmo em pessoas não dislipidêmicas, o que poderia explicar a ausência de correlação positiva nas outras três ilhas CpG que esta investigação mostrou.

De qualquer forma, este achado não pode ser minimizado.

Concluindo, o percurso desta investigação apresentou diversas dificuldades e passou por várias limitações. Entretanto, se empenharam para contornar todas elas, encontrando um resultado que pode abrir um novo caminho para os conhecimentos acerca do metabolismo do colesterol e a gênese da HF.

5. Conclusões

5 CONCLUSÕES

5.1 Conclusões parciais

- Foi observada associação entre o estado de metilação total da ilha 2 do gene *LDLR* e a presença de fenótipo HF em pacientes sem alterações estruturais nos três genes relacionados;
- Não foi observada associação entre o estado de metilação total da ilha 1 do gene *LDLR* e a presença de fenótipo HF em pacientes sem alterações estruturais nos três genes relacionados;
- Não foi observada associação entre o estado de metilação total do gene *APOB* e a presença de fenótipo HF em pacientes sem alterações estruturais nos três genes relacionados;
- Não foi observada associação entre o estado de metilação total do gene *PCSK-9* e a presença de fenótipo HF em pacientes sem alterações estruturais nos três genes relacionados.

5.2 Conclusão final

- Foi encontrada uma associação positiva entre um evento epigenético (o estado de metilação total da segunda ilha CpG da região promotora do gene *LDLR*) e o fenótipo HF na população estudada.

6. Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas*

1. Rodwell VW, Murray RK. Bioquímica e medicina. In: Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA. Bioquímica ilustrada de Harper. 30ª Ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2017. p.1-5.
2. Botham KM, Mayes PA. Lipídeos de importância fisiológica. In: Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA. Bioquímica ilustrada de Harper. 30ª Ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2017. p.211-22.
3. Hall JE, Guyton AC. Tratado de fisiologia médica. 12ªEd. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. Capítulo 2, A célula e suas funções; p.11-26.
4. Fernández-Pérez EJ, Sepúlveda FJ, Peters C, Bancuñán D, Riffo-Lepe NO, González-Sanmiguel J, et al. Effect of cholesterol on membrane fluidity and association of AB oligomers and subsequent neuronal damage: a double-edged sword. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2018 Aug;10(Article 226):1-14.
5. Hall JE, Guyton AC. Tratado de fisiologia médica. 12ªEd. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. Capítulo 4, O transporte de substâncias através das membranas celulares; p.45-57.
6. Hall JE, Guyton AC. Tratado de fisiologia médica. 12ªEd. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. Capítulo 68, Metabolismo dos lipídeos; p.861-73.
7. Botham KM, Mayes PA. Síntese, transporte e excreção do colesterol. In: Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA. Bioquímica ilustrada de Harper. 30ª Ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2017. p.266-79.
8. Santos TM. Lipídios. In: Dutra-de-Oliveira JE, Marchini JS. Ciências nutricionais: aprendendo a aprender. 2ª Ed. São Paulo: Sarvier, 2008. p.107-21.
9. Jones PJH, Kubow S. Lipídeos, esteróis e seus metabólitos. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ. Nutrição moderna na saúde e na doença. 2ª Ed. Barueri: Manole, 2009. p.100-32.
10. Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol* 2013;101(4Supl.1):1-22.

---

* De acordo com Estilo Vancouver.

11. Santos RD, Gagliardi ACM, Xavier HT, Casella Filho A, Araújo DB, Cesena FY, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). Arq Bras Cardiol 2012;99(2Supl. 2):1-28.
12. Brunzell JD, Fainor RA. Diagnosis and treatment of dyslipidemia. ACP Medicine. 2010;1-23.
13. Kritchevsky D. Colesterol e outros esteróis da dieta. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ. Nutrição moderna na saúde e na doença. 2ª Ed. Barueri: Manole, 2009. p.133-46.
14. Chistiakov DA, Grechko AV, Myasoedova VA, Melnichenko AA, Orekhov AN. The role of monocytosis and neutrophilia in atherosclerosis. J Cell Mol Med. 2018;22(3):1366-82.
15. Kalampogias A, Siasos G, Oikonomou E, Tsalamandris S, Morouzis K, Tsigkou V, et al. Basic mechanisms in atherosclerosis: the role of calcium. Med Chem. 2016;12(2):103-13.
16. Grundy SM. Nutrição no controle dos distúrbios dos lipídeos séricos e das lipoproteínas. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ. Nutrição moderna na saúde e na doença. 2ª Ed. Barueri: Manole, 2009. p.1157-76.
17. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Saúde e Vigilância de Doenças Não-Transmissíveis. Principais causas de morte. Acessado em 07/09/2020. Disponível em: <http://svs.aids.gov.br/dantps/centrais-de-conteudos/paineis-de-monitoramento/mortalidade/gbd-brasil/principais-causas/>
18. Garcia J, Benedeti ACGS, Caixe SH, Mauad-Filho F, Nogueira-de-Almeida CA. Avaliação ultrassonográfica do complexo médio-intimal das carótidas comuns em crianças eutróficas e portadoras de sobrepeso/obesidade. J Vasc Bras. 2019;18:e20190003.
19. Turgeon RD, Barry AR, Pearson GJ. Familial Hypercholesterolemia: review of diagnosis, screening and treatment. Can Fam Physician. 2016 Jan;62(1):32-7.
20. Paula ID, Machado JC. Dislipidemias. In: Vannucchi H, Marchini JS. Nutrição Clínica. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2012. p.205-20.
21. Zorzo RA. A importância de uma alimentação saudável para um desenvolvimento físico e mental adequados. Pediatria Moderna. 2015 Ago; 51(8): 283-8.

22. Mello ED, Nogueira-de-Almeida CA, Mello PC, Mello PD. Dislipidemia. In: Nogueira-de-Almeida CA, Mello ED. *Nutrologia Pediátrica, Prática Baseada em Evidências*. Barueri: Manole, 2016. P.457-82.
23. Nogueira-de-Almeida CA, Zorzo RA, Mello ED, Mello PP, Mello PD, Ribas-Filho D. Consenso da Associação Brasileira de Nutrologia sobre manejo da dislipidemia secundária à obesidade infanto-juvenil. *International Journal of Nutrology*, v.10, n.4, p. 161-178, Set / Dez 2017.
24. Smiderle L, Fiegenbaum M. Aspectos nutrigenéticos nas dislipidemias. In: Dal Bosco SM, Genro JP. *Nutrigenética e implicações na saúde humana*. São Paulo: Atheneu; 2014. p.141-147.
25. Anderson KM, Castelli WP, Levy D. Cholesterol and mortality: 30 years of follow-up from the Framingham study. *JAMA*. 1987;257(16):2176-80.
26. Yi SW, Yi JJ, Ohrr H. Total cholesterol and all-cause mortality by sex and age: a prospective cohort study among 12.8 million adults. *Sci Rep*. 2019;9:1596. Acessado em 29/03/2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38461-y>
27. Brown MS, Goldstein JL. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Sci Am*. 1984 Nov;251(5):58-66.
28. Youngblom E, Knowles JW. Familial hypercholesterolemia. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, et al. *GeneReviews* [website]. Seattle (WA): University of Washington, 2014.
29. Nordestgaard BG, Chapman MF, Humphries SE, Ginsberg HN, Masana L, Descamps OS, et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease. *Eur Heart J*. 2013 Dec;34(45):3478-90.
30. Martin AC, Coakley J, Forbes DA, Sullivan DR, Watts GF. Familial hypercholesterolaemia in children and adolescents: a new paediatric model of care. *J Paediatr Child Health*. 2013 Apr;49(4):E263-272.
31. Wiegman A, Gidding SS, Watts GF, Chapman MJ, Ginsberg HN, Cuchel M, et al. Familial hypercholesterolaemia in children and adolescents: gaining decades of life by optimizing detection and treatment. *Eur Heart J*. 2015 Sep;36(36):2425-37.
32. Fontelles CC, Guido LN, Andrade FO, Ong TP. Nutrição e Epigenética. In: Dal Bosco SM, Genro JP. *Nutrigenética e implicações na saúde humana*. São Paulo: Atheneu; 2014. p.179-200.

33. Noble D. Conrad Waddington and the origin of epigenetics. *Journal of Experimental Biology*. 2015;218:816-8.
34. Bertuzzi G, Genro JP, Contini V. Conceitos básicos em genética. In: Dal Bosco SM, Genro JP. *Nutrigenética e implicações na saúde humana*. São Paulo: Editora Atheneu; 2014. Introdução. p.1-10.
35. Silva G, Duarte LFD. Epigênese e Epigenética: as muitas vidas do vitalismo ocidental. *Horizontes Antropológicos*. 2016;22(46):425-53.
36. Barker DJP. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ*. 1995;311:171-4.
37. Lopes VP, Maia JAR. Períodos críticos ou sensíveis: revisitar um tema polêmico à luz da investigação empírica. *Rev Paul Educ Fís*. 2000;14(2):128-40.
38. Why 1,000 days. In: Huang C, Cerrell SG, Kissane B, Bates N, Alipui N, Isaacs S. 1,000 Days [website]. Acessado em 30/03/2020. Disponível em: <https://thousanddays.org/why-1000-days/>
39. Deodati A, Inzaghi E, Liguori A, Puglianiello A, Germani D, Brufani C, et al. IGF methylation is associated with lipid profile in obese children. *Horm Res Paediatr*. 2013;79:361-367.
40. Aslibekyan S, Claas SA, Arnett DK. Clinical applications of epigenetics in cardiovascular disease: the long road ahead. *Transl Res*. 2015 Jan;165(1):143-153.
41. Liu N, Pan T. RNA epigenetics. *Transl Res*. 2015 Jan;165(1):28-35.
42. Wijnands KPJ, Obermann-Borst SA, Steegers-Theunissen RPM. Early life lipid profile and metabolic programming in very young children. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2015 Jun;25(6):608-14.
43. Schwenk RW, Vogel H, Schurmann A. Genetic and epigenetic control of metabolic health. *Mol Metab*. 2013 Sep 25;2(4):337-347.
44. Probst AV, Dunleavy E, Almouzni G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009;10(3):192-206.
45. Hall JE. Controle genético da síntese de proteínas, do funcionamento celular e da reprodução celular. In: *Tratado de fisiologia médica*. 12ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. Capítulo 3. p.27-42.
46. Eberharter A, Becker PB. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. *EMBO Rep*. 2002;3(3):224-9.

47. Meaney S. Epigenetic regulation of cholesterol homeostasis. *Front Genet.* 2014; 5:311.
48. Martinez-Jimenez CP, Sandoval J. Epigenetic crosstalk: a molecular language in human metabolic disorders. *Front Biosci (Schol Ed).* 2015 Jun 1;7:46-57.
49. Kwon M, Han SM, Kim DI, Rhee MY, Lee BK, Ahn YK, et al. Evaluation of polygenic cause in Korean patients with familial hypercholesterolemia - A study supported by Korean Society of Lipidology and Atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2015 Sep;242(1):8-12.
50. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo Demográfico de 2010. Acessado em 02/04/2020. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/9662-censo-demografico-2010.html?=&t=resultados>.
51. Enarson DA, Kennedy SM, Miller DL. Choosing a research study design and selecting a population to study. In *J Tuberc Lung Dis.* 2004;8(9):1151-6.
52. Hipercol-Brasil [website]. Instituto do Coração, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Acessado em 24/02/2020. Disponível em: www.hipercolbrasil.com.br.
53. Human (Homo sapiens) Genome Browser Gateway [website]. Santa Cruz (CA): Universidade da Califórnia em Santa Cruz, Estados Unidos da América. Acessado em 09/12/2015. Disponível em: <http://www.genome.ucsc.edu>.
54. Primer. Scitable by Nature Education [website]. Estados Unidos da América. Acessado em 13/04/2020. Disponível em: <https://www.nature.com/scitable/definition/primer-305/>.
55. Laurie AD, George PM. Evaluation of high-resolution melting analysis for screening the LDL receptor gene. *Clin Biochem.* 2009 Apr;42(6):528-35.
56. Jaric M, Segal J, Silva-Herzog E, Schneper L, Mathee K, Narasimhan G. Better primer design for metagenomics applications by increasing taxonomic distinguishability. *BMC Proc.* 2013 Dec;7(Suppl 7):S4.
57. Khan Academy Brasil. Reação em cadeia da DNA Polimerase [vídeo]. YouTube, 2016. 8min 26seg. Acessado em 19/04/2020. Disponível em: https://www.youtube.com/watch?v=ewt3k_C4JbQ.
58. Khan Academy Brasil. Reação em cadeia da polimerase (PCR) [website]. Acessado em 19/04/2020. Disponível em: <https://pt.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>.
59. Tomaz PRX, Santos JR, Santos PCJL. Aspectos da aplicabilidade da análise da curva de *melting*. *RBAC.* 2016;48(1):19-23.

60. Patterson K, Molloy L, Qu W, Clark S. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *J Vis Exp*. 2011 Oct;56(e3170):1-9. doi:10.3791/3170.
61. Atawodi SE, Atawodi JC, Dzikwi AA. Polymerase chain reaction: theory, practice and application: a review. *Sahel Med J*. 2010;13(2):54-63.
62. Gundry CN, Dobrowolski SF, Martin YR, Robbins TC, Nay LM, Boyd N, et al. Base-pair neutral homozygotes can be discriminated by calibrated high-resolution melting of small amplicons. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jun;36(10):3401-8.
63. Kotrla T. Nucleic acid amplification, Temperature of melting [website]. Austin Community College. [Acessado em 16/04/2020]. Disponível em: https://www.austincc.edu/mlt/mdfund/mdfund_unit9assignmentsMeltingTemperature.html.
64. Tong BY, Leung MLC. Correlation between percentage guanine-cytosine content and melting temperature of deoxyribonucleic acid. *Biopolymers*. 1977;16(6):1223-31.
65. Cousins MM, Swan D, Magaret CA, Hoover DR, Eshleman SH (2012) Analysis of HIV Using a High Resolution Melting (HRM) Diversity Assay: Automation of HRM Data Analysis Enhances the Utility of the Assay for Analysis of HIV Incidence. *PLOS ONE* 7(12): e51359.
66. Smith E, Jones ME, Drew PA. Quantitation of DNA methylation by melt curve analysis. *BMC Cancer*. 2009;9:123-35.
67. Silva LPM. Segmentos proporcionais. Brasil Escola. [Acessado em 11/06/2020]. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/matematica/segmentos-proporcionais.htm>.
68. Martinez EZ. Bioestatística para os cursos de graduação da área da saúde. São Paulo: Blucher, 2015. Capítulo 12, Comparações entre médias populacionais, p.207-35.
69. Pagano M, Gauvreau K. In: Princípios de bioestatística. 2ª Ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2004. Capítulo 15, Tabelas de contingência, p.304-31.
70. Wagner MB, Callegari-Jacques SM. Medidas de associação em estudos epidemiológicos: risco relativo e *odds ratio*. *J Pediatr*. 1998;74(3):247-51.
71. Pagano M, Gauvreau K. In: Princípios de bioestatística. 2ª Ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2004. Capítulo 6, Probabilidade, p.113-46.

72. Martinez EZ. Bioestatística para os cursos de graduação da área da saúde. São Paulo: Blucher, 2015. Capítulo 10, Intervalo de confiança para a média populacional, p.183-94.
73. Pagano M, Gauvreau K. In: Princípios de bioestatística. 2ª Ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2004. Capítulo 10, Testes de hipóteses, p.209-31.
74. Martinez EZ. Bioestatística para os cursos de graduação da área da saúde. São Paulo: Blucher, 2015. Capítulo 11, Testes de hipóteses, p.195-208.
75. Kim MK, Han K, Kim HS, Park YM, Kwon HS, Yoon KH, et al. Cholesterol variability and the risk of mortality, myocardial infarction and stroke: a nationwide population-based study. Eur Heart J. 2017;38:3560-6.
76. Harlow KE, Africa JA, Wells A, Belt PH, Behling CA, Jain AK, et al. Clinically actionable hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia in children with nonalcoholic fatty liver disease. J Pediatr. 2018;198:76-83.
77. Suzuki K. The developing world of DOHaD. J Dohad. 2018;9(3):266-9.
78. Luiz RR, Magnanini MMF. A lógica da determinação do tamanho da amostra em investigações epidemiológicas. Cadernos de Saúde Coletiva. Rio de Janeiro. 2000;8(2):9-28.
79. Clayton-Jr A, Vox B, Mullen-Jr L, Edge T. Songs of innocence [sound album]. Mouse D, Tedder R, Gafney D, producers. Universal-Island Records Ltd; 2014. 1 audio file: 48m11s.

7. Apêndices

APÊNDICE A – Cronograma de execução dos trabalhos

2016	1º semestre	• Idealização do projeto • Revisão da literatura, <i>draft</i> do projeto, orçamento inicial • Primeira reunião com estatístico • Reuniões com equipe de planejamento e execução • Primeiro contato com equipe HiperCol Brasil
	2º semestre	• Agosto → Viagem a São Paulo para reunião com equipe HipercolBrasil e disponibilização das amostras de formação do grupo de estudo • Setembro a novembro → Redação do Projeto de Pesquisa, submissão ao CEP e à UPC do HCFMRP-USP com aprovação em ambos • Dezembro → autor principal aprovado no Programa de Pós Graduação nível Doutorado no Programa de Saúde da Criança da FMRP-USP
2017	1º semestre	• Cumprimento de 2 disciplinas do Programa (7 créditos) • Reuniões com equipe do laboratório do Centro de Medicina Genômica do HCFMRP-USP para planejamento técnico
	2º semestre	• Cumprimento de 3 disciplinas do Programa (11 créditos) • Levantamento da lista de insumos a serem adquiridos e orçamento • Aquisição dos primeiros insumos • 2ª reunião com estatístico
2018	1º semestre	• Análise da planilha com dados clínicos dos pacientes relativos às amostras do grupo de estudo → seleção dos elegíveis segundo critérios de inclusão, formação do grupo de estudo • Início do trabalho em laboratório → desenho dos <i>primers</i>, modificação com bissulfito de sódio de todas as amostras do grupo de estudo, ensaio de metilação dos <i>amplicons</i> <i>LDLR/Ilha-1</i>, <i>LDLR/Ilha-2</i> e <i>PCSK-9</i>
	2º semestre	• Cumprimento de 1 disciplina do Programa (4 créditos), completando a quantidade créditos exigidos para defesa • 3ª reunião com estatístico • Seleção de amostras para o grupo controle • Trabalho em laboratório → inclusão do grupo controle, desenho dos <i>primers</i>, modificação com bissulfito de sódio de todas as amostras • Redação de relatórios • 29 de novembro → aprovação no Exame de Qualificação
2019	1º semestre	• Trabalho em laboratório → ensaio de metilação dos <i>amplicons</i> <i>LDLR/Ilha-1</i>, <i>LDLR/Ilha-2</i> e <i>PCSK-9</i> do grupo controle • Reuniões com equipe de laboratório e da Disciplina de Genética Médica da FMRP-USP para novas tentativas de desenho do <i>primer</i> <i>APOB</i>
	2º semestre	• Trabalho em laboratório → ensaio de metilação do <i>amplicon</i> <i>APOB</i> das amostras dos dois grupos • Revisão da literatura • 4ª reunião com estatístico • Análise estatística dos dados encontrados
2020	1º semestre	• Redação e revisão da tese → Introdução, Métodos
	2º semestre	• Redação e revisão da tese → Resultados, Discussão e Conclusões • Redação do artigo científico e submissão à revista <i>Journal of Epigenetics</i> • 16 de dezembro → Defesa pública da tese, com aprovação por unanimidade

APÊNDICE B – Investimento do projeto

Tabela 12 – Investimento do projeto

Data	Histórico	Fornecedor	Valor (R\$)	Financiado por
23/08/2016	Viagem a São Paulo		595,20	Autores
13/12/2017	Kit metilação	Synapse	4.444,39	FAEPA
09/01/2018	Epitect Control DNA	SilLife	5.470,10	Autores
22/02/2018	Kit BDT + tampão	ThermoFisher	5.501,00	DPP FMRP-USP
23/02/2018	Placas 6 poços	ThermoFisher	1.349,00	DPP FMRP-USP
23/02/2018	Adesivos para placa	ThermoFisher	741,00	DPP FMRP-USP
06/03/2018	MeltDoctor HRM	ThermoFisher	4.401,00	DPP FMRP-USP
09/03/2018	Primers	ThermoFisher	1.924,67	Autores
05/07/2018	MeltDoctor HRM	ThermoFisher	4.007,90	Autores
12/07/2018	Primers	ThermoFisher	74,78	Autores
04/12/2018	Kit metilação	Synapse	1.753,58	Autores
09/05/2019	Primers	ThermoFisher	76,08	Autores
25/07/2019	Primers	ThermoFisher	88,50	Autores
Total de investimento público			16.404,39	54%
Total de investimento pelos autores			13.990,81	46%
Investimento total do projeto			30.427,20	100%

FAEPA = Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do HCFMRP-USP

Fonte: Tabela elaborada pelo autor

APÊNDICE C – Artigo submetido a publicação (Abstract)

Correlation between methylation of *LDLR* gene and clinical diagnosis of Familial Hypercholesterolemia

Zorzo RA¹, Liberatore RDR Jr², Suen VMM³, Silva Jr WA⁴, Suazo VK⁵, Honorato ALSC⁶

Summary

- Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal codominant disease that has an estimated prevalence of 1:500 in general population. When not diagnosed early, its outcomes in coronary artery and brain disease tend to have an early presentation, with a high risk of death. Its origin is related to a mutation in the *LDLR*, *APOB* and *PCSK-9* genes, however in 20 to 40% of the cases no structural changes are found in these genes. The hypothesis of this study is that, in these patients, methylated DNA patterns could explain the origin of the phenotype. The study group consisted of 50 DNA samples from patients with a clinical diagnosis of FH by the Dutch Clinic Lipid Network Criteria and with a negative methylation study for the three genes. The control group consisted of 46 samples from patients with normal blood lipid levels. The samples were subjected to methylation screening of the *LDLR* gene and the prevalence of patients among exposed and unexposed patients was compared. We found positive methylation in 47 samples in the study group and 29 in the control group. The prevalence of patients among those exposed was 61.8% and among those not exposed 15%. The prevalence ratio found was 4.12 (95% CI 1.43-11.88). Taking into account the physiological role of the *LDLR* gene in the metabolism of lipoproteins, we conclude that this result points to a possible association between the methylation profile of the *LDLR* gene and the clinical presentation of FH.

1. Mastering Degree. Professor of Faculty of Medicine of Estacio UniSEB University, Ribeirão Preto, Brazil. Post-graduation student (PhD level) by Children and Adolescents Health in Ribeirão Preto School of Medicine, São Paulo University, Brazil.
2. PhD. Professor Associated in Pediatrics Department in Ribeirão Preto School of Medicine, São Paulo University, Brazil.
3. Professor of Genetics in Ribeirão Preto School of Medicine, São Paulo University, Brazil.
4. Mastering Degree. Biologist. Employee of Pediatrics Department, Pediatric Endocrinology. Ribeirão Preto School of Medicine, São Paulo University, Brazil.
5. PhD. Biologist. Researcher of Genetic Department in Ribeirão Preto School of Medicine, São Paulo University, Brazil.

8. Anexos

ANEXO A – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP

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

Ribeirão Preto, 22 de junho de 2016.

Ofício nº 2087/2016
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 8077/2016

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado **“ESTUDO DE ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 430ª Reunião Ordinária realizada em 20/06/2016, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como a solicitação de dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Incor, TCLE maiores de 18 anos, TCLE Pais e Termo de Assentimento.**

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

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

Atenciosamente,

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

Ilustríssimos Senhores

DR. RENATO AUGUSTO ZORZO

PROF. DR. RAPHAEL DEL ROIO LIBERATORE JUNIOR (Orientador)

Depto. de Puericultura e Pediatria

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil /CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ANEXO B – Aprovação da Unidade de Pesquisa Clínica do HCRP

PROJETO DE PESQUISA

Ribeirão Preto, 09 de MARÇO de 2016.

Ilustríssima Senhora
Profª. Drª. Márcia Guimarães Villanova
MD. Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Do HCFMRP e da FMRP-USP

Senhora Coordenadora,

Encaminho em anexo o projeto de pesquisa intitulado ESTUDO DE ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR, juntamente com a documentação necessária para avaliação ética deste Comitê.

O projeto de pesquisa acima mencionado será desenvolvido no departamento de DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA.

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

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

Atenciosamente,

RAPHAEL DEL ROIO LIBERATORE JUNIOR
RENATO AUGUSTO ZORZO

De acordo:

DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA
Carimbar e Assinar
Chefe do Laboratório/Laboratório
Carimbar e Assinar

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

ANEXO C – Termo de doação das amostras do InCor para este estudo

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
INSTITUTO DO CORAÇÃO – INCOR**

São Paulo, 05 de fevereiro de 2.016

Ao Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP

Prezados Senhores,

Venho por meio desta informar que o pesquisador RENATO AUGUSTO ZORZO, sob orientação do PROF. DR. RAPHAEL DEL ROIO LIBERATORE JR, usará amostras de sangue de pacientes que fazem parte do projeto Hipercol Brasil, atualmente mantidos sob minha responsabilidade, para fins específicos e exclusivos de desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado ESTUDO DE ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR.

Atenciosamente,

_____
Profa. Dra. Cinthia Elim Jannes
Coordenadora Hipercol Brasil

ANEXO D – Ficha do Aluno (Doutorado) emitida pelo sistema de Pós-Graduação da FMRP-USP

17144 - 5349929 / 1 - Renato Augusto Zorzo

Email: renatozorzo@usp.br

Data de Nascimento: 05/08/1974

Cédula de Identidade: RG - 23.577.800-X - SP

Local de Nascimento: Estado de São Paulo

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Médico - Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro - Minas Gerais - Brasil - 1998

Mestrado: Mestre em Ciências Médicas - Área: Clínica Médica - Opção: Investigação Biomédica - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2008

Curso: Doutorado

Programa: Saúde da Criança e do Adolescente

Área: Saúde da Criança e do Adolescente - Opção: Investigação em Pediatria

Data de Matrícula: 06/12/2016

Início da Contagem de Prazo: 06/12/2016

Data Limite para o Depósito: 07/12/2020

Orientador: Prof(a). Dr(a). Carlos Eduardo Martinelli Junior - 06/12/2016 até 11/09/2017 Email: cemart@fmrp.usp.br

Orientador: Prof(a). Dr(a). Raphael Del Roio Liberatore Junior - 12/09/2017 até 16/12/2020 Email: rliberatorejr@gmail.com

Proficiência em Línguas:

Inglês, Aprovado em 06/12/2016

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 29/11/2018

Data do Depósito do Trabalho: 09/10/2020

Título do Trabalho: "Análise do perfil de metilação dos genes LDLR, APOB e PCSK-9 em portadores de Hipercolesterolemia Familiar sem alterações moleculares"

Data Máxima para Aprovação da Banca: 23/11/2020

Data de Aprovação da Banca: 03/11/2020

Data Máxima para Defesa: 18/02/2021

Data da Defesa: 16/12/2020

Resultado da Defesa: Aprovado

Acesso à 'Banco de Teses da USP'

A titulação é: Somente USP

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 06/12/2016
Titulado em 16/12/2020

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 7493 em vigor a partir de 29/03/2018).

Última ocorrência: Titulado em 16/12/2020

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
RPP5724-4/3	Metodologia Científica	06/03/2017	17/04/2017	75	5	100	A	N	Concluída
RPP5723-3/5	Fundamentos de Bioestatística	17/04/2017	08/05/2017	30	2	100	A	N	Concluída
RPP5709-8/1	Distúrbios Nutritivos Crônicos - Aspectos Pediátricos	07/08/2017	03/09/2017	60	4	87	B	N	Concluída
RPP5721-5/1	Metodologia e Prática Docente em Medicina	16/10/2017	23/11/2017	45	3	90	A	N	Concluída
RPP5726-4/2	Nutrição na Criança Gravemente Enferma: Abordagem Sistêmica e das Ciências Ômicas	20/11/2017	03/12/2017	60	4	100	A	N	Concluída
RFI5809-1/2	Controle Neuroendócrino do Comportamento Ingestivo	14/05/2018	27/05/2018	30	0	-	-	N	Turma cancelada
NUT5707-1/3	Genômica Nutricional e Obesidade	03/09/2018	16/12/2018	60	4	88	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	10	20	22
Estágios:			
Total:	10	20	22

Créditos Atribuídos à Tese: 152

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Comissão julgadora da tese de doutorado:

NUSP	Nome	Vínculo	Função
2097805	Raphael Del Roio Liberatore Junior	FMRP - USP	Presidente
421149	Carlos Alberto Nogueira de Almeida	UNAERP - Externo	
1627651	Paulo Henrique Manso	FMRP - USP	
1935040	Raul Dias dos Santos Filho	FM - USP	

Este documento eletrônico dispensa carimbo e assinatura. Sua autenticidade pode ser comprovada fornecendo-se o código de controle na seguinte página da Universidade de São Paulo: <https://uspdigital.usp.br/iddigital>

Documento emitido às 21:08:15 horas do dia 08/01/2021 (hora e data de Brasília)

Código de controle: D28B-K3GZ-HCKZ-IY64

Código de controle válido até: 08/02/2021

ANEXO E – Ficha do Aluno (Mestrado) emitida pelo sistema de Pós-Graduação da FMRP-USP

17138 - 5349929 / 1 - Renato Augusto Zorzo

Email: renatozorzo@usp.br

Data de Nascimento: 05/08/1974

Cédula de Identidade: RG - 23.577.800-X - SP

Local de Nascimento: Estado de São Paulo

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Médico - Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro - Minas Gerais - Brasil - 1998

Curso: Mestrado

Programa: Medicina (Clínica Médica)

Área: Clínica Médica - Opção: Investigação Biomédica

Data de Matrícula: 25/02/2005

Início da Contagem de Prazo: 25/02/2005

Data Limite para o Depósito: 25/02/2008

Orientador: Prof(a). Dr(a). José Abrão Cardeal da Costa - 25/02/2005 até 03/04/2008 Email: jacdcost@fmrp.usp.br

Proficiência em Línguas:

Inglês, Aprovado em 01/02/2005

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 28/05/2007

Data do Depósito do Trabalho: 18/02/2008

Título do Trabalho: "Perfil clínico-epidemiológico de 121 crianças e adolescentes com doença renal crônica: 22 anos de experiência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo"

Data Máxima para Aprovação da Banca: 18/04/2008

Data de Aprovação da Banca: 05/03/2008

Data Máxima para Defesa: 03/06/2008

Data da Defesa: 03/04/2008

Resultado da Defesa: Aprovado

Acesso à 'Banco de Teses da USP'

Histórico de Primeira Matrícula em 25/02/2005

Ocorrências: Titulado em 03/04/2008

Última ocorrência: Titulado em 03/04/2008

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
RCM5780-5/1	Treinamento Didático-Clínico	10/03/2005	22/06/2005	45	3	82	A	N	Concluída
RPP5701-5/2	Desenvolvimento na Infância	15/03/2005	31/05/2005	180	12	84	A	N	Concluída
RCM5821-1/1	Tópicos Avançados em Fisiopatologia Renal	09/08/2005	28/11/2005	30	2	85	B	N	Concluída
RCM5812-1/6	Aplicação dos Princípios de Didática em Aulas Teóricas Formais	20/03/2006	09/04/2006	45	3	85	A	N	Concluída
RCM5775-5/4	Estatística Aplicada à Biociências I	27/03/2006	09/07/2006	75	0	-	-	N	Matrícula cancelada
RCM5775-6/1	Estatística Aplicada à Biociências I	17/04/2006	08/05/2006	75	5	100	A	N	Concluída
RPP5726-1/2	Nutrição na Criança Gravemente Enferma: Tópicos Avançados Baseados em Evidência	22/05/2006	25/06/2006	45	0	-	-	N	Matrícula cancelada
RCM5811-2/2	Fisiopatologia e Tratamento das Glomerulopatias	01/06/2006	21/06/2006	90	6	100	A	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos	
Para exame de qualificação		Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	20	20	31
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Disciplinas ou Estágios:	10	10	null
Total:	30	30	31

Créditos Atribuídos à Dissertação: 66

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:

NUSP	Nome	Vínculo	Função
64263	José Abrão Cardeal da Costa	FMRP - USP	Presidente
6537883	Eleonora Moreira Lima	UFMG - Externo	
91851	Silvio Tucci Junior	FMRP - USP	

Este documento eletrônico dispensa carimbo e assinatura. Sua autenticidade pode ser comprovada fornecendo-se o código de controle na seguinte página da Universidade de São Paulo: <https://uspdigital.usp.br/iddigital>

Documento emitido às 21:09:18 horas do dia 08/01/2021 (hora e data de Brasília)

Código de controle: DYE4-DQYU-YVA2-8IMH

Código de controle válido até: 08/02/2021