

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Fisiopatologia

Análise farmacogenômica em indivíduos com
hipercolesterolemia familiar

Carolina Dagli Hernandez

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata

São Paulo

2021

RESUMO

DAGLI-HERNANDEZ, C. **Análise farmacogenômica em indivíduos com hipercolesterolemia familiar.** 2021. 174f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Introdução: A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma dislipidemia monogênica com alto risco de desenvolvimento de doença aterosclerótica precoce. As estatinas são o tratamento de primeira linha para pacientes com HF. As estatinas reduzem substancialmente o colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) e têm uma boa eficácia e perfil de segurança. No entanto, alguns pacientes não respondem adequadamente, enquanto outros apresentam eventos adversos relacionados às estatinas (SRAE). Fatores genéticos e não genéticos contribuem para a variabilidade na resposta às estatinas, mas existem poucos estudos sobre fatores farmacogenômicos na população brasileira.

Objetivo: Explorar a associação de variantes genéticas com a resposta aos hipolipemiantes e SRAE em pacientes brasileiros com HF.

Pacientes e Métodos: Pacientes adultos com HF (n=114) foram selecionados e dados clínicos e farmacoterapêuticos foram obtidos. A resposta ao tratamento com estatinas foi considerada como atingindo uma redução do LDL-c de 50%. Amostras de sangue foram obtidas para exames laboratoriais e extração de DNA genômico. Um painel de 84 genes (relacionados a HF e farmacogenes) foi analisado por sequenciamento de genes direcionados a exon (ETGS). Os dados de sequenciamento de DNA foram analisados usando um pipeline de descoberta de variantes. O impacto funcional das variantes em genes relacionados à farmacocinética (PK) e farmacodinâmica (PD) foi avaliado usando um escore de predição de funcionalidade (FPS) e outras ferramentas *in silico*. A resposta do LDL-c a estatinas e ao risco de SRAE foi analisada em portadores de variantes deletérias nos genes PK e PD, com frequência de alelo raro > 5,0% ou 10%, usando análises de regressão linear univariada e multivariada. A análise de modelagem molecular foi usada para explorar o efeito funcional *in silico* de variantes deletérias.

Resultados: Cinquenta e oito (50,8%) dos pacientes com HF responderam às estatinas e 24 (21,0) apresentam SRAE. Obesidade e consumo de álcool foram mais frequentes no grupo de não respondedores (NRE) ($p < 0,05$), enquanto o uso concomitante de ezetimiba e SRAE foram mais prevalentes no grupo de respondedores (RE) ($p < 0,05$). A redução do LDL-c foi maior no grupo RE e nos pacientes com SRAE ($p < 0,05$). ETGS revelou variantes patogênicas em genes relacionados a FH (19 *LDLR*, 1 *APOB* e 1 *PCSK9*), 402 variantes em 23 genes relacionados a PK (186 *missense*, 2 *stop-gain*, 1 *stop-loss*, 10 *frameshift indel*, 5 deleções *in-frame*, 16 em sítios de *splicing*, 29 na região 5'UTR e 153 na região 3'UTR), e 752 variantes em 33 genes relacionados com PD (249 *missense*, 1 *stop-gain*, 9 *start-loss*, 5 *frameshift indel*, 9 *inframe indel*, 26 em sítios de *splicing*, 67 na região 5'UTR e 386 na região 3'UTR). A análise de predição funcional revelou que 21 variantes *missense*, 1 *stop-loss*, 7 *splice-site* e 10 *frameshift / inframe* em genes PK são deletérias. A análise de regressão multivariada de 16 variantes em transportadores ABC e SLC e enzimas que metabolizam CYP com MAF > 10,0% e ajuste para covariáveis não genéticas, revelou que as variantes *ABCC1* rs45511401 (c.2012G>T, p.Gly671Val) e *SLCO1B3* rs60140950 (c.683G>C) aumentam a redução do LDL-c ao tratamento com estatina ($p < 0,05$). A análise de modelagem molecular revelou que Val671 aumenta a interação de *ABCC1* com estatinas em comparação com a proteína de referência (Gly671). Em genes relacionados ao PD, 93 *missense*, 1 *start-loss*, 3 *stop-gain*, 10 *splice-site* and 4 *frameshift* foram considerados deletérios. A variante *missense* *LPA* rs76062330 (c.5468G>T) foi associada a maior redução do LDL-c, mesmo após as correções (p ajustado=0,001). A análise de regressão linear multivariada mostrou que a variante *KIF6* rs20455 (c.2155T>C) reduziu a resposta do LDL-c à atorvastatina ($p=0,014$), enquanto a regressão logística multivariada revelou associação de *LPA* rs3124784 (c.6046C>T) com resposta aumentada às estatinas ($p=0,022$). Variantes deletérias em genes relacionados a PK e PD não foram associadas ao aumento do risco de SRAE em pacientes com FH.

Conclusões: As variantes deletérias *ABCC1* c.2012G>T, *SLCO1B3* c.683G>C, *LPA* c.5468G>T e *LPA* c.6046C>T aumentaram a redução do LDL-c. *KIF6* rs20455 (c.2155T>C), uma variante neutra, diminuiu a redução de LDL-c à atorvastatina. Variantes deletérias não foram associadas ao aumento de risco de SRAE.

Palavras-chave: Hipercolesterolemia Familiar, estatina, farmacogenética, eventos adversos a medicamentos, mialgia.

ABSTRACT

DAGLI-HERNANDEZ, C. **Pharmacogenomic analysis in patients with familial hypercholesterolemia**. 2021. 174p. PhD Thesis – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Introduction: Familial hypercholesterolemia (FH) is a monogenic dyslipidemia with a high risk of developing early atherosclerotic disease. Statins are the first-line treatment of FH patients. Statins substantially reduce low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) and have a good efficacy and safety profile. However, some patients do not respond adequately whereas others experience statin-related adverse events (SRAE). Genetic and non-genetic factors contribute to the variability in the response to statins, but there are few studies on pharmacogenomic factors in the Brazilian population.

Objective: To explore the association of genetic variants with the response to lipid-lowering drugs and SRAE in Brazilian FH patients

Patients and Methods: Adult FH patients (n=114) were selected and clinical and pharmacotherapeutic data were obtained. The response to statin treatment was considered as LDL-c reduction of at least 50%. Blood samples were obtained for laboratory testing and genomic DNA extraction. A panel of 84 genes (related to HF and pharmacogenes) was analyzed by exon-targeted gene sequencing (ETGS). The DNA sequencing data was analyzed using a variant discovery pipeline. The functional impact of variants in pharmacokinetics (PK)- and pharmacodynamics (PD)-related genes was assessed using a functionality prediction score (FPS) and other *in silico* tools. LDL-c response to statin and SRAE risk was in carriers of deleterious variants in PK and PD genes, with minor allele frequency (MAF) > 5.0% or 10%, using univariate and multivariate linear regression analyses. Molecular modeling analysis was used to explore the functional effect in silico of deleterious variants.

Results: Fifty-eight (50.8%) of the FH patients responded to statins and 24 (21.0) had SRAE. Obesity and alcohol consumption were more frequent in the non-responder (NRE) group (p<0.05), whereas the concomitant use of ezetimibe and SRAE were more prevalent in the responder (RE) group (p<0.05). LDL-c reduction was higher in RE group and in patients with SRAE (p<0.05). The ETGS revealed 21 pathogenic variants in FH-related genes (19 *LDLR*, 1 *APOB* and 1 *PCSK9*), 402 variants in 23 PK-related genes (186 missense, 2 stop-gain, 1 stop-loss, 10 frameshift indel, 5 inframe deletions, 16 in splicing region, 29 in the 5'UTR region, and 153 in the 3'UTR region), and 752 variants in 33 PD-related genes (249 missense, 1 stop-gain, 9 start-loss, 5 frameshift indel, 9 inframe indel, 26 in splice-sites, 67 in the 5'UTR region, and 386 in the 3'UTR region). Functional prediction analysis revealed 21 missense, 1 stop-loss, 7 splice and 10 frameshift/inframe variants in PK genes are deleterious. Multivariate regression analysis of 16 variants in ABC and SLC transporters and CYP metabolizing enzymes with MAF > 10.0% and adjustment for non-genetic covariates, revealed that *ABCC1* rs45511401 (c.2012G>T, p.Gly671Val) and *SLCO1B3* rs60140950 (c.683G>C) increased LDL-c reduction to statin treatment (p<0.05). Molecular modeling analysis revealed that Val671 enhance the interaction of *ABCC1* with statins compared with reference protein (Gly671). In PD-related genes, 93 missense, 1 start-loss, 3 stop-gain, 10 splice-site and 4 frameshift variants were predicted to be deleterious. The missense variant *LPA* rs76062330 (c.5468G>T) was associated with higher LDL-c reduction, even after corrections (Adjusted p=0.001). Multivariate linear regression analysis showed that the variant *KIF6* rs20455 (c.2155T>C) reduced the LDL-c response to atorvastatin (p=0.014), whereas multivariate logistic regression revealed association of *LPA* rs3124784 (c.6046C>T) with increased response to statins (p=0.022). Deleterious variants in PK- and PD- related genes were not associated with increased risk of SRAE in FH patients.

Conclusions: The deleterious variants *ABCC1* c.2012G>T, *SLCO1B3* c.683G>C, *LPA* c.5468G>T and *LPA* c.6046C>T enhanced LDL-c reduction in FH patients. *KIF6* rs20455 (c.2155T>C), a neutral variant, decreased LDL-c reduction to atorvastatin. Deleterious variants in PK and PD genes were not associated with increased risk of SRAE.

Keywords: Familial hypercholesterolemia, statin, pharmacogenetics, adverse drug events, myalgia.