

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia- Fisiopatologia e Toxicologia

Departamento de Análises Clínicas

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DOS GENES *LDLR*, *PCSK9* E *LDLRAP1* EM
PACIENTES PORTADORES DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAL**

Elisangela da Silva Rodrigues Marçal

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientador: Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata

SÃO PAULO

2021

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DOS GENES *LDLR*, *PCSK9* E *LDLRAP1* EM
PACIENTES PORTADORES DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAL**

Elisangela da Silva Rodrigues Marçal

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientador: Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata

SÃO PAULO

2021

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.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

M313a Marçal, Elisangela da Silva Rodrigues
 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DOS GENES LDLR,
 PCSK9 E LDLRAP1 EM PACIENTES PORTADORES DE
 HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAL / Elisangela da Silva
 Rodrigues Marçal. - São Paulo, 2022.
 116 p.

 Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
 Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
 Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas -
 Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia
 e Toxicologia).
 Orientador: Hirata, Mario Hiroyuki

 1. Hipercolesterolemia Familiar. 2. Metilação do
 DNA. 3. Doença coronariana. I. T. II. Hirata, Mario
 Hiroyuki, orientador.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu filho Pedro, no qual me inspira todos os dias, obrigado meu filho por ser minha luz. Eu não podia imaginar que um ser humaninho tão pequeno fosse causar mudanças tão grandes. Obrigado por me escolher para amar você, ver o seu sorriso lindo, ganhar o melhor abraço do mundo e o beijo mais carinhoso que eu recebi na vida. Obrigado por me inspirar, mesmo sem entender ainda, você me faz ser melhor todos os dias. Te amo infinito versus infinito

“Quando te dei o presente da vida, você ficou com o meu coração,

Te amo, meu filho”

(Autor desconhecido)

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e pela persistência e discernimento para superar todos os desafios.

Agradeço a Nossa Senhora Aparecida por sempre me iluminar em todos os momentos da minha trajetória.

Agradeço ao meu filho Pedro por me permitir sentir o amor mais maravilhoso desse mundo, o qual me move e inspira diariamente a ser melhor constantemente, obrigado filho por ser a luz dos meus dias. Te amo infinito versus infinito.

Agradeço ao meu esposo Filipi por todo o seu companherismo, amizade, paciência, amor e incentivo durante todas as etapas da nossa vida, e por ser meu ponto de equilíbrio durante o desenvolvimento da dissertação, te amo.

Agradeço ao meu cachorro Bob por sempre me receber com alegria todos os dias, isso foi muito importante nos dias difíceis, te amo monstrinho.

Agradeço aos meus pais Antonia e José por me darem a vida e sempre me permitirem buscar novos horizontes. Agradeço aos meus irmãos Glenda e Kauã por sempre me incentivarem, me amarem, me fazerem rir e me apoiarem ao longo da vida. Amo vocês.

Agradeço aos meus sogros Marlene e Celso por me incentivarem nessa jornada e por ser minha rede de apoio nos cuidados com o meu filho, amo vocês.

Agradeço aos meus amigos que sempre me apoiam, incentivam e compreendem a minha ausência em alguns momentos durante essa jornada, vocês são especiais na minha vida! Amo todos vocês.

Agradeço a equipe do laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia (LIMC) do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC), Hui- Tzu Lin Wang (Lin), Adriana Regina Garófalo (Amora), Paula Veloso Siqueira (Princess), Mariana Botoletto Grizante (Mari), Nadja Bem-Vinda de Jesus da Silva (Mãezona), além disso, agradeço a ex-funcionária Gisele Medeiros Bastos (Gih), por toda paciência, dedicação e companherismo durante essa jornada. Vocês foram essenciais nessa jornada, meu eterno clube da luluzinha.

Agradeço ao João Italo Dias França por toda ajuda com a realização das análises estatísticas.

Agradeço aos companheiros atuais e aos que passaram pelo LABMAD, Bruna, Carolina, Cristina, Akira, Victor, Renata e Raul, Pedro e Glaúcio. Agradeço especialmente as minhas amigas Jéssica e Thais que se tornaram parceiras de vida, obrigado meninas por sempre me oferecerem o ombro amigo, as palavras doces e conselhos quando precisei. Amo vocês.

Agradeço a ex- aluna de Iniciação Científica Daina Vitor de Oliveira Silva pela imensa ajuda, companherismo e amizade durante o primeiro ano do meu mestrado, obrigado por tudo.

Agradeço aos voluntários que aceitaram participar do projeto e ajudaram a contribuir para o futuro da ciência.

À equipe da Seção Médica de Dislipidemia do Instituto Dante Pazzanese, em especial ao Dr. André Arpad Faludi e Dr. Rodrigo Marques Gonçalves por toda a ajuda no desenvolvimento do projeto. Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e a Universidade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) pela colaboração no recrutamento dos pacientes participantes deste projeto.

Agradeço aos meus professores que participaram da minha formação acadêmica, de forma direta ou indireta, em especial à professora Andréia, Rosalinda, Jucilene que marcaram a minha vida de uma forma muito especial, obrigado por tamanho amor ao ensino.

Agradeço à professora Rosário por todos os ensinamentos e contribuições durante a minha trajetória no laboratório e pela disponibilidade para auxiliar no desenvolvimento da dissertação.

Agradeço ao professor Mário por todos os conselhos, broncas, desafios e ensinamentos ao longo desses sete anos que estou no laboratório. Obrigado por transformar aquela aluna de iniciação científica nessa pessoa que a cada dia mais ama esse universo da pesquisa. Agradeço também por todos os momentos de conversas e conselhos sobre a vida, o senhor sempre terá um lugar na minha memória e na minha história.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro para a realização desse projeto

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio

financeiro para a realização deste projeto (processo: 2016/12899-6).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas com Nível Superior- Brasil- (CAPES)- Código de Financiamento: Processo: 130284/2018-1.

Epígrafe

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota” (Madre Teresa de Calcuta).

RESUMO

Marçal, E. S. R. **Avaliação do perfil de metilação dos genes *LDLR*, *PCSK9*, *LDLRAP1* em pacientes portadores de hipercolesterolemia familiar.** 2021. XF. Dissertação (Mestre)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

As variabilidades genotípicas que determinam algumas alterações fenotípicas e metabólicas podem ter seu diagnóstico falho se baseado apenas nos dados genômicos. Na hipercolesterolemia familiar (HF) pode-se observar que os dados de variantes nos genes da *LDLR*, *PCSK9*, *APOB* e *LDLRAP1* sugeridos pelos consensos atuais para confirmar o diagnóstico, tem mostrado serem insuficientes, mostrando baixa porcentagem de confirmação, mesmo nos casos em que características fenotípicas apresentam dados sugestivos importantes. A complementação no auxílio diagnóstico com dados epigenéticos tem sido sugerida em muitas doenças, principalmente nas crônicas degenerativas. A metilação do DNA pode estar envolvida no mecanismo que regulam vários processos metabólicos, entre os quais os envolvidos na expressão de proteínas e neste estudo os que estão envolvidos no metabolismo do colesterol, que poderia explicar fenótipos hipercolesterolemicos sem demonstração clara de variantes nos genes de consenso. O objetivo do presente estudo foi comparar o perfil de metilação dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* entre pacientes com diagnóstico de Hipercolesterolemia Familiar confirmado através de variantes genéticas descritas na literatura e pacientes sem diagnóstico confirmado. Além da comparação com indivíduos normolipidêmicos. A seleção dos indivíduos foi realizada na Seção de Dislipidemia do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC), do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). Através dos critérios MEDPED foram selecionados 133 pacientes para a realização do sequenciamento de um painel de genes relacionados ao fenótipo de HF e a homeostasia do colesterol a fim de confirmar o diagnóstico. Todos os pacientes tiveram o DNA purificado, que foi submetido ao tratamento com bissulfito, amplificado, purificado, desnaturado e sequenciado no sistema PyroMark Q24. Avaliou-se o perfil de metilação, em sítio CpG dos genes da *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1*. A análise estatística foi realizada utilizando o *software* SPSS v.19, GraphPad Prism, versão 1.03 e o *software* R. 4.1.0. Os pacientes foram classificados em Grupo I: Pacientes com diagnóstico molecular confirmado pelo estudo fenotípico e genotípico (n=40); Grupo II: Pacientes fenotipicamente determinados como hipercolesterolemico, mas sem diagnóstico molecular confirmado pelo

estudo genômico (n=93); Grupo III: indivíduos fenotipicamente determinados normolipidêmicos de acordo com a V Diretriz Brasileira de Dislipidemia (n=23). A análise comparativa entre os grupos I x II e II x III, demonstrou diferença estatística significativa em 13 sítios CpG do total de 28 sítios CpG analisados nos três genes. Além disso, foi possível concluir que alterações nos sítios CpG presentes no gene *LDLR* influenciaram na presença de xantomas e arco córneo. Houve correlação positiva entre a idade e perfil de metilação do gene *PCSK9*, assim como, alterações nos sítios CpG deste gene influenciaram na presença de arco córneo e IAM. Além disso, alterações no sítio CPG presente no gene *LDLRAP1* influenciou no desenvolvimento de DAC, IAM e RM, além da presença de xantelasma.

Palavras chaves: Hipercolesterolemia Familiar, Metilação do DNA, Doença coronariana.

Abstract

Marçal, E. S. R. **Evaluation of the methylation profile of *LDLR*, *PCSK9*, *LDLRAP1* genes in patients with familial hypercholesterolemia**. 2021. XF. Dissertation (Master)- Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2021.

The genotypic variabilities that determine some phenotypic and metabolic alterations can be misdiagnosed if based only on genomic data. In familial hypercholesterolemia (FH) it can be observed that the data of variants in the genes of *LDLR*, *PCSK9*, *APOB* and *LDLRAP1* suggested by the current consensus to confirm the diagnosis, has shown to be insufficient, showing a low percentage of confirmation, even in the cases in which phenotypic characteristics present important suggestive data. Complementing the diagnostic aid with epigenetic data has been suggested in many diseases, especially in chronic degenerative diseases. DNA methylation may be involved in the mechanisms that regulate several metabolic processes, including those involved in the expression of proteins that, in this study, are involved in cholesterol metabolism, which could explain hypercholesterolemic phenotypes without a clear demonstration of variants in consensus genes. The aim of the present study was to compare the methylation profile of *LDLR*, *PCSK9* and *LDLRAP1* genes between patients with a diagnosis of Familial Hypercholesterolemia confirmed through genetic variants described in the literature and patients without a confirmed diagnosis. In addition to the comparison with normolipidemic individuals. The selection of individuals was carried out at the Dyslipidemia Section of the Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC), in the Department of Clinical and Toxicological Analyzes of the Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), in the State University of Campinas (UNICAMP) and in the Faculdade of Medicine of São José do Rio Preto (FAMERP). Through the MEDPED criteria, 133 patients were selected to perform the sequencing of a panel of genes related to the FH phenotype and cholesterol homeostasis in order to confirm the diagnosis. All patients had their DNA purified, which were subjected to bisulfite treatment, amplified, purified, denatured and sequenced on the PyroMark Q24 system. The methylation profile in the CpG site of the *LDLR*, *PCSK9* and *LDLRAP1* genes were evaluated. Statistical analysis were performed using SPSS v.19 software, GraphPad Prism, version 1.03 and R. 4.1.0 software. Patients were classified into Group I: Patients with a molecular diagnosis confirmed by phenotypic and genotypic studies (n=40); Group II: Patients phenotypically determined to be hypercholesterolemic, but without a molecular diagnosis confirmed by the genomic study (n=93); Group III: phenotypically determined normolipidemic individuals according to the V Brazilian Dyslipidemia Directive (n=23). The comparative analysis between groups I x II and II x III showed a statistically significant difference in 13 CpG sites of the total of 28 CpG sites analyzed in the three genes of the project. Furthermore, it was possible to conclude that alterations in the CpG sites present in the *LDLR* gene influenced the presence of xanthomas and arc corneum. There was a positive correlation between age and *PCSK9* gene methylation profile, as well as changes in the CpG sites of this gene influenced the presence of arc corneum and AMI. In addition, alterations in the site present in the *LDLRAP1* gene are influencing the development of CAD, AMI and MR, in addition to the presence of xanthelasma.

Keywords: Familial Hypercholesterolemia, DNA Methylation, coronary heart disease.

Lista de figuras

Figura 1: Representação esquemática do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR), da proteína convertase subtilisina/Kesina tipo 9 (PCSK9) e da proteína adaptadora do receptor de lipoproteína de baixa densidade unidade 1 (LDLRAP1) no metabolismo da LDL. Autoria própria.

Figura 2: Esquema da formação de 5- metilcitosina. DNMTs: DNAmetiltransferase; CH₃: grupo metil; 5mC: 5-metilcitosina. Autoria própria

Figura 3: Esquema da metilação de manutenção do DNA. DNMT1: DNA metiltransferase 1; DNMT3: DNA metiltransferase 3; TET: família de dez e onze translocação. Figura adaptada de Jeltsch et al., 2014.

Figura 4: Esquema do processo que ocorre durante o tratamento da fita de DNA com bissulfito. (Adaptada Portinho,2015).

Figura 5: Representação das ilhas CpG e ensaios comerciais para análise de metilação do gene LDLR.

Figura 6: Representação das ilhas CpG e ensaios comerciais para análise de metilação do gene PCSK9.

Figura 7: Representação das ilhas CpG e ensaios comerciais para análise de metilação do gene LDLRAP1.

Figura 8: Representação da reação de pirosequenciamento. Fundamento do método de Pirosequenciador Q24 da Qiagen (www.qiagen.com).

Figura 9: Pirograma representando a análise dos sítios CpG do gene LDLR, ensaio 1. As regiões sombreadas em azul representam os sítios CpG analisadas neste ensaio (Acima do pico o número sobreado em azul mostra percentual de metilação). No Gráfico, no eixo das ordenadas os números representam o pico de luminescência e no eixo das abcissas do gráfico a sequência de análise do ensaio.

Figura 10: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio LDLR-1, sítio CpG 1

Figura 11: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio LDLR-1, sítio CpG 6

Figura 12: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio LDLR-2, sítio CpG 2

Figura 13: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio LDLR-2, sítio CpG 4

Figura 14: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio PCSK9-1, sítio CpG 1

Figura 15: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio PCSK9-1, sítio CpG 2

Figura 16: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio PCSK9-1, sítio CpG 3

Figura 17: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio PCSK9-1, sítio CpG 4

Figura 18: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio PCSK9-1, sítio CpG 6

Figura 19: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio PCSK9-2, sítio CpG 1

Figura 20: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio PCSK9-2, sítio CpG 2

Figura 21: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio PCSK9-2, sítio CpG 3

Figura 22: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio PCSK9-2, sítio CpG 5

Figura 23: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio LDLR-1 sítio CpG 2

Figura 24: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio LDLR-1 sítio CpG 3

Figura 25: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio LDLR-1 sítio CpG 4

Figura 26: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio LDLR-1 sítio CpG 5

Figura 27: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio LDLR-1 sítio CpG 7

Figura 28: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio PCSK9-1 sítio CpG 5

Figura 29: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio PCSK9-2 sítio CpG 4

Figura 30: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio LDLRAP1-1 sítio CpG 1

Figura 31: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio LDLRAP1-1 sítio CpG 2

Figura 32: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio LDLRAP1-1 sítio CpG 3

Figura 33: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio LDLRAP1-2 sítio CpG 1

Figura 34: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio LDLRAP1-2 sítio CpG 2

Figura 35: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio LDLRAP1-2 sítio CpG 3

Lista de tabelas

Tabela 1. Relação dos genes, número de ilhas CpG e código do ensaio disponível para avaliação de metilação

Tabela 2. Dados biodemográficos dos pacientes HF fenotipicamente selecionados para o estudo de metilação.

Tabela 3. Dados biodemográficos dos pacientes normolipidêmicos.

Tabela 4. Dados biodemográficos dos grupos I, II e III do projeto.

Tabela 5. Análise das variáveis contínuas utilizando o teste de Turkey na comparação entre os grupos I, II e III.

Tabela 6. Análise dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* correlacionando com a idade.

Tabela 7. Análise dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* correlacionando com CT

Tabela 8. Análise dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* correlacionando com HDL-c

Tabela 9. Análise dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* correlacionando com LDL-c

Tabela 10. Análise dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* correlacionando com Valores de VLDL-c

Tabela 11. Análise dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* correlacionando com TG

Tabela 12. Análise da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* associado ao desenvolvimento de DAC

Tabela 13. Análise da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* associado ao IAM

Tabela 14. Análise da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* associado à RM

Tabela 15. Análise da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* associado a presença de xantoma

Tabela 16. Análise da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* associado a presença de xantelasma

Tabela 17. Análise da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* associado a presença de arco córneo

Tabela 18. Análise da presença de arco córneo associado com a idade

Tabela 19. Análise da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* associado a presença de espessamento de tendão

Tabela 20. Análise da média e desvio padrão da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* na comparação entre os grupos I, II e III

Tabela 21. Análise comparativa dos sítios CpG estatísticas significativo utilizando o teste de Turkey na comparação entre os grupos I, II e III

Lista de abreviaturas

3' UTR- Região 3' Não Traduzida
5' UTR- Região 5' Não Traduzida
5mC- 5-metilcitosina
ABCA1- gene Transportador de Cassete Ligante de ATP Subfamília A Membro 1
AP-2- Adaptina 2
ARH- Hipercolesterolemia Autossômica Recessiva
APOB- Gene da Apolipoproteína B
CH3- Grupo Metil
CpG- Citosina- fosfato- Guanina
CT- Colesterol Total
DAC- Doença arterial coronariana
DCV- Doenças Cardiovasculares
DNA- Ácido Desoxirribonucleico
DNMT- DNA metiltransferase
DNMT1- DNA metiltransferase 1
DNMT3- DNA metiltransferase 3
Dutch *MEDPED* - *Dutch Lipid Clinic Network* - Make Early Diagnosis to Prevent Early Deaths
EGF- Fator de Crescimento Epidermal
HF- Hipercolesterolemia Familiar
HDL-c – Colesterol da Lipoproteína de Alta Densidade
HDL- Lipoproteína de Alta Densidade
IAM- Infarto Agudo do Miocárdio
IDPC- Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
IDL- Lipoproteína de Densidade Intermediária
INCOR-FM-USP: Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da USP
LDL- Lipoproteína de baixa Densidade
LDL-c – Colesterol da Lipoproteína de baixa densidade
LDLR- gene do Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade
LDLR- Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade
LDLRAP1- gene da Proteína Adaptadora do Receptor de Lipoproteína de Baixa Unidade 1
LDLRAP1- Proteína Adaptadora do Receptor de Lipoproteína de Baixa Unidade 1
PCSK9- gene da Proteína Convertase Subtilisina/Kexina Tipo 9
PCSK9- Proteína Convertase Subtilisina/ Kexina Tipo 9
PCR- Reação em Cadeia pela Polimerase
QM- Quilomícrons
SNP- Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TET- Família de Dez e Onze Translocação
TG- Triacilgliceróis
UFRN- Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Súmario

1. Introdução	
1.1 Hipercolesterolemia Familiar.....	22
1.1.1 Gene do receptor da LDL (<i>LDLR</i>)	23
1.1.2 Gene da proteína convertase subtilisina/kesina tipo 9 (<i>PCSK9</i>)	24
1.1.3 Proteína adaptadora do receptor de lipoproteína de baixa densidade unidade 1 (<i>LDLRAP1</i>)	24
1.2 O papel da epigenética na HF.....	26
1.3 Metilação do DNA	26
2. JUSTIFICATIVA.....	31
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	32
4. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.2 Métodos	34
4.2.1 Extração de DNA.....	34
4.2.2 Tratamento do DNA com Bissulfito e Amplificação do fragmento de DNA de interesse pela PCR.....	35
4.2.3 Pirosequenciamento.....	38
4.3 Análise estatística.....	42
5.RESULTADOS.....	44
5.1 Resultados do estudo de Metilação dos sítios CpG dos genes <i>LDLR</i> , <i>PCSK9</i> e <i>LDLRAP1</i> ..	49
5.2 Resultados do estudo de Metilação dos sítios CpG dos genes <i>LDLR</i> , <i>PCSK9</i> e <i>LDLRAP1</i> correlacionados com a Idade	58
5.3 Resultados do estudo de Metilação dos sítios CpG dos genes <i>LDLR</i> , <i>PCSK9</i> e <i>LDLRAP1</i> correlacionado com a concentração plasmática de CT.....	59
5.4 Resultados do estudo de Metilação dos sítios CpG dos genes <i>LDLR</i> , <i>PCSK9</i> e <i>LDLRAP1</i> correlacionado com a concentração plasmática de HDL-c	Erro! Indicador não definido.
5.5 Resultados do estudo de Metilação dos sítios CpG dos genes <i>LDLR</i> , <i>PCSK9</i> e <i>LDLRAP1</i> correlacionado com a concentração plasmática de LDL-c	61
5.6 Resultados do estudo de Metilação dos sítios CpG dos genes <i>LDLR</i> , <i>PCSK9</i> e <i>LDLRAP1</i> correlacionado com a concentração plasmática de VLDL-c.....	63

5.7 Resultados do estudo de Metilação dos sitios CpG dos genes <i>LDLR</i> , <i>PCSK9</i> e <i>LDLRAP1</i> correlacionado com a concentração plasmática de Triglicerídeos (TG)	64
5.8 Resultados do estudo de Metilação dos sitios CpG dos genes <i>LDLR</i> , <i>PCSK9</i> e <i>LDLRAP1</i> no desenvolvimento de DAC	65
5.9 Resultados do estudo de Metilação dos sitios CpG dos genes <i>LDLR</i> , <i>PCSK9</i> e <i>LDLRAP1</i> no desenvolvimento de IAM	66
5.10 Resultados do estudo de Metilação dos sitios CpG dos genes <i>LDLR</i> , <i>PCSK9</i> e <i>LDLRAP1</i> na realização da RM.	67
5.11 Resultados do estudo de Metilação dos sitios CpG dos genes <i>LDLR</i> , <i>PCSK9</i> e <i>LDLRAP1</i> com a presença de xantomas.....	68
5.12 Resultados do estudo de Metilação dos sitios CpG dos genes <i>LDLR</i> , <i>PCSK9</i> e <i>LDLRAP1</i> com a presença de xantelasma	69
5.13 Resultados do estudo de Metilação dos sitios CpG dos genes <i>LDLR</i> , <i>PCSK9</i> e <i>LDLRAP1</i> com a presença de arco córneo	71
5.14 Resultados do estudo de Metilação dos sitios CpG dos genes <i>LDLR</i> , <i>PCSK9</i> e <i>LDLRAP1</i> com a presença de espessamento de tendão.....	72
6. Discussão.....	75
7. Limitações	86
8. Conclusões.....	88
9. Referências Bibliográficas.....	89
10. Anexos.....	95

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Estatística mundial de Saúde de 2020 publicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a região das Américas, na qual o Brasil se encontra, o percentual de mortalidade entre a faixa etária de 30 a 70 anos por doenças não transmissíveis como câncer, diabetes, doenças respiratórias crônicas e doenças cardiovasculares (DCV) de 17,8% para homens e 12,6% para mulheres no ano de 2016 (Who, 2020). Segundo estimativa de 2019, as DCV foram responsáveis por 32% das mortes globais, mais de três quartos das mortes ocorreram em países de baixa e média renda (Who, 2019). A previsão, até 2030, está estimada em cerca de 23,6 milhões de pessoas que irão a óbito por DCV no mundo (Pourmasoumi et al., 2018).

A DCV é uma doença complexa, que resulta na combinação de diversos fatores de risco, como os biológicos (diabetes, hipertensão, obesidade e dislipidemias), ambientais (tabagismo, consumo de álcool, sedentarismo e consumo de alimentos inadequados) e fatores não modificáveis (idade, sexo, etnia e fatores genéticos). Estes fatores também estão relacionados ao risco de desenvolvimento de doença arterial coronariana (DAC) (Wong, 2015; Paquette et al 2017; Ghafarian et al., 2018). A morbi-mortalidade associadas às DCV pode ser reduzida através de intervenções que minimize esses fatores de risco (Xavier et al, 2013).

Um dos fatores de risco importante para o desenvolvimento de DAC é a dislipidemia, no qual é definida como um conjunto de anormalidades em qualquer fase do metabolismo lipídico, caracterizada pela elevação plasmática do colesterol total (CT), do colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), e triacilgliceróis (TG) e diminuição plasmática do colesterol da lipoproteína de alta densidade plasmática (HDL-c) (Mesh, 2006, Song et al., 2014, Li et al.; 2017, Güntekin et al., 2018). Estudos epidemiológicos demonstraram que elevadas concentrações de colesterol plasmático, principalmente transportado pelas LDL (lipoproteína de alta densidade) estão associadas ao aumento de doenças cardiovasculares. A detecção e tratamento precoce das dislipidemias são fundamentais para uma correta prevenção e controle da progressão de DCV (Kannel et. al., 1971; ZHANG et al; 2017, Güntekin et al., 2018).

As dislipidemias eram classificadas conforme os padrões de elevação dos lipídios plasmáticos (fenótipo de Fredrickson) (Fredrickson, 1971). Atualmente, as dislipidemias são categorizadas como primária ou secundária.

As dislipidemias ocorrem em consequência às doenças como a diabetes melito, o hipotireodismo, doenças renais ou hepáticas. Outros fatores como obesidade, menopausa, dieta rica em ácidos graxos, sedentarismo, tabagismo e alcoolismo estão relacionados à doença. O tratamento é constituído primeiramente em controlar a doença de base, e em alguns casos se recomenda adotar o tratamento farmacológico com hipolipemiantes (Freitas, 2010, Jillinger et al., 2017).

As dislipidemias primárias decorrem de mutações genéticas únicas ou múltiplas que afetam a síntese e o metabolismo de lipídeos com superprodução ou remoção plasmática defeituosa da VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade), LDL, ou baixa produção de HDL (lipoproteína de alta densidade).

Podem ser classificadas fenotipicamente, por meio de análises bioquímicas. A classificação fenotípica ou bioquímica se baseia nos valores plasmáticos de CT, LDL-c, TG e HDL-c. Compreende quatro tipos principais bem definidos de interesse clínico (Sposito, 2007, Dron et al.; 2020), a seguir em resumo:

Hipercolesterolemia isolada: elevação isolada do LDL-c ($\geq 160\text{mg/dl}$);

Hipertrigliceridemia isolada: elevação isolada dos TG ($\geq 150\text{mg/dl}$), que reflete no aumento do número de partículas ricas em TG, no caso VLDL, IDL e QM. Como observado à estimativa do volume das lipoproteínas aterogênicas pela LDL torna-se menos precisa à medida que os valores plasmáticos de lipoproteínas ricas em TG aumentam. Portanto, nestas situações o valor de colesterol não-HDL pode ser utilizado como indicador de diagnóstico e meta terapêutica;

Hiperlipidemia mista: valores aumentados de LDL-c ($\geq 160\text{mg/dl}$) e TG ($\geq 150\text{mg/dl}$). Nesta circunstância o valor de colesterol não-HDL também pode ser utilizado como indicador e meta terapêutica. Nos casos em que o TGs $\geq 400\text{mg/dl}$, o cálculo do LDL-C pela fórmula de Friedewald ($\text{LDL-c} = \text{CT} - (\text{HDL-c} + \text{TG}/5)$ é inadequado. Considerando-se então a hiperlipidemia mista quando o CT $\geq 200\text{mg/dl}$;

Colesterol HDL baixo: redução do HDL-c (homens <40mg/dl e mulheres <50mg/dl) isolada ou em associação a aumento de LDL-c ou de TG.

Na classificação genotípica, as dislipidemias se dividem em monogênicas ou poligênicas, sendo a de maior importância a Hipercolesterolemia Familiar.

1.1 Hipercolesterolemia Familiar

A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença monogênica autossômica codominante presente em todos os grupos étnicos (Sharma et. al., 2017; Tada et.al., 2021) que afeta o metabolismo do LDL, resultando na redução do catabolismo das partículas de LDL (Vallejo-Vaz et al., 2018) levando assim a altas concentrações de LDL-c e desenvolvimento de DAC prematura (Paquette et. al., 2017; Farnier et al., 2017; Myers et al., 2019). Entre as desordens monogênicas a HF é a mais comum, ela afeta aproximadamente 1 em cada 250 indivíduos no mundo inteiro. (FH; MIM #14389) (Girelli et. al., 2016; Myers et al., 2019, Alonso et al., 2020).

Os portadores de HF heterozigotos apresentam valores de colesterol total entre 310-580mg/dl e homozigotos entre 460- 1160mg/dl, por isso, podem desenvolver DAC precocemente, ou seja, infarto do miocárdio (IAM) e angina no peito. Dados contemporâneos sugerem que a frequência global pode ser de até 1: 200 na forma heterozigota e 1: 160000 na forma homozigota, respectivamente, o que implica em mais de 30 milhões de indivíduos afetados em todo mundo. Entretanto a prevalência de HF pode variar de acordo com a região geográfica e a etnia (Nordestgaard et. al; 2013; Brautbar et al., 2015; Vallejo-Vaz et al., 2015, Vallejo-Vaz et al., 2018).

A prevalência global de HF estimada para crianças e adolescentes é de 1: 250, sugerindo que 20% a 25% sejam portadores de HF. O valor de LDL-c > 190 mg/dl em crianças, com parentes que possuam valor de LDL-c >160 mg/dl com DAC, sugere que esta criança tenha uma alta probabilidade de ser portadora de HF de origem genética (Vallejo-Vaz et al., 2018).

A elevação do LDL-c em alguns indivíduos pode causar o aparecimento de algumas características fenotípicas de HF como a presença de arco córneo, que pode ser identificado em pacientes jovens antes dos 45 anos de idade, xantelasma, xantomas tuberosos e tendinosos. Este aumento da concentração de LDL-c leva a

formação de placas ateroscleróticas nas artérias coronárias e na aorta proximal em idade precoce, que conseqüentemente ao longo do tempo eleva o risco de desenvolvimento de DCV (Youngblom et. al; 2014, Alonso et al., 2020).

Apesar das diretrizes recentes para o diagnóstico de HF, a maioria dos pacientes permanece sem diagnóstico preciso e poucos possuem tratamento adequado. Ao longo dos últimos anos, o diagnóstico de HF vem sendo realizado através da caracterização fenotípica utilizando vários critérios adotados para caracterizar a HF. Dentre eles, o *Dutch Lipid Network* (Dutch MEDPED) que foi escolhido e adaptado para a elaboração da I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar, a qual foi atualizada no ano de 2021. No qual o diagnóstico clínico é fundamentado na presença dos sintomas físicos como a manifestação de xantomias e arco córneo, presença de histórico familiar e doenças cardiovasculares com elevação de concentrações de LDL-c (Santos et. al., 2012, Izar et al., 2021).

O fenótipo clínico da HF é geralmente causado por variantes encontradas nos genes relacionados à doença, o receptor da lipoproteína de baixa densidade (*LDLR*), a apolipoproteína B (*APOB*) e a proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (*PCSK9*). Entretanto outros genes, como *LDLRAP1* vêm sendo associados com as alterações fenotípicas que ocorrem na hipercolesterolemia autossômica recessiva (ARH) (Abifadel et.al., 2003; France, 2016; Strom et. al., 2017; Mytilinaiou et al., 2018; Alonso et al., 2020).

1.1.1 Gene do receptor da LDL (*LDLR*)

O gene do *LDLR* está localizado no braço curto do cromossomo 19(19p13) e é composto por 18 éxons que codificam 839 aminoácidos na sua forma madura (Yamamoto et al; 1984; Lindgren et al; 1985; Mollaki et al; 2013; Galicia-Garcia et al., 2020). O *LDLR* humano é uma glicoproteína de cadeia única de múltiplos componentes, em sua forma madura de 160kDa e é composto por cinco domínios (Al-Allaf et al., 2010, Strom et al; 2017).

O *LDLR*, localizado na superfície de células, se liga a LDL e é endocitado. A LDL é então degradada nos lisossomos e o colesterol é liberado na célula para uso metabólico, sendo o *LDLr* reciclado ou degradado. Portanto, a funcionalidade do

receptor no mecanismo regulador da concentração plasmática e intracelular do colesterol é fundamental. A mutação no gene *LDLR* pode comprometer a sua funcionalidade, e, conseqüentemente, há uma diminuição da remoção de LDL do plasma (Civeira, 2004; Bjune et al., 2018) (Figura 1).

O avanço das tecnologias de sequenciamento de alto rendimento possibilitou a identificação de mais de 2600 variantes no gene *LDLR* relacionadas como causadoras de HF, representando 80 a 85% dos casos de HF, e prejudicando a sua síntese, montagem, transporte, reciclagem e formação de vesículas (Henderson et al., 2016; Benedito- Vicente et al., 2018; Galicia-Garcia et al., 2020).

1.1.2 Gene da proteína convertase subtilisina/kesina tipo 9 (*PCSK9*)

O gene da *PCSK9* está localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p32) e é composta por 12 éxons que codificam 692 aminoácidos. O gene da *PCSK9* codifica para a proteína PCSK9, responsável pela regulação pós-transcricional da quantidade do LDLR ao se ligar ao domínio EGF (Fator de Crescimento Epidermal) do receptor, sendo interiorizada juntamente com o receptor, mediando a proteólise intracelular. A PCSK9 tem um papel fundamental na homeostase do colesterol através do processamento de proteínas de ligação a elementos reguladores (Mousavi et al., 2009; Lambert et al., 2009; Bayona et al., 2020; Sundararaman et al., 2021).

As variantes neste gene podem levar ao ganho de função, o que conseqüentemente leva ao aumento da degradação de LDLR, menor captação de LDL plasmática, conseqüentemente aumentando sua concentração circulante. Por outro lado, variantes que codificam proteína com a perda de função, leva a redução de cerca de 15% das concentrações da LDL plasmática, reduzindo o risco de DCV (Abifadel et al., 2003, Horton et al., 2007). Estas variantes que levam a ganho de função da PCSK9 são responsáveis por até 2% dos casos de HF (Henderson et al., 2016; Bayona et al., 2020) (Figura 1).

1.1.3 Proteína adaptadora do receptor de lipoproteína de baixa densidade unidade 1 (*LDLRAP1*)

O gene da proteína adaptadora do receptor de lipoproteína de baixa densidade unidade 1 (*LDLRAP1*) (Figura 1) está localizada no braço curto do

cromossomo 1(p36) é composta por 11 éxons (Henderson et al., 2016; Kamar et al., 2021). A proteína expressa por este gene é responsável pela ligação do LDLR à adaptina2 (AP-2), nas fendas revestidas de clatrina, localizada na superfície da membrana celular. Subsequentemente, a AP-2 recruta proteínas e enzimas acessórias que ajudam na incorporação do LDLR e posteriormente a sua endocitose (WIJERS et al., 2015; Chemello et al., 2021).

Variantes neste gene ocorrem na hipercolesterolemia autossômica recessiva (ARH) (ARH, OMIM#603813) na qual causa perda da função da proteína LDLRAP1. Essas variantes podem causar alterações na proteína que reduzem a atividade de LDLR, o que ocorre em 90% dos casos de variantes de ARH, causando o aumento da concentração da LDL plasmático tanto em indivíduos homozigotos e heterozigotos (France, 2016; Henderson et al., 2016). Entretanto pacientes portadores de variantes no gene de *LDLRAP1* possuem concentrações mais baixas de LDL-c e início tardio de DAC comparados com indivíduos homozigotos portadores de variantes no gene *LDLR* (Rodríguez- Jiménez et al., 2019). A prevalência de indivíduos ARH é estimada em menos de 1 em 1 milhão na população (Nikasa et al., 2021)

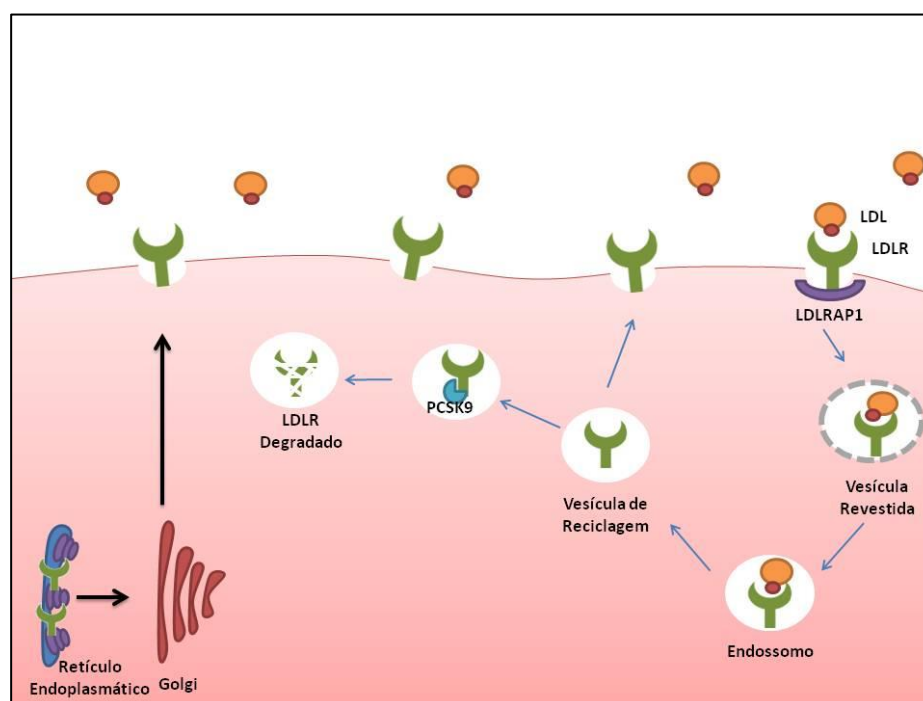


Figura 1: Representação esquemática do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR), da proteína convertase subtilisina/Kesina tipo 9 (PCSK9) e da proteína adaptadora do receptor de lipoproteína de baixa densidade unidade 1 (LDLRAP1) no metabolismo da LDL. *Fonte: autoria própria*

1.2 O papel da epigenética na HF

Alterações na expressão dos genes descritos acima podem interferir na captação de LDL circulante levando ao fenótipo da HF. Essas alterações na expressão gênica podem ocorrer como consequência de alterações na sequência de DNA. O advento de novas tecnologias de sequenciamento de DNA de alto desempenho (*Next Generation Sequencing*- NGS) revolucionou o diagnóstico molecular, tornando mais rápida a identificação de alterações genéticas (Lazaro et al; 2017). Entretanto, quando se fala em herdabilidade dos traços lipídicos no sangue, a ausência de alterações na sequência gênica que justifique a alteração fenotípica de HF pode chegar a atingir 40% (Guay et. al., 2016; Pedro-Botet et al., 2021). Nos últimos anos, tem-se buscado respostas para a variabilidade fenotípica não explicada pela genômica estrutural. Entre essas respostas, estão os mecanismos epigenéticos, conhecidos como processos biológicos envolvidos no controle de transcrição e tradução (Muller&Prado, 2008; Guay et. al., 2012; Harst et al., 2018; Bambarendage et al.; 2021).

A epigenética compreende o estudo de modificações reversíveis e herdáveis da cromatina e do DNA que regulam a expressão genética e a estabilidade genômica sem alterar a sequência de DNA (Lopes et. al., 2017; Xu et al., 2021) por influência de fatores ambientais como dieta, tabagismo, atividade física, uso de drogas ilícitas, entre outras (Feinberg, 2007; Szyf, 2007; Raasol, 2015). Dentre estas modificações, estão inclusos: a metilação do DNA, a acetilação das histonas, bem como a remodelagem da cromatina (Qureshi et al., 2019; Bambarendage et al.; 2021).

1.3 Metilação do DNA

A metilação do DNA é um fator envolvido na regulação da expressão gênica. Refere-se a um processo no qual há a adição de um grupo metil (CH₃), a partir da transferência de S-adenosilmetionina para um nucleotídeo de DNA, no carbono 5 das bases nitrogenadas de citosina, o qual se nomeia dinucleotídeo CpG, onde uma citosina e uma guanina são separadas por um fosfato resultando na formação de uma base modificada de 5-metilcitosina (5mC) (Azevedo et. al., 2013; Zhang et. al., 2017; Qureshi et al., 2019, Xu et al., 2021) (Figura 2).

Os dinucleotídeos CpG aparecem distribuídos no genoma ou juntos em regiões denominadas de ilhas CpG. Em humanos, aproximadamente 60% a 80% dos 28 milhões de ilhas CpG são metilados aproximadamente (Kato et al., 2019), sendo mais frequentes em regiões promotoras de gene. Quando a metilação ocorre na região promotora pode resultar no silenciamento do gene, pois inibe a ligação dos complexos de transcrição às suas regiões reguladoras, entretanto quando a metilação ocorre no corpo do gene ou em regiões transcritas pode haver interferência na fase de transcrição, prologando esse processo e gerando splicing alternativos (USHIJIMA; ASADA, 2010; DEATON; BIRD, 2011; Kato et al., 2019).

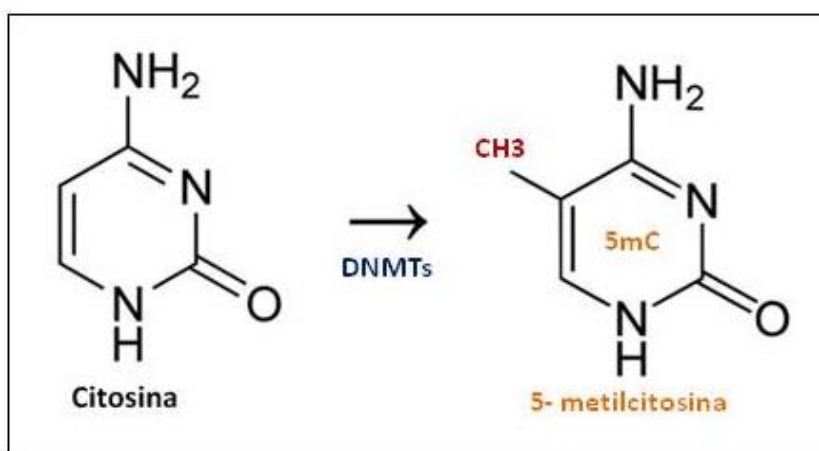


Figura 2: Esquema da formação de 5- metilcitosina. DNMTs: DNAmetiltransferase; CH₃: grupo metil; 5mC: 5-metilcitosina. Autoria própria.

Durante o processo de metilação ocorre a manutenção das fitas de DNA, permitindo o controle da proporção de metilação que ocorrerá. A metilação de manutenção proposta por Riggs e Holiday e Pugh no qual ocorre a extensão do princípio da teoria criada por Watson- Crick, no qual as informações complementares a serem codificadas dos dois filamentos de DNA nos sítios CpG palindrômicos por DNMTs de novo, criam um padrão de metilado ou não metilado dos sítios CpG. Após cada ciclo da replicação do DNA, a metilação fica presente nas cadeias parentais criando um padrão de CpG hemimetilado e não metilado. Sendo assim, o padrão de metilação pode ser mantido pela ação da atividade específica da metiltransferase de manutenção (Jeltsch et al., 2014; Qureshi et al., 2019).

Existem cinco isoformas de DNMT – DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b e DNMT3L – mas, somente as isoformas DNMT1, DNMT3a e DNMT3b atuam na

metilação de DNA. Essas três enzimas são divididas em dois grupos: as metiltransferases de manutenção, envolvidas na metilação de fitas hemimetiladas de DNA durante a replicação (DNMT1); e as *denovo* metiltransferases, adicionando o grupo metil em fitas previamente não metiladas (DNMT3a e DNMT3b) (FOULKES, 2012, Jeltsch et al., 2014) (Figura 3). Estudos genéticos revelam que o nocaute destas três enzimas em ratos é letal para a manutenção da metilação do DNA em todo o genoma, demonstrando assim a importância destas enzimas e do papel da metilação do DNA no desenvolvimento dos mamíferos (Jeltsch et al., 2014 Kato et al., 2019; Han et al., 2020).

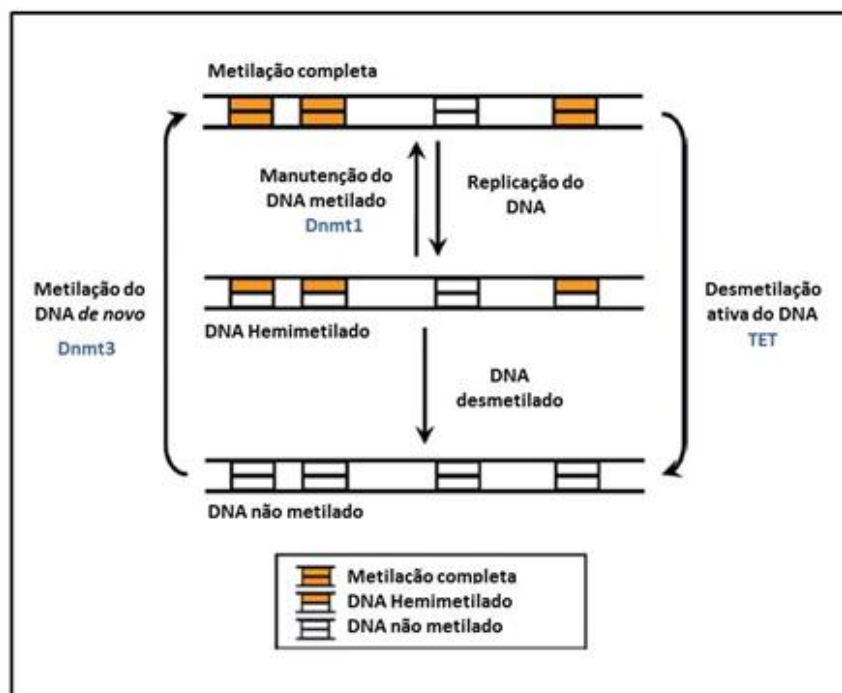


Figura 3: Esquema da metilação de manutenção do DNA. DNMT1: DNA metiltransferase 1; DNMT3: DNA metiltransferase 3; TET: família de dez e onze translocação. Figura adaptada de Jeltsch et al., 2014.

Os SNPs e as variantes genéticas podem resultar em perda ou ganho de ilhas CpG que são possíveis locais de metilação do DNA. Um dinucleotídeo CpG da região promotora ARHGAP25 humana foi associado com a pressão sanguínea em um estudo de associação genômica. Ainda não está claro se este SNP está associado à sua expressão gênica, no entanto, dados sugerem que este CpG-SNP pode afetar a expressão de ARHGAP25 devido a metilação desta ilha CpG estar associada a uma diminuição da expressão de ARHGAP25 (Jiang et al., 2014). Langaman et al., conduziu

um estudo nas regiões promotoras do gene *ABCA1* em humanos e roedores, o estudo relata que modificações epigenéticas no promotor do gene *ABCA1* contribuiu para variabilidade interdividual das concentrações plasmáticas de HDL-c (Langaman et al., 2002). Guay et al., conduziu um estudo de metilação do DNA no qual analisou 98 pacientes HF não tratados utilizando a técnica de pirosequenciamento, neste estudo foi observado que a quantidade de metilação do DNA no *locus* dos promotores dos genes *CETP* e *LPL* estão associados à variabilidade do perfil lipídico (Guay et al., 2013). Outro estudo conduzido pelo grupo correlacionou à porcentagem de metilação do DNA e o polimorfismo c.-20G>A no gene *TNNT1* com baixas concentrações de HDL-c e risco do desenvolvimento de DAC em homens HF e não HF (Guay et al., 2016).

Muitos estudos de epigenética são necessários para entender os mecanismos das DCV no qual terá consequências relevantes que implicaram na prevenção, prognóstico e terapia das doenças DCV (Elia et al., 2018). Para melhor compressão dos mecanismos epigenéticos, dentre eles a metilação do DNA em doenças genéticas complexas como a HF, é necessário a avaliação nos principais genes relacionados às alterações fenotípicas não caracterizadas no estudo genômico.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A variabilidade fenotípica que determina algumas doenças genéticas, dentre elas a HF podem ter seu diagnóstico falho se realizado apenas por avaliação genotípica, pois um grande percentual dos casos não apresenta variantes que justifiquem o fenótipo da doença. Apesar do uso de tecnologias que realizam o sequenciamento de DNA, no qual é possível confirmar algumas patologias através da identificação de variantes em genes, que justifiquem o fenótipo de algumas doenças, ainda assim, existem muitas lacunas que ficam após o uso desta tecnologia.

Um estudo prévio realizado pelo nosso grupo utilizou a tecnologia NGS para a identificação de possíveis variantes causais de cardiomiopatia hipertrófica, entretanto, os resultados mostraram que em cerca de 15% dos casos não foram encontradas variantes em genes relacionados com a hipertrofia (Castro, 2015) resultado este, semelhante aos encontrados em outras populações. Como já relatado anteriormente a ausência na sequência gênica que possa justificar a alteração fenotípica da herdabilidade dos traços lipídicos no sangue pode chegar a atingir 40% (Guay et. al; 2016), tendo assim uma grande porcentagem de alterações a qual o sequenciamento não consegue responder as características fenotípicas dos pacientes. Em outro estudo realizado pelo nosso grupo com 141 pacientes HF, os dados corroboraram com os achados na literatura, uma vez que selecionados e sequenciados apenas 21,2% tiveram seu diagnóstico molecular confirmado (Borges, 2019).

Por esta razão nos últimos anos, tem-se buscando compreender os mecanismos epigenéticos, como uma possível solução para se explicar a variabilidade fenotípica de algumas doenças, dentre eles a metilação do DNA.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar o perfil de metilação dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* entre pacientes com diagnóstico fenotípico e genotípico de Hipercolesterolemia Familiar, com indivíduos fenotipicamente descrito como hipercolesterolêmico e indivíduos considerados normolipidêmicos.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- ✓ Avaliar a associação entre o perfil de metilação dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* e o perfil bioquímico em pacientes com Hipercolesterolemia Familiar com indivíduos fenotipicamente descrito como hipercolesterolêmico e indivíduos considerados normolipidêmicos.
- ✓ Analisar a associação entre o perfil de metilação dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* e as manifestações clínicas em pacientes com Hipercolesterolemia Familiar com indivíduos fenotipicamente descrito como hipercolesterolêmico e indivíduos considerados normolipidêmicos.

CASUISTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

4. CASUISTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuística

4.1.1 Seleção de pacientes

Foram incluídos 133 pacientes de ambos os gêneros conforme diagnóstico fenotípico de HF provenientes da Seção de Dislipidemia do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC), do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). Este projeto possui aprovação pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CAAE: 24618713.0.3001.0067-Anexo). As amostras de DNA dos pacientes selecionados foram sequenciados os exons de 84 genes, que estão associados com o metabolismo do colesterol, segundo protocolo publicado (Borges et al; 2020). Estabeleceu-se uma divisão baseada nos resultados do estudo genômico (Tese da Borges, 2019) em grupo I: Pacientes com diagnóstico molecular confirmado pelo estudo fenotípico e genotípico (N=40), grupo II: Pacientes fenotipicamente determinados como hipercolesterolemico, mas sem diagnóstico molecular confirmado pelo estudo genômico (N=93) e grupo III: com 23 indivíduos fenotipicamente determinados normolipidêmicos de acordo com a V Diretriz Brasileira de Dislipidemia e prevenção da aterosclerose (Xavier et al., 2013).

Adotou-se os seguintes critérios de não inclusão no projeto: indivíduos que desistiram de participar do protocolo em qualquer fase do estudo ou que apresentaram as seguintes condições clínicas: insuficiência hepática, insuficiência renal (depuração de creatinina menor que 30ml/min) e/ou síndrome nefrótica, neoplasias, anticorpos anti- HIV positivos, disfunção tireoideana, síndrome de Cushing e grávidas.

4.2 Métodos

4.2.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído utilizando os reagentes do QIAamp® DNA BloodMaxi Kit (QIAGEN, GmbH, Alemanha) conforme as orientações do fabricante. A quantificação do DNA foi realizada pelo método fluorimétrico utilizando o

equipamento *QUBIT*[®] com os reagentes *QUBIT*[®] *DsDNA Broad-Range Assay* (Life Technologies, Forest City, USA) com faixa de detecção está entre 4 a 1000ng. Para a análise de metilação, as amostras de DNA foram tratadas com Bissulfito e quantificadas utilizando os reagentes *QUBIT*[®] *HsDNA Broad-Range Assay* (Life Technologies, Forest City, USA), com faixa de detecção está entre 0.2 a 100ng.

4.2.2 Tratamento do DNA com Bissulfito e Amplificação do fragmento de DNA de interesse pela PCR

O DNA extraído foi submetido ao processo de conversão por bissulfito utilizando o *EpiTect Fast DNA Bisulfite Conversion Kit* (QIAGEN, Hiden, Alemanha) com quantidade inicial de 2µg seguindo o protocolo do fabricante. O tratamento tem a finalidade de que bissulfito converta as citosinas não metiladas em uracilas, não alterando as citosinas metiladas (Hayatsu, 2008) como representado na Figura 4.

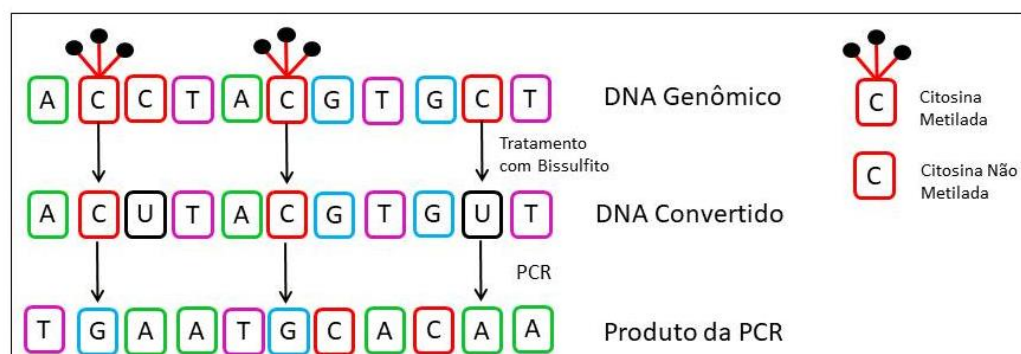


Figura 4: Esquema do processo que ocorre com o tratamento do DNA com bissulfito. (Adaptada Portinho, 2015).

Este processo foi realizado utilizando termociclador programado com as etapas: Desnaturação por 5 minutos a 95°C; Incubação por 10 minutos a 60°C; Desnaturação por 5 minutos a 95°C; Incubação de 10 minutos por 60°C; Incubação tempo indefinido de 20°C (Finalização da reação). Após este processo o DNA convertido passa por um processo de purificação e eluição. Em seguida, o DNA convertido foi amplificado e analisado utilizando os reagentes do *Pyro Mark PCR Kit* (QIAGEN, Hiden, Alemanha) e os iniciadores de amplificação para cada gene contidos nos ensaios *Pyro Mark CpG Assays* (QIAGEN, Hiden, Alemanha) descritos na tabela 1.

Tabela 1. Relação dos genes, número de sítios CpG e código do ensaio disponível para estudo de metilação

Gene	Número de sítios CpG	Código do ensaio	Tamanho Fragmentado
LDLR	7	Hs_LDLR_01_PMPyroMark CpG assay	259
	4	Hs_LDLR_02_PMPyroMark CpG assay	254
PCSK9	6	Hs_PCSK9_01_PMPyroMark CpG assay	231
	5	Hs_PCSK9_02_PMPyroMark CpG assay	200
LDLRAP1	3	Hs_LDLRAP1_01_PM_PyroMark CpG assay	103
	3	Hs_LDLRAP1_02_PM_PyroMark CpG assay	145

Legenda: Gene receptor de lipoproteína de baixa densidade (*LDLR*); gene da proteína convertase ubilisina/Kesina tipo 9 (*PCSK9*); gene da proteína adaptadora do receptor de lipoproteína de baixa densidade unidade 1 (*LDLRAP1*).

O ensaio adquirido comercialmente inclui um par de iniciadores para PCR (um deles possui biotina na extremidade 5') e um iniciador para o sequenciamento. Foram analisados os sítios CpG alvos, utilizando os iniciadores presentes nos ensaios para genes da *LDLR* (Figura 5), *PCSK9* (Figura 6) e *LDLRAP1* (Figura 7). Os produtos da PCR foram purificados utilizando esferas contendo estreptavidina (GE Healthcare Bio-ScienceAB, Uppsala, Suécia), tampão de lavagem, álcool 70% e solução de desnaturação. O processo de purificação e desnaturação do produto da PCR foi realizado utilizando o sistema *Pyro Mark Vacuum Workstation* (QIAGEN, Hiden, Alemanha).

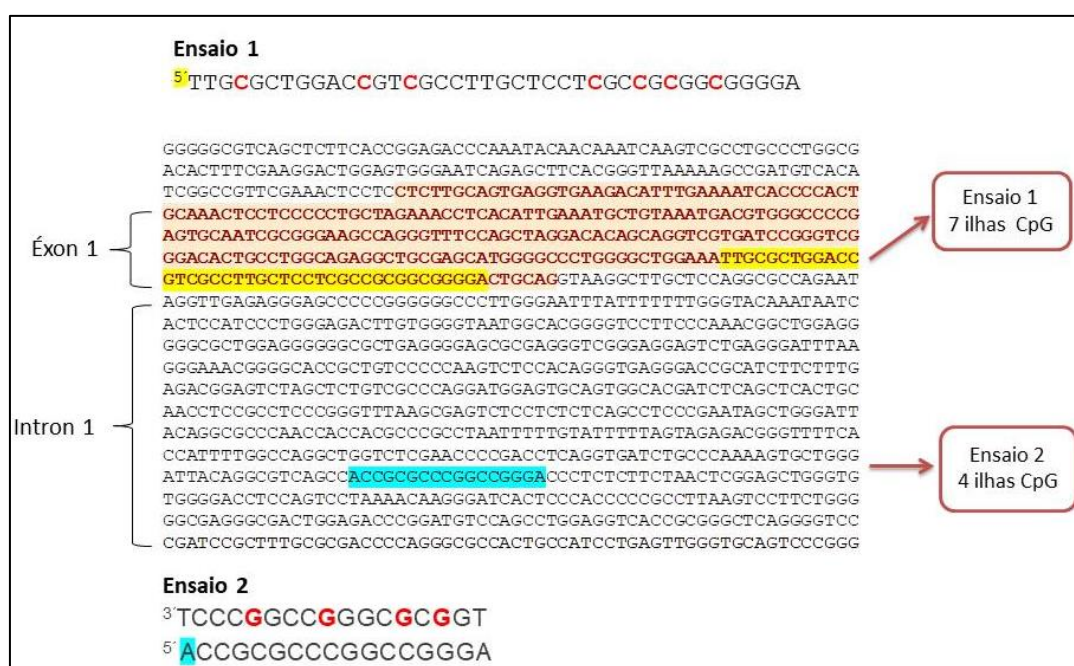


Figura 5- Representação das ilhas CpG e ensaios comerciais para análise de metilação do gene *LDLR*.

4.2.3 Pirossenquenciamento

Para a reação de sequenciamento foi utilizada a plataforma *Pyro Mark Q24* (QIAGEN, Hiden, Alemanha) no qual se inicia com a incorporação de um nucleotídeo na fita de DNA, realizada pela enzima DNA polimerase. Esta incorporação libera um pirofosfato inorgânico (PPi) que é convertido em ATP pela ação da enzima da ATP Sulfurilase fornecendo energia para a luciferase oxidar a luciferina presente na reação e gerar uma luz que é detectável pelo equipamento e convertido em um pico e analisada em tempo real. Estes picos são convertidos em um gráfico, no qual representa a percentagem de metilação por sítio CpG analisado. Além disso, na reação temos a ação da enzima Apirase, uma enzima de degradação de nucleotídeos não incorporados e ATP (Figura 8).

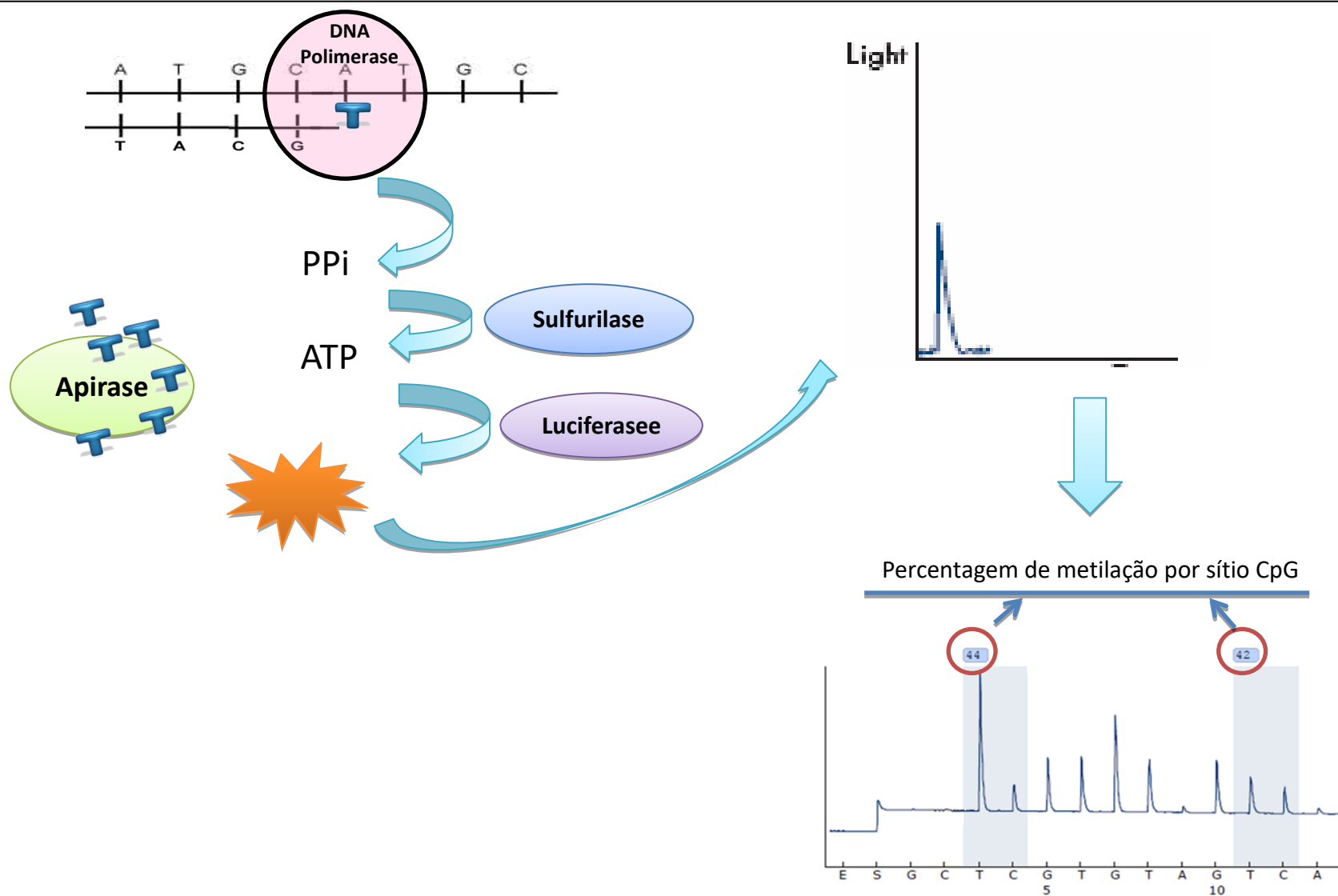


Figura 8. Representação da reação de pirosequenciamento. Fundamento do método de Pirosequenciador Q24 da Qiagen (www.qiagen.com).

Ao produto da PCR purificado e desnaturado foi adicionado os iniciadores de sequenciamento contido nos ensaios *Pyro Mark CpG Assays* (Tabela 1) (QIAGEN, Hiden, Alemanha), e o tampão de hibridização. A ordem de dispensação dos quatro desoxinucleotídeos (dTTP, dATP, dGTP e dCTP) é realizada utilizando o programa *Pyro Mark Assay Design 2.0* de acordo com a ordem descrita para cada ensaio. A análise através do pico de luminescência que é convertido pelo próprio *software* em percentagem de metilação, as percentagens são indicadas acima de cada sítio CpG em uma coloração que é estabelecida pelo software classificando o resultado como ótimo (azul), intermediário (amarelo), insatisfatório (vermelho), a figura 9 demonstra um exemplo de pirograma gerado.

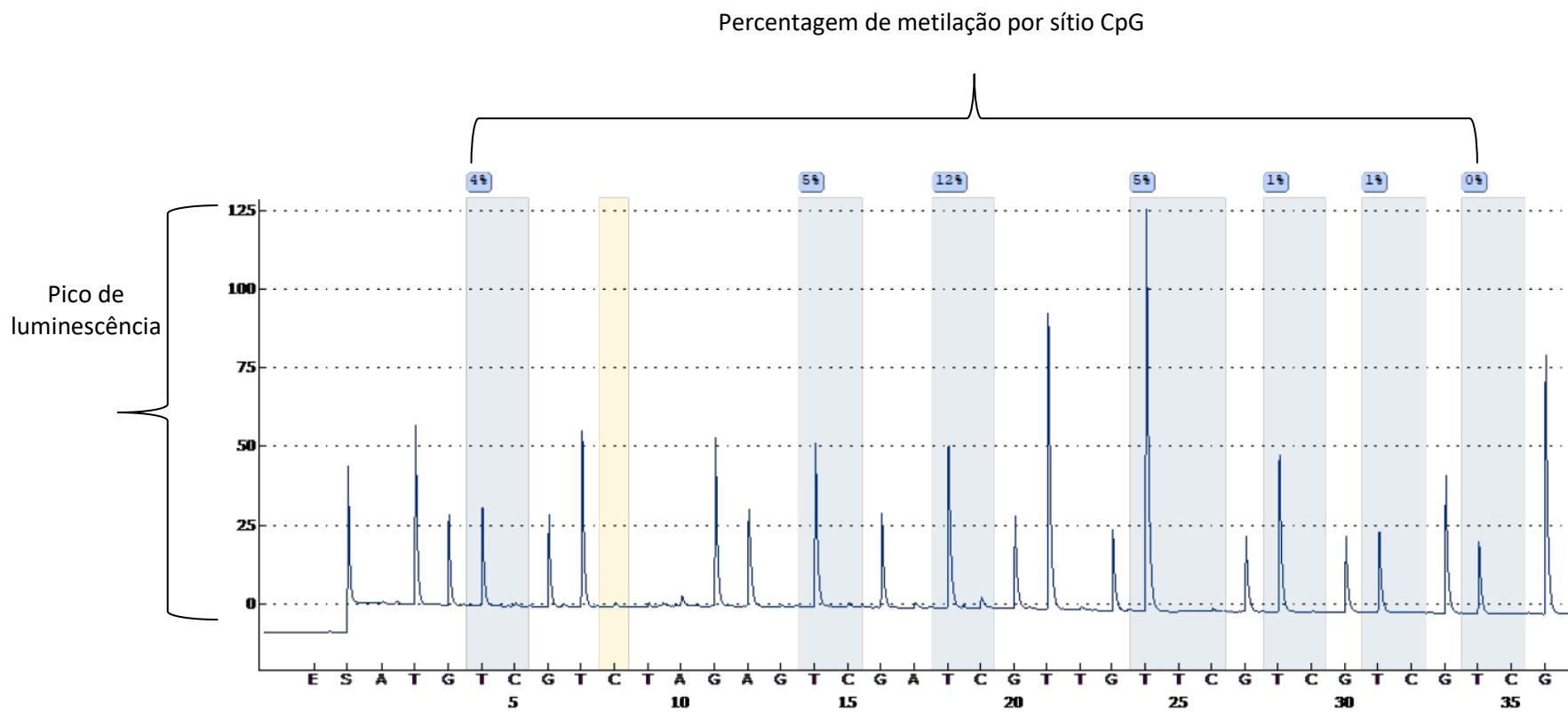


Figura 9: Pirograma representando a análise dos sítios CpG do gene *LDLR*, ensaio 1. As regiões sombreadas em azul representam os sítios CpG analisadas neste ensaio (Acima do pico o número sombreado em azul mostra percentual de metilação). No Gráfico, no eixo das ordenadas os números representam o pico de luminescência e no eixo das abscissas do gráfico a sequência de análise do ensaio.

4.3 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados através do *software* SPSS v.19 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). As variáveis categóricas foram apresentadas com números absolutos e relativos e as variáveis numéricas foram apresentadas com média e desvio padrão, conforme a normalidade da amostra avaliada pelo teste de Kolmogorov-Sminorv, o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Os gráficos foram elaborados utilizando o programa Graph Pad Prism, versão 1.03 (Sigma, CA, E.U.A.).

As variáveis categóricas foram comparadas utilizando o teste de qui-quadrado. Para a análise de dois grupos (Grupo I: Pacientes com diagnóstico molecular confirmado pelo estudo fenotípico e genotípico; Grupo II: Pacientes fenotipicamente determinados como hipercolesterolemico, mas sem diagnóstico molecular confirmado pelo estudo genômico), foi utilizado o teste T para as variáveis não paramétricas e o teste de Manny Whitney para as variáveis não paramétricas.

Para a análise dos três grupos (Grupo I: Pacientes com diagnóstico molecular confirmado pelo estudo fenotípico e genotípico; Grupo II: Pacientes fenotipicamente determinados como hipercolesterolemico, mas sem diagnóstico molecular confirmado pelo estudo genômico; Grupo III: indivíduos fenotipicamente determinados normolipidêmicos de acordo com a V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

Após os testes realizados, as variáveis com o valor de $p < 0,05$, foram submetidas ao teste complementar não paramétrico de Turkey utilizando o SPSS v.19 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) e o software R. 4.1.0.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Primeiramente foi realizada a análise comparativa dos dados biodemográficos entre o Grupo I (Pacientes com diagnóstico molecular confirmado pelo estudo fenotípico e genotípico) e Grupo II (Pacientes fenotipicamente determinados como hipercolesterolemico, mas sem diagnóstico molecular confirmado pelo estudo genômico). Os dados estão descritos na tabela 2. As variáveis analisadas não apresentaram resultados estatisticamente significativa entre os grupos na maioria dos parâmetros, exceto nos valores de TG ($p < 0,003$) e VLCLc ($p < 0,011$) e uso de estatina ($p = 0,033$, tabela 2).

Tabela 2. Dados biodemográficos dos pacientes HF fenotipicamente selecionados para o estudo de metilação.

Dados biodemográficos		Com diagnóstico genotípico de HF n= 40 (%)	Sem diagnóstico genotípico de HF (N= 93 %)	(p valor)
Idade, média (DP)		49,2 ±20,1	48,6 ±18,5	p= 0,795
Mulheres		67,5%	65,6%	p= 1,000
Homens		32,5%	34,4%	
Etnia	Caucasianos	57,5%	62,4%	p= 0,850
	Pardos	30,0%	25,8%	
	Preto	12,5%	10,8%	
	Asiáticos	0%	1,1%	
Presença de	Xantomas	25,6%	13,9%	p= 0,131
	Xantelasmas	17,9%	22,5%	p= 0,638
	Arco córneo	31,6%	8,8%	p= 0,003
	Espessamento de tendões	15,0%	7,4%	p= 0,208
Tabagista		10,0%	11,1%	p= 0,983
Etilista		15,0%	19,8%	p= 0,487
Ex- usuário de Drogas Ilícitas		2,5 %	0,0%	p= 0,331
DAC		47,5%	40,7%	p= 0,258
IAM		35,0%	25,6%	p= 0,295
RM		32,5%	28,7 %	p= 0,655
Uso de estatina		38,2%	61,8%	p= 0,033
CT		245,8±102,2	241,8 ±72,3	p= 0,583
HDL-c		59,4 ±40,2	52,1 ±15,7	p= 0,694
LDL-c		179,6 ±89,2	151,2 ±51,3	p= 0,065
VLDLc		25,8 ±16,2	34,5 ±24,4	p= 0,011
TG		118,4 ±66,3	171,4 ±121,6	p= 0,003

Legenda: CT: Colesterol total; HDL-c: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c= colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade, TG: triacilgliceróis; IAM: infarto agudo do miocárdio; DAC: doença arterial coronariana; RM: Revascularização do miocárdio, HF: hipercolesterolemia familiar; Etilismo: auto declarado, se realizava consumo de bebida alcoólica; Fumante: auto declarado.

A tabela 3 contém os dados biodemográficos dos indivíduos normolipidêmicos (grupo III), selecionados para inclusão no projeto, que apresentavam o perfil lipídico considerados fenotipicamente dentro dos valores de referência de acordo com a V Diretriz Brasileira de Dislipidemia e Prevenção de Aterosclerose (Xavier et al., 2013).

Tabela 3. Dados biodemográficos dos pacientes normolipidêmicos.

Dados biodemográficos		Normolipidêmicos n=23 (%)
Idade, média (DP)		35,9 ($\pm 11,0$)
Mulheres		69,6%
Homens		30,4%
Etnia	Caucasianos	69,6%
	Pardos	17,4%
	Preto	4,3%
	Asiáticos	8,7
Tabagista		0%
Etilista		47,8%
Ex- usuário de Drogas Ilícitas		0%
DAC		0%
IAM		0%
RM		0%
Presença de	Xantomas	0%
	Xantelasmas	0%
	Arco córneo	0%
	Espessamento de tendões	0%
CT		167,4 $\pm$ 23,7
HDL-c		55,3 $\pm$ 16,9
LDL-c		94,4 $\pm$ 18,4
VLDLc		17,6 $\pm$ 8,6
TG		88,3 $\pm$ 43,7

Legenda: CT: Colesterol total; HDL-c: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c= colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade, TG: triacilgliceróis; Etilismo: auto declarado, se realizava consumo de bebida alcóolica; Fumante: auto declarado; DAC: Doença Coronariana; IAM: Infarto Agudo do Miocárdio; RM: Revascularização do Miocárdio.

A tabela 4 contém a análise comparativa dos dados biodemográficos entre os grupos I, II e III. O teste Qui-quadrado foi utilizado na análise das variáveis contínuas e o teste de Kruskal- Walls utilizando para a análise das variáveis categóricas. Em ambas

análises o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Pode-se observar que as variáveis contínuas: Idade ($p = 0,002$), Tabagismo ($p = 0,004$), Etilismo ($p = 0,015$), e as variáveis categóricas: CT ($p = 0,000$), HDL-c ($p = 0,000$), LDL-c ($p = 0,000$), VLD-c ($p = 0,000$) e TG ($p = 0,000$), apresentaram diferença estatística significativa na análise comparativa entre os grupos.

Tabela 4. Dados biodemográficos dos grupos I, II e III do projeto

Dados biodemográficos		Com diagnóstico de HF N= 40 (%)	Sem diagnóstico de HF N=93 (%)	Indivíduos Normolipidêmicos (N=23 %)	(p valor)
Idade, média (DP)		49,2 (±20,1)	48,6 ±18,5	35,9 (±11,0)	p= 0,002
Mulheres		67,5%	65,6%	69,6%	p= 1,000
Homens		32,5%	34,4%	30,4%	
Etnia	Caucasian os	57,5%	62,4%	69,6%	p= 0,336
	Pardos	30,0%	25,8%	17,4%	
	Preto	12,5%	10,8%	4,3%	
	Asiaticos	-	1,1%	8,7	
Tabagista		10,0%	11,1%	0%	p= 0,004
Etilista		15,0%	19,8%	47,8%	p= 0,015
Ex- usuário de Drogas Ilícitas		2,5 %	0%	0%	p= 0,331
CT		245,8±102,2	241,8 ±72,3	167,4 ±23,7	p<0,001
HDL-c		59,4 ±40,2	52,1 ±15,7	55,3 ± 16,9	p= 0,461
LDL-c		179,6 ±89,2	151,2 ±51,3	94,4 ±18,4	p<0,001
VLDLc		25,8 ±16,2	34,5 ±24,4	17,6 ± 8,6	p<0,001
TG		118,4 ±66,3	171,4 ±121,6	88,3 ± 43,7	p<0,001

Legenda: CT: Colesterol total; HDL-c: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c= colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade, TG: triacilgliceróis,, HF: hipercolesterolemia familiar; Etilismo: auto declarado, se realizava consumo de bebida alcóolica; Fumante: auto declarado.

Após a realização da análise estatística anterior (Tabela 4). As variáveis contínuas, as quais foram estaticamente significativas ($p < 0,05$), foram submetidas á analise de variância entre os grupos (I, II e III), utilizando o teste de Turkey, o qual foi adotado o nível de significância $p < 0,05$. O resultado desta análise está descrito na Tabela 5. As variáveis analisadas apresentaram resultados estatisticamente significativos em todas as comparações entre os grupos I x II e II x III. Entretanto, as variáveis VLDL-c ($p = 0,025$) e TG ($p = 0,006$) também foram estatisticamente significativa na análise de comparativa entre os grupos I x II e grupo II x III.

Tabela 5. Análise das variáveis contínuas utilizando o teste de Turkey na comparação entre os grupos I, II e III

Váriavel	Comparação	(p valor)
Idade	Grupo I x Grupo II	0,986
	Grupo I x Grupo III	0,005
	Grupo II x Grupo III	p<0,001
CT	Grupo I x Grupo II	0,921
	Grupo I x Grupo III	p<0,001
	Grupo II x Grupo III	p<0,001
LDL-c	Grupo I x Grupo II	0,176
	Grupo I x Grupo III	p<0,001
	Grupo II x Grupo III	p<0,001
VLDL-c	Grupo I x Grupo II	0,025
	Grupo I x Grupo III	0,051
	Grupo II x Grupo III	p<0,001
TG	Grupo I x Grupo II	0,006
	Grupo I x Grupo III	0,1180
	Grupo II x Grupo III	p<0,001

Legenda: CT: Colesterol total; HDL-c: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c= colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade, TG: triacilgliceróis.

5.1 Resultados do estudo de Metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1*

Primeiramente, todos os sítios CpG presentes nos ensaios dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* (Tabela 1) foram submetidos a análise comparativa entre os grupos I, II e III utilizando o teste não paramétrico de Kruskal- Walls. Após a realização do teste citado anteriormente, os sítios CpG dos ensaios (*LDLR-1* e *LDLR-2*) e (*PCSK9-1* e *PCSK9-*

2) que foram estatisticamente significativo (Apêndice 1, Tabela 20) foram submetidos a análise de variância utilizando o teste de Turkey, o qual foi adotado significância de $p < 0,05$ (Apêndice 1, Tabela 21). Os demais sítios CpG destes genes, incluindo os ensaios (*LDLRAP1-1* e *LDLRAP1-2*) que não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos encontra-se descritos no Apêndice 1, tabela 20.

As figuras 10 a 17 demonstram a média da percentagem de metilação dos sítios CpG dos ensaios (*LDLR-1* e *LDLR-2*) e (*PCSK9-1* e *PCSK9-2*), que apresentaram diferença estatística significativa pela análise de variância utilizando o teste de Turkey. A grande maioria dos sítios analisados apresentaram resultados estatisticamente significativos em todas as comparações entre os grupos I x III e grupo II x III. Entretanto, os ensaios *LDLR_Sítio2_Ensaio1* ($p=0,020$), *LDLR_Sítio4_Ensaio2* ($p=0,029$) e *PCSK9_Sítio4_Ensaio1* ($p=0,015$), apresentaram diferença estatística significativa apenas na comparação entre o grupo I e III.

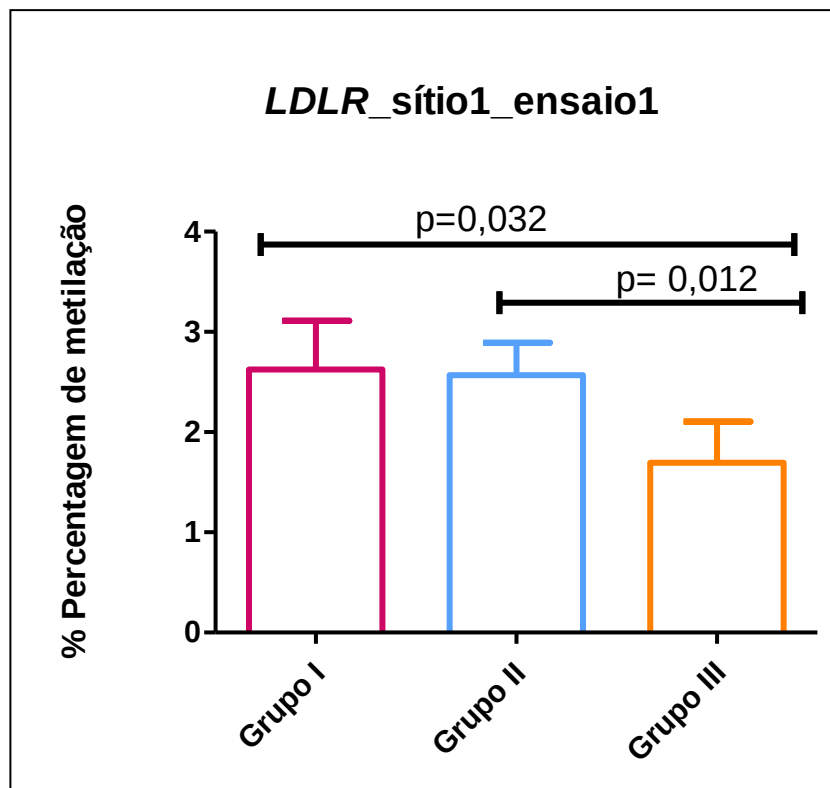


Figura 10: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *LDLR-1* sítio CpG 1

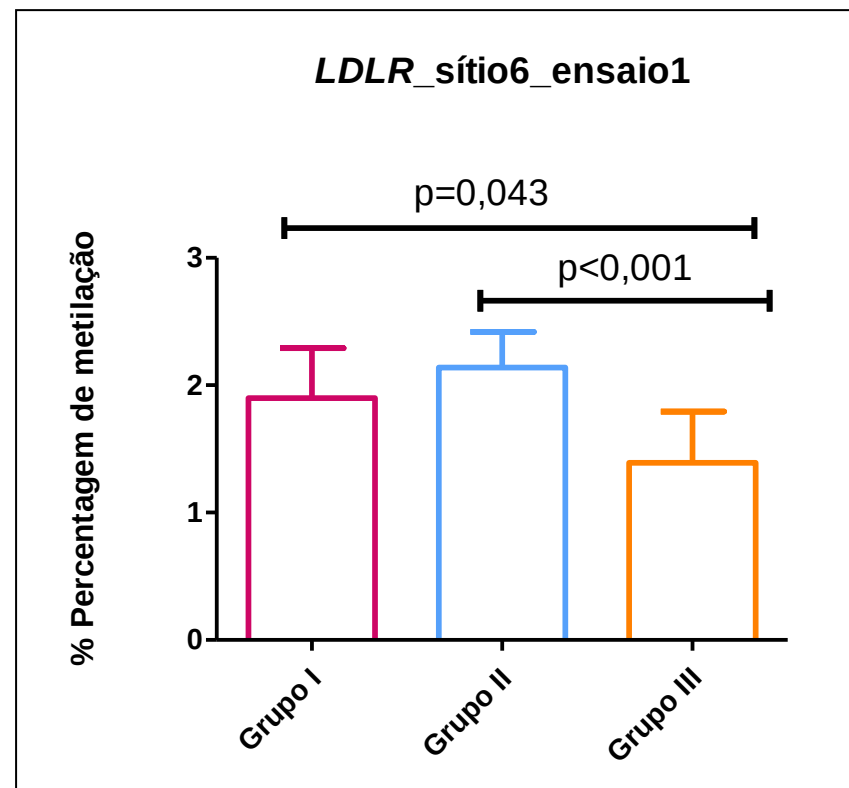


Figura 11: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *LDLR-1* sítio CpG 6

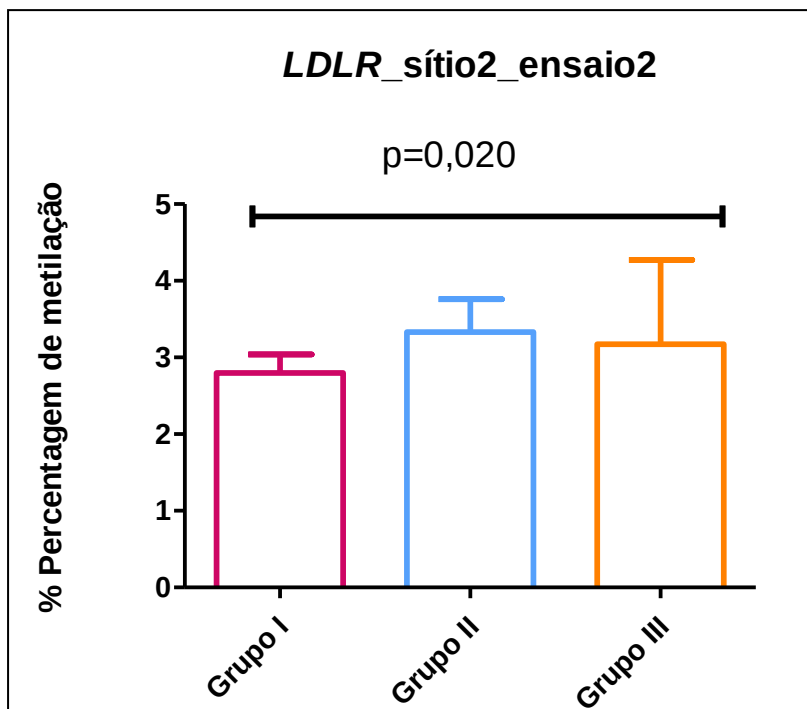


Figura 12: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *LDLR-2* sítio CpG 2

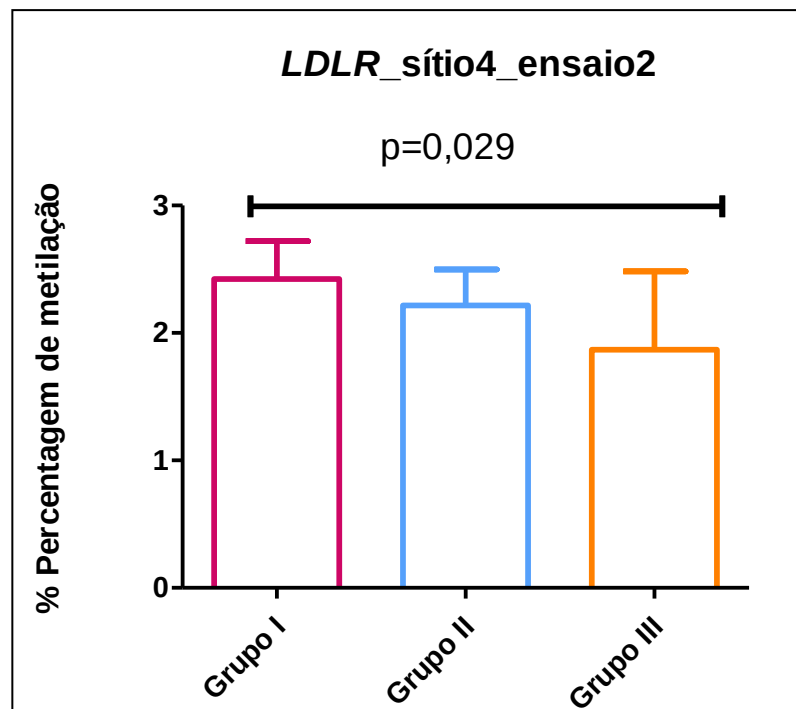


Figura 13: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *LDLR-2* sítio CpG 4

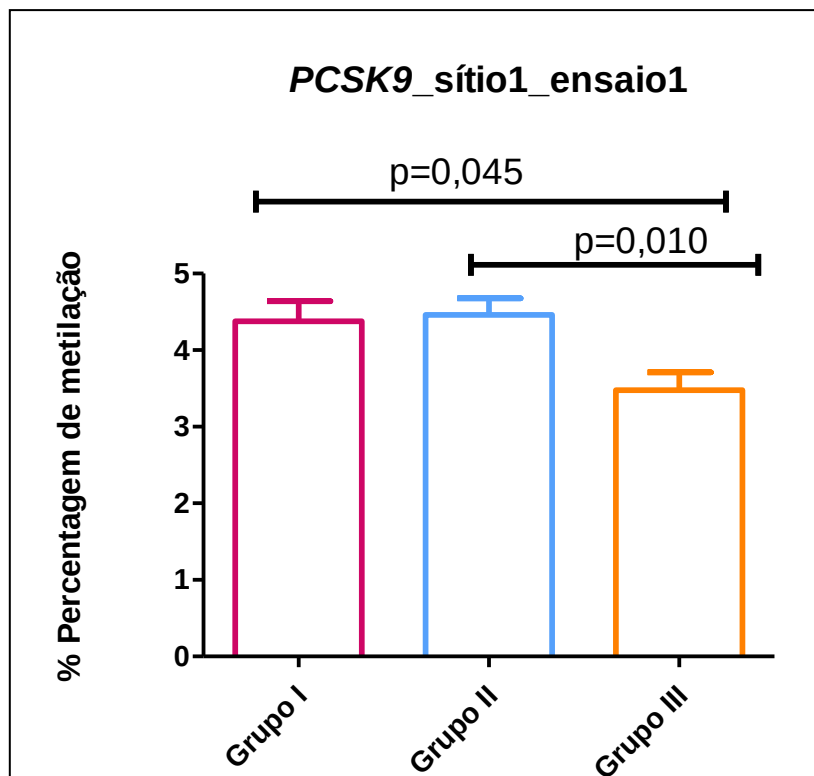


Figura 14: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *PCSK9-1* sítio CpG 1

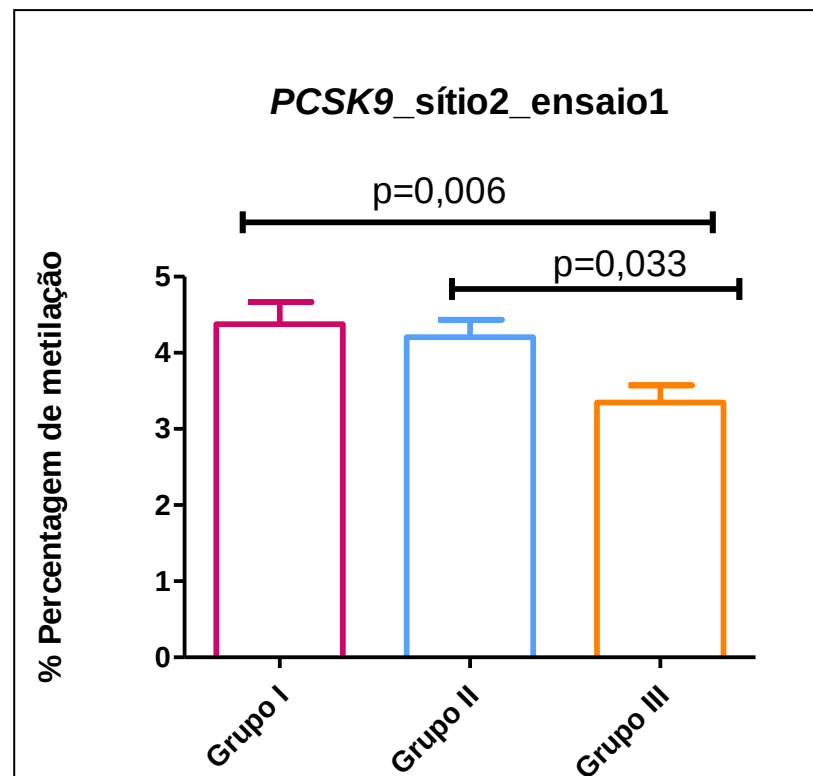


Figura 15: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *PCSK9-1* sítio CpG 2

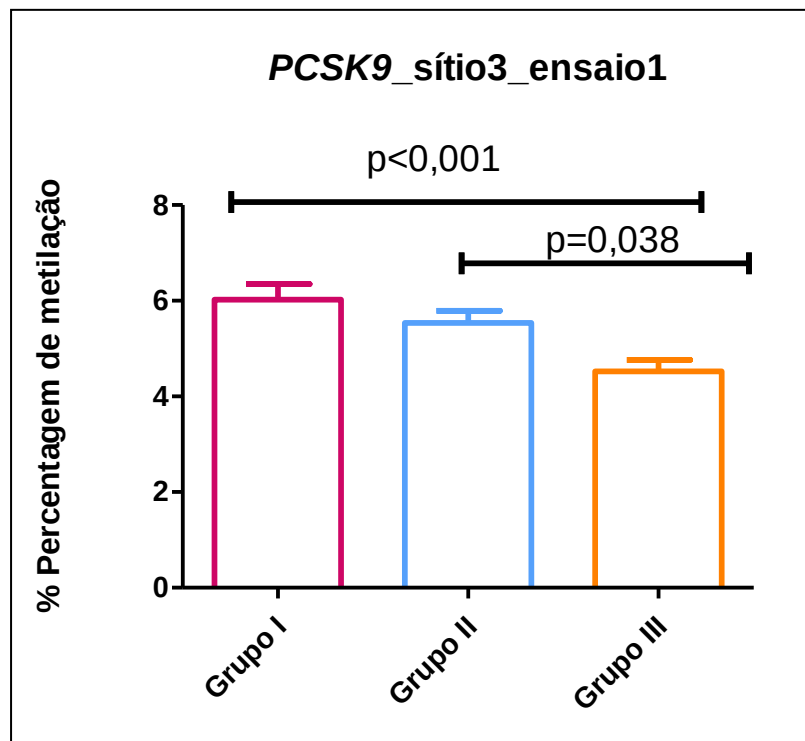


Figura 16: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *PCSK9-1* sítio CpG 3

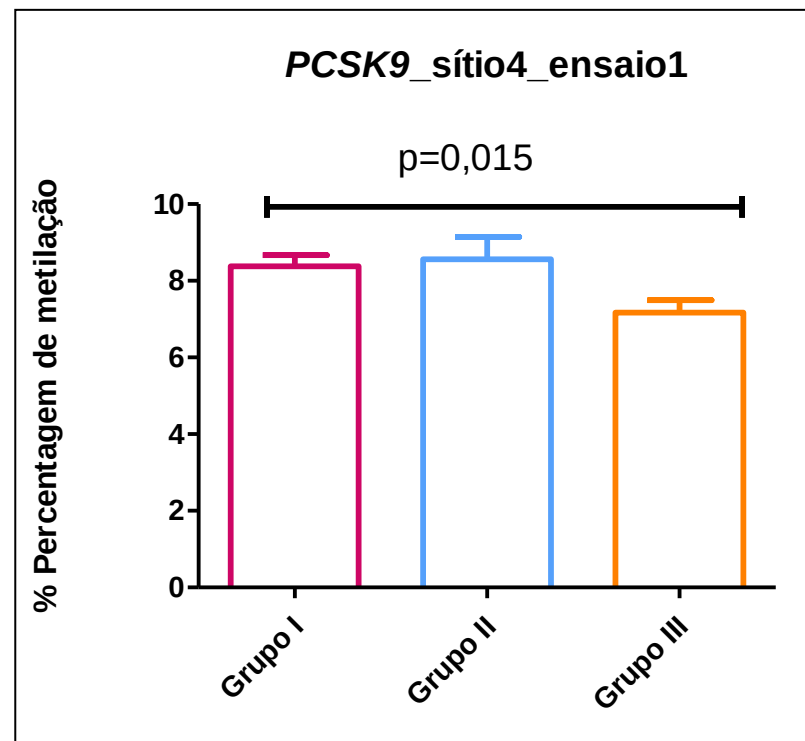


Figura 17: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *PCSK9-1* sítio CpG 4

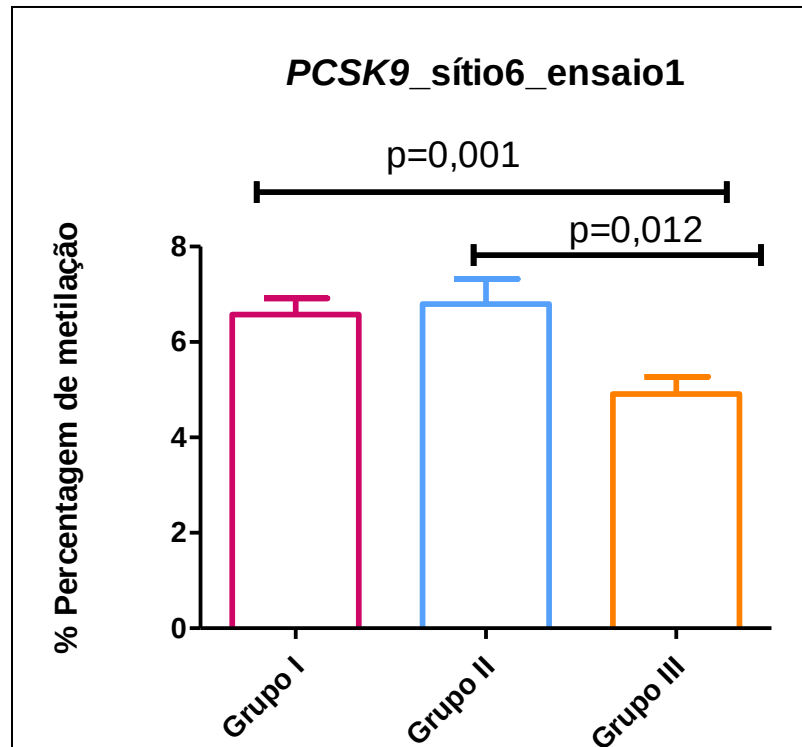


Figura 18: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *PCSK9-1* sítio CpG 6

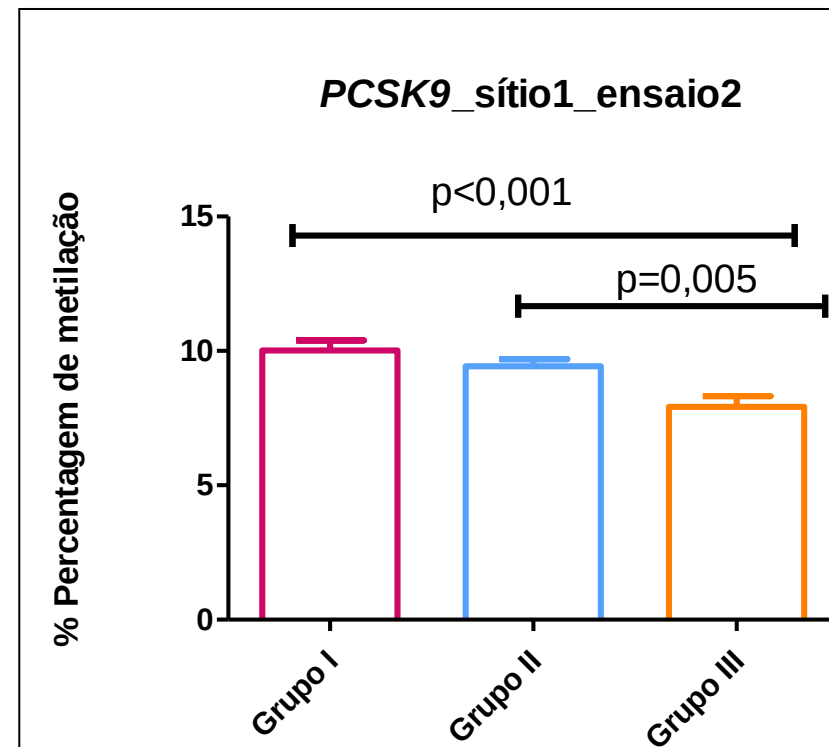


Figura 19: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *PCSK9-2* sítio CpG 1

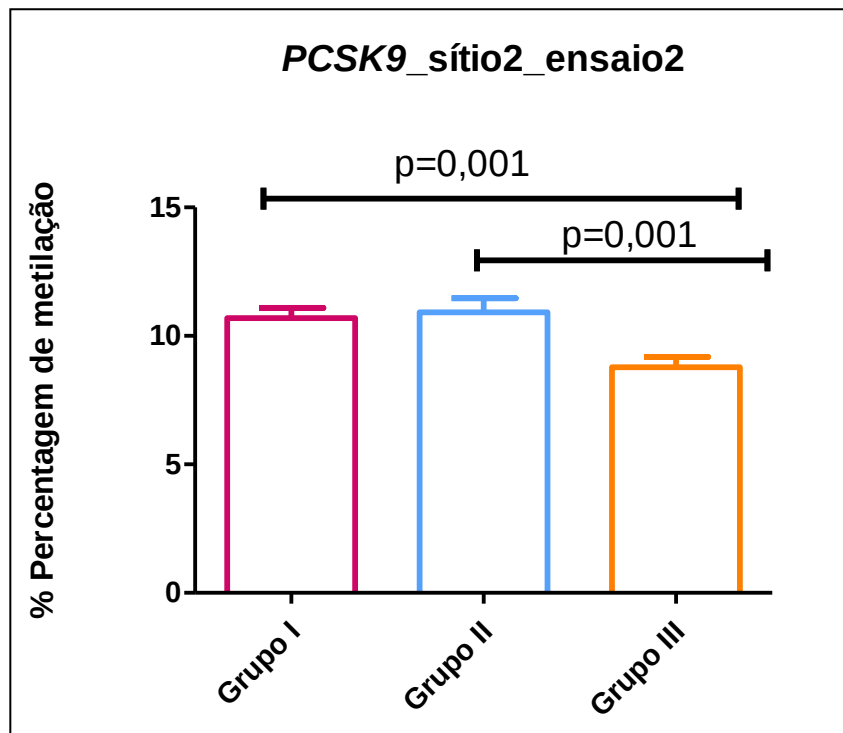


Figura 20: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *PCSK9*-2 sítio CpG 2

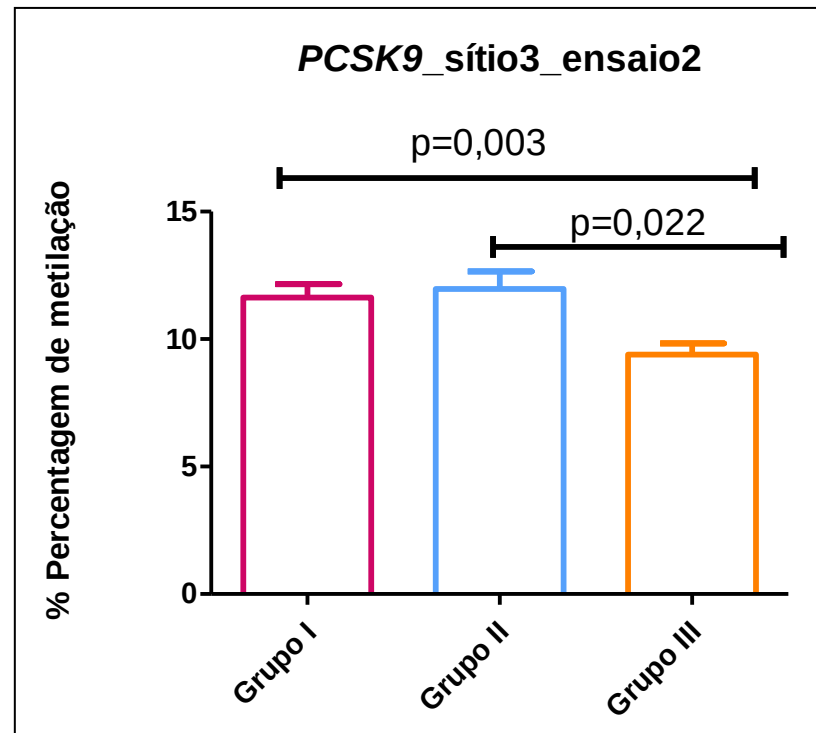


Figura 21: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *PCSK9*-2 sítio CpG 3

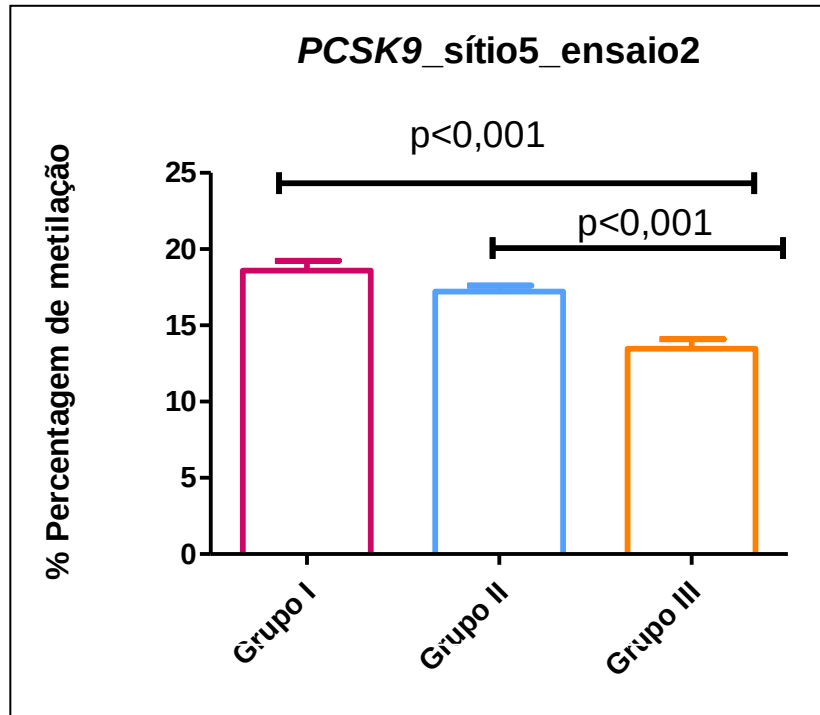


Figura 22: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *PCSK9*-2 sítio CpG 5

5.2 Resultados do estudo de Metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* correlacionados com a Idade

Para a avaliação da correlação da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* (Tabela 1) relacionando com a idade dos participantes deste projeto nos grupos I, II e III, foi realizada análise de correlação não paramétrica de Sperman's (Tabela 6) o qual foi adotado significância de $p < 0,05$. Na avaliação da correlação os ensaios: *LDLR_Sítio1_Ensaio1* ($p=0,046$, $r=0,160$), *LDLR_Sítio5_Ensaio1* ($p=0,018$, $r=0,189$), *PCSK9_Sítio2_Ensaio1* ($p=0,020$, $r=0,186$), *PCSK9_Sítio4_Ensaio1* ($p=0,042$, $r=0,163$) e *PCSK9_Sítio4_Ensaio2* ($p=0,032$, $r=0,172$) correlacionaram-se positivamente com a Idade, porém a correlação foi considerada muito baixa ($r=0.00$ a 0.19). Os ensaios *LDLR_Sítio1_Ensaio2* ($p=0,013$, $r=-0,198$), *LDLR_Sítio4_Ensaio2* ($p=0,046$, $r=-0,160$) correlacionaram-se negativamente com a idade, porém foi uma correlação considerada muito baixa ($r=-0.00$ a -0.19).

Os ensaios *PCSK9_Sítio1_Ensaio1* ($p=0,004$, $r=0,229$), *PCSK9_Sítio5_Ensaio1* ($p=0,006$, $r=0,218$), *PCSK9_Sítio6_Ensaio1* ($p < 0,001$, $r=0,277$), *PCSK9_Sítio1_Ensaio2* ($p < 0,001$, $r=0,382$), *PCSK9_Sítio2_Ensaio2* ($p=0,001$, $r=0,265$), *PCSK9_Sítio3_Ensaio2* ($p=0,002$, $r=0,245$) e O ensaio *LDLRAP1_Sítio 2_Ensaio2* ($p < 0,001$, $r=0,342$) correlacionaram-se positivamente com a idade, esta correlação foi considerada baixa ($r=0.20$ a 0.39). O ensaio *LDLR_Sítio2_Ensaio2* ($p=0,011$, $r=-0,202$) correlacionou-se com a idade de forma negativa, esta correlação foi baixa ($r=-0.20$ a -0.39).

Apenas o ensaio *PCSK9_Sítio5_Ensaio2* ($p < 0,001$, $r=0,411$) correlacionou-se de forma moderadamente significativa e positivamente ($r=0.40$ a 0.69) com a idade.

Tabela 6. Análise dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* correlacionando com a idade

Ensaio	Correlação	Intepretação da correlação	(valor de p)
LDLR_SITIO1_ENSAIO1	$r=0,160$	Positiva Muito baixa	0,046
LDLR_SITIO2_ENSAIO1	$r=0,037$	Positiva Muito baixa	0,643
LDLR_SITIO3_ENSAIO1	$r=0,039$	Positiva Muito baixa	0,628
LDLR_SITIO4_ENSAIO1	$r=0,073$	Positiva Muito baixa	0,363
LDLR_SITIO5_ENSAIO1	$r=0,189$	Positiva Muito baixa	0,018
LDLR_SITIO6_ENSAIO1	$r=0,125$	Positiva Muito baixa	0,119
continua			

continuação			
Ensaio	Correlação	Intepretação da correlação	(valor de p)
LDLR_SITIO7_ENSAIO1	r= 0,145	Positiva Muito baixa	0,071
LDLR_SITIO1_ENSAIO2	r= -0,198	Negativa Muito baixa	0,013
LDLR_SITIO2_ENSAIO2	r= -0,202	Negativa baixa	0,011
LDLR_SITIO3_ENSAIO3	r= -0,010	Negativa Muito baixa	0,900
LDLR_SITIO4_ENSAIO4	r= -0,160	Negativa Muito baixa	0,046
PCSK9_SITIO1_ENSAIO1	r= 0,229	Positiva baixa	0,004
PCSK9_SITIO2_ENSAIO1	r= 0,186	Positiva Muito baixa	0,020
PCSK9_SITIO3_ENSAIO1	r= 0,135	Positiva Muito baixa	0,092
PCSK9_SITIO4_ENSAIO1	r= 0,163	Positiva Muito baixa	0,042
PCSK9_SITIO5_ENSAIO1	r= 0,218	Positiva baixa	0,006
PCSK9_SITIO6_ENSAIO1	r= 0,277	Positiva baixa	p<0,001
PCSK9_SITIO1_ENSAIO2	r= 0,382	Positiva baixa	p<0,001
PCSK9_SITIO2_ENSAIO2	r= 0,265	Positiva baixa	0,001
PCSK9_SITIO3_ENSAIO2	r= 0,245	Positiva baixa	0,002
PCSK9_SITIO4_ENSAIO2	r= 0,172	Positiva Muito baixa	0,032
PCSK9_SITIO5_ENSAIO2	r= 0,411	Positiva moderada	p<0,001
LDLRAP1_SITIO1_ENSAIO1	r= -0,103	Negativa Muito baixa	0,203
LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO1	r= 0,030	Positiva baixa	0,712
LDLRAP1_SITIO3_ENSAIO1	r= 0,010	Positiva Muito baixa	0,903
LDLRAP1_SITIO1_ENSAIO2	r= -0,046	Negativa Muito baixa	0,572
LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO2	r= -0,342	Negativa baixa	p<0,001
LDLRAP1_SITIO3_ENSAIO2	r= -0,103	Negativa Muito baixa	0,199

Legenda: *LDLR*: Gene do receptor da LDL; *PCSK9*: Gene da proteína convertase subtilisina/kesina tipo 9; *LDLRAP1*: Gene da proteína adaptadora do receptor de lipoproteína de baixa densidade unidade 1

5.3 Resultados do estudo correlação entre Metilação dos sitios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* e a concentração plasmática de CT

Para a avaliação da correlação da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* (Tabela 1) relacionando com a concentração plasmática de CT nos grupos I, II e III, foi realizada a correlação não paramétrica de Sperman's o qual foi adotado significância de $p<0,05$. Os ensaios *LDLR_SITIO6_ENSAIO1* ($p= 0,037$, $r= 0,168$) e *PCSK9_SITIO1_ENSAIO2* ($p=0,017$, $r= 0,192$) correlacionaram-se de forma positiva muito baixa ($r= 0.00$ a 0.19) com a concentração plasmática de CT.

Tabela 7. Análise dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* correlacionando com CT

Ensaio	Correlação	Intepretação da correlação	(valor de p)
LDLR_SITIO1_ENSAIO1	r= 0,141	Positiva Muito baixa	0,080
LDLR_SITIO2_ENSAIO1	r= 0,103	Positiva Muito baixa	0,204
LDLR_SITIO3_ENSAIO1	r= 0,038	Positiva Muito baixa	0,636
LDLR_SITIO4_ENSAIO1	r= 0,003	Positiva Muito baixa	0,973
LDLR_SITIO5_ENSAIO1	r= 0,148	Positiva Muito baixa	0,066
LDLR_SITIO6_ENSAIO1	r= 0,168	Positiva Muito baixa	0,037
LDLR_SITIO7_ENSAIO1	r= 0,075	Positiva Muito baixa	0,353
LDLR_SITIO1_ENSAIO2	r= -0,030	Negativa Muito baixa	0,714
LDLR_SITIO2_ENSAIO2	r= -0,035	Negativa Muito baixa	0,662
LDLR_SITIO3_ENSAIO3	r= 0,116	Positiva Muito baixa	0,152
LDLR_SITIO4_ENSAIO4	r= 0,032	Positiva Muito baixa	0,693
PCSK9_SITIO1_ENSAIO1	r= 0,021	Positiva Muito baixa	0,793
PCSK9_SITIO2_ENSAIO1	r= 0,064	Positiva Muito baixa	0,427
PCSK9_SITIO3_ENSAIO1	r= 0,100	Positiva Muito baixa	0,215
PCSK9_SITIO4_ENSAIO1	r= 0,080	Positiva Muito baixa	0,324
PCSK9_SITIO5_ENSAIO1	r= 0,055	Positiva Muito baixa	0,500
PCSK9_SITIO6_ENSAIO1	r= 0,085	Positiva Muito baixa	0,291
PCSK9_SITIO1_ENSAIO2	r= 0,192	Positiva Muito baixa	0,017
PCSK9_SITIO2_ENSAIO2	r= 0,106	Positiva Muito baixa	0,188
PCSK9_SITIO3_ENSAIO2	r= 0,041	Positiva Muito baixa	0,615
PCSK9_SITIO4_ENSAIO2	r= 0,070	Positiva Muito baixa	0,386
PCSK9_SITIO5_ENSAIO2	r= 0,121	Positiva Muito baixa	0,133
LDLRAP1_SITIO1_ENSAIO1	r= 0,073	Positiva Muito baixa	0,368
LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO1	r= -0,002	Negativa Muito baixa	0,978
LDLRAP1_SITIO3_ENSAIO1	r= -0,049	Negativa Muito baixa	0,546
LDLRAP1_SITIO1_ENSAIO2	r= - 0,122	Negativa Muito baixa	0,129
LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO2	r= -0,037	Negativa Muito baixa	0,648
LDLRAP1_SITIO3_ENSAIO2	r= 0,018	Positiva Muito baixa	0,825

Legenda: *LDLR*: Gene do receptor da LDL; *PCSK9*: Gene da proteína convertase subtilisina/kesina tipo 9; *LDLRAP1*: Gene da proteína adaptadora do receptor de lipoproteína de baixa densidade unidade 1; CT: colesterol total

Para a avaliação da correlação da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* (Tabela 1) relacionando com a concentração plasmática de HDL-c nos grupos I, II e III, foi realizada a correlação não paramétrica de Sperman's o qual foi adotado significância de $p < 0,05$. Apenas o ensaio *PCSK9_SITIO5_ENSAIO1* ($p = 0,044$, $r = -0,162$) correlacionou de forma negativa muito baixa ($r = -0,00$ a $-0,19$) com a concentração plasmática de HDL-c.

Tabela 8. Análise dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* correlacionando com HDL-c

Ensaio	Correlação	Intepretação da correlação	(valor de p)
LDLR_SITIO1_ENSAIO1	r= -0,029	Positiva baixa	0,717
LDLR_SITIO2_ENSAIO1	r= -0,020	Positiva baixa	0,802
LDLR_SITIO3_ENSAIO1	r= 0,043	Positiva Moderada	0,596
LDLR_SITIO4_ENSAIO1	r= -0,021	Negativa baixa	0,799
LDLR_SITIO5_ENSAIO1	r= -0,048	Negativa Moderada	0,556
LDLR_SITIO6_ENSAIO1	r= -0,032	Negativa baixa	0,692
LDLR_SITIO7_ENSAIO1	r= 0,029	Positiva baixa	0,718
LDLR_SITIO1_ENSAIO2	r= 0,035	Positiva baixa	0,661
LDLR_SITIO2_ENSAIO2	r= - 0,026	Negativa baixa	0,746
LDLR_SITIO3_ENSAIO3	r= 0,026	Positiva baixa	0,752
LDLR_SITIO4_ENSAIO4	r= 0,055	Positiva Muito baixa	0,498
PCSK9_SITIO1_ENSAIO1	r= - 0,111	Negativa Muito baixa	0,168
PCSK9_SITIO2_ENSAIO1	r= -0,083	Negativa Muito baixa	0,307
PCSK9_SITIO3_ENSAIO1	r= -0,086	Negativa Muito baixa	0,289
PCSK9_SITIO4_ENSAIO1	r= -0,090	Negativa Muito baixa	0,264
PCSK9_SITIO5_ENSAIO1	r= -0,162	Negativa Muito baixa	0,044
PCSK9_SITIO6_ENSAIO1	r= - 0,080	Negativa Muito baixa	0,324
PCSK9_SITIO1_ENSAIO2	r= -0,110	Negativa Muito baixa	0,174
PCSK9_SITIO2_ENSAIO2	r= -0,087	Negativa Muito baixa	0,281
PCSK9_SITIO3_ENSAIO2	r= -0,061	Negativa Muito baixa	0,449
PCSK9_SITIO4_ENSAIO2	r= 0,005	Positiva Muito baixa	0,953
PCSK9_SITIO5_ENSAIO2	r= -0,045	Negativa Muito baixa	0,575
LDLRAP1_SITIO1_ENSAIO1	r= - 0,004	Negativa Muito baixa	0,961
LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO1	r= 0,049	Positiva Muito baixa	0,545
LDLRAP1_SITIO3_ENSAIO1	r= -0,068	Negativa Muito baixa	0,403
LDLRAP1_SITIO1_ENSAIO2	r= - 0,148	Negativa Muito baixa	0,065
LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO2	r= - 0,008	Negativa Muito baixa	0,925
LDLRAP1_SITIO3_ENSAIO2	r= -0,094	Negativa Muito baixa	0,243

Legenda: *LDLR*: Gene do receptor da LDL; *PCSK9*: Gene da proteína convertase subtilisina/kesina tipo 9; *LDLRAP1*: Gene da proteína adaptadora do receptor de lipoproteína de baixa densidade unidade 1; HDL-c: Lipoproteína de alta densidade.

5.5 Resultados do estudo de correlação entre Metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* e a concentração plasmática de LDL-c

Para a avaliação da correlação da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* (Tabela 1) relacionando com a concentração plasmática de LDL-c nos grupos I, II e III, foi realizada a correlação não paramétrica de Sperman's o qual foi adotado significância de $p < 0,05$. Apenas o ensaio *PCSK9_SITIO1_ENSAIO2*

($p=0,028$, $r= 0,177$) correlacionou de forma positiva muito baixa ($r= 0.00$ a 0.19) com a concentração plasmática de LDL-c.

Tabela 9. Análise dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* correlacionando com LDL-c

Ensaio	Correlação	Intepretação da correlação	(valor de p)
LDLR_SITIO1_ENSAIO1	$r= 0,104$	Positiva Muito baixa	0,198
LDLR_SITIO2_ENSAIO1	$r= 0,073$	Positiva Muito baixa	0,367
LDLR_SITIO3_ENSAIO1	$r= 0,016$	Positiva Muito baixa	0,843
LDLR_SITIO4_ENSAIO1	$r= -0,029$	Negativa Muito baixa	0,723
LDLR_SITIO5_ENSAIO1	$r= 0,108$	Positiva Muito baixa	0,182
LDLR_SITIO6_ENSAIO1	$r= 0,136$	Positiva Muito baixa	0,093
LDLR_SITIO7_ENSAIO1	$r= 0,026$	Positiva Muito baixa	0,749
LDLR_SITIO1_ENSAIO2	$r= -0,049$	Negativa Muito baixa	0,545
LDLR_SITIO2_ENSAIO2	$r= -0,024$	Negativa Muito baixa	0,769
LDLR_SITIO3_ENSAIO3	$r= 0,072$	Positiva Muito baixa	0,374
LDLR_SITIO4_ENSAIO4	$r= 0,019$	Positiva Muito baixa	0,818
PCSK9_SITIO1_ENSAIO1	$r= 0,032$	Positiva Muito baixa	0,694
PCSK9_SITIO2_ENSAIO1	$r= 0,076$	Positiva Muito baixa	0,345
PCSK9_SITIO3_ENSAIO1	$r= 0,107$	Positiva Muito baixa	0,184
PCSK9_SITIO4_ENSAIO1	$r= 0,095$	Positiva Muito baixa	0,240
PCSK9_SITIO5_ENSAIO1	$r= 0,070$	Positiva Muito baixa	0,385
PCSK9_SITIO6_ENSAIO1	$r= 0,070$	Positiva Muito baixa	0,386
PCSK9_SITIO1_ENSAIO2	$r= 0,177$	Positiva Muito baixa	0,028
PCSK9_SITIO2_ENSAIO2	$r= 0,076$	Positiva Muito baixa	0,350
PCSK9_SITIO3_ENSAIO2	$r= 0,020$	Positiva Muito baixa	0,805
PCSK9_SITIO4_ENSAIO2	$r= 0,024$	Positiva Muito baixa	0,767
PCSK9_SITIO5_ENSAIO2	$r= 0,126$	Positiva Muito baixa	0,118
LDLRAP1_SITIO1_ENSAIO1	$r= 0,064$	Positiva Muito baixa	0,432
LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO1	$r= -0,051$	Positiva Muito baixa	0,525
LDLRAP1_SITIO3_ENSAIO1	$r= -0,059$	Positiva Muito baixa	0,464
LDLRAP1_SITIO1_ENSAIO2	$r= -0,111$	Negativa Muito baixa	0,167
LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO2	$r= -0,065$	Negativa Muito baixa	0,167
LDLRAP1_SITIO3_ENSAIO2	$r= 0,022$	Negativa Muito baixa	0,783

Legenda: *LDLR*: Gene do receptor da LDL; *PCSK9*: Gene da proteína convertase subtilisina/kesina tipo 9; *LDLRAP1*: Gene da proteína adaptadora do receptor de lipoproteína de baixa densidade unidade 1; LDL-c: lipoproteína de baixa densidade

5.6 Resultados do estudo de Metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* correlacionado com a concentração plasmática de VLDL-c

Para a avaliação da correlação da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* (Tabela 1) relacionando com a concentração plasmática de VLDL-c nos grupos I, II e III, foi realizada a correlação não paramétrica de Sperman's o qual foi adotado significância de $p < 0,05$. Nenhum dos sítios CpG apresentou estatística significativa.

Tabela 10. Análise dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* correlacionando com Valores de VLDL-c

Ensaio	Correlação	Intepretação da correlação	(valor de p)
LDLR_SITIO1_ENSAIO1	$r = 0,129$	Positiva Muito baixa	0,111
LDLR_SITIO2__ENSAIO1	$r = 0,092$	Positiva Muito baixa	0,256
LDLR_SITIO3__ENSAIO1	$r = 0,028$	Positiva Muito baixa	0,730
LDLR_SITIO4__ENSAIO1	$r = -0,013$	Negativa Muito baixa	0,870
LDLR_SITIO5__ENSAIO1	$r = 0,125$	Positiva Muito baixa	0,120
LDLR_SITIO6__ENSAIO1	$r = 0,098$	Positiva Muito baixa	0,223
LDLR_SITIO7__ENSAIO1	$r = 0,083$	Positiva Muito baixa	0,307
LDLR_SITIO1_ENSAIO2	$r = -0,084$	Negativa Muito baixa	0,297
LDLR_SITIO2_ENSAIO2	$r = -0,072$	Negativa Muito baixa	0,371
LDLR_SITIO3_ENSAIO3	$r = 0,075$	Positiva Muito baixa	0,355
LDLR_SITIO4_ENSAIO4	$r = -0,036$	Negativa Muito baixa	0,659
PCSK9_SITIO1_ENSAIO1	$r = 0,060$	Positiva Muito baixa	0,456
PCSK9_SITIO2_ENSAIO1	$r = 0,078$	Positiva Muito baixa	0,335
PCSK9_SITIO3_ENSAIO1	$r = 0,056$	Positiva Muito baixa	0,487
PCSK9_SITIO4_ENSAIO1	$r = 0,044$	Positiva Muito baixa	0,583
PCSK9_SITIO5_ENSAIO1	$r = 0,054$	Positiva Muito baixa	0,503
PCSK9_SITIO6_ENSAIO1	$r = 0,149$	Positiva Muito baixa	0,604
PCSK9_SITIO1_ENSAIO2	$r = 0,103$	Positiva Muito baixa	0,201
PCSK9_SITIO2_ENSAIO2	$r = 0,087$	Positiva Muito baixa	0,283
PCSK9_SITIO3_ENSAIO2	$r = 0,028$	Positiva Muito baixa	0,733
PCSK9_SITIO4_ENSAIO2	$r = 0,034$	Positiva Muito baixa	0,674
PCSK9_SITIO5_ENSAIO2	$r = 0,119$	Positiva Muito baixa	0,140
LDLRAP1_SITIO1_ENSAIO1	$r = 0,089$	Positiva Muito baixa	0,271
LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO1	$r = 0,062$	Positiva Muito baixa	0,441
LDLRAP1_SITIO3_ENSAIO1	$r = 0,040$	Positiva Muito baixa	0,621
LDLRAP1_SITIO1_ENSAIO2	$r = -0,030$	Negativa Muito baixa	0,715
LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO2	$r = 0,040$	Positiva Muito baixa	0,623
LDLRAP1_SITIO3_ENSAIO2	$r = 0,032$	Positiva Muito baixa	0,692

Legenda: *LDLR*: Gene do receptor da LDL; *PCSK9*: Gene da proteína convertase subtilisina/kesina tipo 9; *LDLRAP1*: Gene da proteína adaptadora do receptor de lipoproteína de baixa densidade unidade 1; VLD-c: lipoproteína de muita baixa densidade

5.7 Resultados do estudo de Metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* correlacionado com a concentração plasmática de Triglicerídeos (TG)

Para a avaliação da correlação da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* (Tabela 1) relacionando com a concentração plasmática de TG nos grupos I, II e III, foi realizada a correlação não paramétrica de Spearman's o qual foi adotado significância de $p < 0,05$. Apenas o sítio *LDLR_SITIO5_ENSAIO1* ($p = 0,039$, $r = 0,166$) apresentou correlação positiva muito baixa ($r = 0,00$ a $0,19$) com o TG. (tabela 11)

Tabela 11. Análise dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* correlacionando com TG

Ensaio	Correlação	Intepretação da correlação	(valor de p)
<i>LDLR_SITIO1_ENSAIO1</i>	$r = 0,105$	Positiva Muito baixa	0,193
<i>LDLR_SITIO2_ENSAIO1</i>	$r = 0,074$	Positiva Muito baixa	0,360
<i>LDLR_SITIO3_ENSAIO1</i>	$r = -0,006$	Positiva Muito baixa	0,943
<i>LDLR_SITIO4_ENSAIO1</i>	$r = 0,004$	Positiva Muito baixa	0,957
<i>LDLR_SITIO5_ENSAIO1</i>	$r = 0,166$	Positiva Muito Fbaixa	0,039
<i>LDLR_SITIO6_ENSAIO1</i>	$r = 0,120$	Positiva Muito baixa	0,138
<i>LDLR_SITIO7_ENSAIO1</i>	$r = 0,104$	Positiva Muito baixa	0,197
<i>LDLR_SITIO1_ENSAIO2</i>	$r = -0,074$	Negativa Muito baixa	0,363
<i>LDLR_SITIO2_ENSAIO2</i>	$r = -0,067$	Negativa Muito baixa	0,408
<i>LDLR_SITIO3_ENSAIO3</i>	$r = 0,093$	Positiva Muito baixa	0,249
<i>LDLR_SITIO4_ENSAIO4</i>	$r = -0,039$	Negativa Muito baixa	0,630
<i>PCSK9_SITIO1_ENSAIO1</i>	$r = 0,096$	Positiva Muito baixa	0,234
<i>PCSK9_SITIO2_ENSAIO1</i>	$r = 0,076$	Positiva Muito baixa	0,345
<i>PCSK9_SITIO3_ENSAIO1</i>	$r = 0,059$	Positiva Muito baixa	0,464
<i>PCSK9_SITIO4_ENSAIO1</i>	$r = 0,067$	Positiva Muito baixa	0,408
<i>PCSK9_SITIO5_ENSAIO1</i>	$r = 0,092$	Positiva Muito baixa	0,257
<i>PCSK9_SITIO6_ENSAIO1</i>	$r = 0,149$	Positiva Muito baixa	0,065
<i>PCSK9_SITIO1_ENSAIO2</i>	$r = 0,138$	Positiva Muito baixa	0,187
<i>PCSK9_SITIO2_ENSAIO2</i>	$r = 0,119$	Positiva Muito baixa	0,142
<i>PCSK9_SITIO3_ENSAIO2</i>	$r = 0,033$	Positiva Muito baixa	0,679
<i>PCSK9_SITIO4_ENSAIO2</i>	$r = 0,062$	Positiva Muito baixa	0,446
<i>PCSK9_SITIO5_ENSAIO2</i>	$r = 0,126$	Positiva Muito baixa	0,119
<i>LDLRAP1_SITIO1_ENSAIO1</i>	$r = 0,105$	Positiva Muito baixa	0,193
<i>LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO1</i>	$r = 0,087$	Positiva Muito baixa	0,281
<i>LDLRAP1_SITIO3_ENSAIO1</i>	$r = 0,069$	Positiva Muito baixa	0,396
<i>LDLRAP1_SITIO1_ENSAIO2</i>	$r = -0,014$	Negativa Muito baixa	0,867
<i>LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO2</i>	$r = 0,013$	Positiva Muito baixa	0,875
<i>LDLRAP1_SITIO3_ENSAIO2</i>	$r = 0,025$	Positiva Muito baixa	0,759

Legenda: *LDLR*: Gene do receptor da LDL; *PCSK9*: Gene da proteína convertase subtilisina/kesina tipo 9; *LDLRAP1*: Gene da proteína adaptadora do receptor de lipoproteína de baixa densidade unidade 1; TG: Triacilglicerol

5.8 Resultados do estudo de Metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* no desenvolvimento de DAC

Para a avaliação da influência da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* (Tabela 1) no desenvolvimento de DAC, apenas comparou-se entre os grupos I x II, uma vez que o grupo III não havia nenhum indivíduo com a presença de DAC como já descrito anteriormente (Tabela 3).

Para a realização desta análise, primeiramente foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Após esta primeira análise, realizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney, o qual foi adotado significância de $p < 0,05$. Apenas o ensaio *LDLRAP1_SÍTIO2_ENSAIO2* foi significativo nesta comparação ($p < 0,001$).

Tabela 12. Análise da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* associado ao desenvolvimento de DAC

Ensaio	(valor de p)
LDLR_SÍTIO1_ENSAIO1	0,323
LDLR_SÍTIO2_ENSAIO1	0,820
LDLR_SÍTIO3_ENSAIO1	0,434
LDLR_SÍTIO4_ENSAIO1	0,270
LDLR_SÍTIO5_ENSAIO1	0,217
LDLR_SÍTIO6_ENSAIO1	0,589
LDLR_SÍTIO7_ENSAIO1	0,053
LDLR_SÍTIO1_ENSAIO2	0,064
LDLR_SÍTIO2_ENSAIO2	0,411
LDLR_SÍTIO3_ENSAIO3	0,536
LDLR_SÍTIO4_ENSAIO4	0,318
PCSK9_SÍTIO1_ENSAIO1	0,081
PCSK9_SÍTIO2_ENSAIO1	0,052
PCSK9_SÍTIO3_ENSAIO1	0,136
PCSK9_SÍTIO4_ENSAIO1	0,211
PCSK9_SÍTIO5_ENSAIO1	0,015
PCSK9_SÍTIO6_ENSAIO1	0,055
PCSK9_SÍTIO1_ENSAIO2	0,730
PCSK9_SÍTIO2_ENSAIO2	0,797
PCSK9_SÍTIO3_ENSAIO2	0,581
PCSK9_SÍTIO4_ENSAIO2	0,354
PCSK9_SÍTIO5_ENSAIO2	0,658
LDLRAP1_SÍTIO1_ENSAIO1	0,971
LDLRAP1_SÍTIO2_ENSAIO1	0,251
LDLRAP1_SÍTIO3_ENSAIO1	0,600
LDLRAP1_SÍTIO1_ENSAIO2	0,206
LDLRAP1_SÍTIO2_ENSAIO2	$p < 0,001$
LDLRAP1_SÍTIO3_ENSAIO2	0,284

Legenda: *LDLR*: Gene do receptor da LDL; *PCSK9*: Gene da proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9; *LDLRAP1*: Gene da proteína adaptadora do receptor de lipoproteína de baixa densidade unidade 1

5.9 Resultados do estudo de Metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* no desenvolvimento de IAM

Para a avaliação da influência da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* (Tabela 1) no desenvolvimento de IAM, apenas comparou-se entre os grupos I x II, pois o grupo III não havia nenhum indivíduo com a presença de IAM como já descrito anteriormente (Tabela 3). Para a realização desta análise, primeiramente foi realizado o teste de Kolmogorov- Sminorva. Após esta primeira análise, realizou-se o teste não paramétrico de Mann- Whitney, o qual foi adotado significância de $p < 0,05$. Os sítios CpG do ensaio PCSK9_SÍTIO2_ENSAIO1 ($p = 0,050$), PCSK9_SÍTIO5_ENSAIO1 ($p = 0,008$), PCSK9_SÍTIO6_ENSAIO1 ($p = 0,049$) e o LDLRAP1_SÍTIO2_ENSAIO2 ($p = 0,030$) foram significativas nesta análise (Tabela 13).

Tabela 13. Análise da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* associado ao IAM

Ensaio	(valor de p)
LDLR_SÍTIO1_ENSAIO1	0,352
LDLR_SÍTIO2_ENSAIO1	0,852
LDLR_SÍTIO3_ENSAIO1	0,537
LDLR_SÍTIO4_ENSAIO1	0,355
LDLR_SÍTIO5_ENSAIO1	0,797
LDLR_SÍTIO6_ENSAIO1	0,838
LDLR_SÍTIO7_ENSAIO1	0,622
LDLR_SÍTIO1_ENSAIO2	0,666
LDLR_SÍTIO2_ENSAIO2	0,493
LDLR_SÍTIO3_ENSAIO3	0,884
LDLR_SÍTIO4_ENSAIO4	0,389
PCSK9_SÍTIO1_ENSAIO1	0,123
PCSK9_SÍTIO2_ENSAIO1	0,050
PCSK9_SÍTIO3_ENSAIO1	0,121
PCSK9_SÍTIO4_ENSAIO1	0,079
PCSK9_SÍTIO5_ENSAIO1	0,008
PCSK9_SÍTIO6_ENSAIO1	0,049
PCSK9_SÍTIO1_ENSAIO2	0,796
PCSK9_SÍTIO2_ENSAIO2	0,462
PCSK9_SÍTIO3_ENSAIO2	0,411
PCSK9_SÍTIO4_ENSAIO2	0,877
PCSK9_SÍTIO5_ENSAIO2	0,280
LDLRAP1_SÍTIO1_ENSAIO1	0,503
Continua	

	Continuação
Ensaio	(valor de p)
LDLRAP1_SÍTIO2_ENSAIO1	0,506
LDLRAP1_SÍTIO3_ENSAIO1	0,970
LDLRAP1_SÍTIO1_ENSAIO2	0,515
LDLRAP1_SÍTIO2_ENSAIO2	0,030
LDLRAP1_SÍTIO3_ENSAIO2	0,450

Legenda: *LDLR*: Gene do receptor da LDL; *PCSK9*: Gene da proteína convertase subtilisina/kesina tipo 9; *LDLRAP1*: Gene da proteína adaptadora do receptor de lipoproteína de baixa densidade unidade 1

5.10 Resultados do estudo de Metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* na realização da RM.

Para a avaliação da influência da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* (Tabela 1) na realização da RM, apenas comparou-se entre os grupos I x II, uma vez que o grupo III não havia nenhum indivíduo com a presença de RM como já descrito anteriormente (Tabela 3). Para a realização desta análise, primeiramente foi realizado o teste de Kolmogorov- Smirnov. Após esta primeira análise, realizou-se o teste não paramétrico de Mann- Whitney, o qual foi adotado significância de $p < 0,05$. Apenas o ensaio LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO2 ($p = 0,021$) apresentou diferença estatística significativa (Tabela 14).

Tabela 14. Análise da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* associado à RM

Ensaio	(valor de p)
LDLR_SITIO1_ENSAIO1	0,477
LDLR_SITIO2_ENSAIO1	0,923
LDLR_SITIO3_ENSAIO1	0,892
LDLR_SITIO4_ENSAIO1	0,573
LDLR_SITIO5_ENSAIO1	0,745
LDLR_SITIO6_ENSAIO1	0,792
LDLR_SITIO7_ENSAIO1	0,447
LDLR_SITIO1_ENSAIO2	0,107
LDLR_SITIO2_ENSAIO2	0,764
LDLR_SITIO3_ENSAIO3	0,395
LDLR_SITIO4_ENSAIO4	0,445
PCSK9_SITIO1_ENSAIO1	0,170
PCSK9_SITIO2_ENSAIO1	0,369
	Continua
	Continuação

Ensaio	(valor de p)
PCSK9_SITIO3_ENSAIO1	0,547
PCSK9_SITIO4_ENSAIO1	0,279
PCSK9_SITIO5_ENSAIO1	0,077
PCSK9_SITIO6_ENSAIO1	0,148
PCSK9_SITIO1_ENSAIO2	0,822
PCSK9_SITIO2_ENSAIO2	0,686
PCSK9_SITIO3_ENSAIO2	0,451
PCSK9_SITIO4_ENSAIO2	0,820
PCSK9_SITIO5_ENSAIO2	0,303
LDLRAP1_SITIO1_ENSAIO1	0,641
LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO1	0,468
LDLRAP1_SITIO3_ENSAIO1	0,626
LDLRAP1_SITIO1_ENSAIO2	0,518
LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO2	0,021
LDLRAP1_SITIO3_ENSAIO2	0,325

Legenda: *LDLR*: Gene do receptor da LDL; *PCSK9*: Gene da proteína convertase subtilisina/kesina tipo 9; *LDLRAP1*: Gene da proteína adaptadora do receptor de lipoproteína de baixa densidade unidade 1

5.11 Resultados do estudo de Metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* com a presença de xantomas

Para a avaliação da influência da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* (Tabela 1) com a presença de xantomas, apenas comparou-se entre os grupos I x II, tendo em vista que o grupo III não havia nenhum indivíduo com a com a presença de xantomas já descrito anteriormente (Tabela 3). Para a realização desta análise, primeiramente foi realizado o teste de Kolmogorov-Sminorva. Após esta primeira análise, realizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney, o qual foi adotado significância de $p < 0,05$. Apenas o ensaio *LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO2* ($p = 0,014$) apresentou resultado estatístico significativo nesta análise (Tabela 15).

Tabela 15. Análise da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* associado a presença de xantoma

Ensaio	(valor de p)
LDLR_SITIO1_ENSAIO1	0,208
LDLR_SITIO2_ENSAIO1	0,859
LDLR_SITIO3_ENSAIO1	0,839
LDLR_SITIO4_ENSAIO1	0,528
LDLR_SITIO5_ENSAIO1	0,694
LDLR_SITIO6_ENSAIO1	0,354
LDLR_SITIO7_ENSAIO1	0,403
LDLR_SITIO1_ENSAIO2	0,530
LDLR_SITIO2_ENSAIO2	0,657
LDLR_SITIO3_ENSAIO3	0,156
LDLR_SITIO4_ENSAIO4	0,182
PCSK9_SITIO1_ENSAIO1	0,610
PCSK9_SITIO2_ENSAIO1	0,711
PCSK9_SITIO3_ENSAIO1	0,781
PCSK9_SITIO4_ENSAIO1	0,298
PCSK9_SITIO5_ENSAIO1	0,701
PCSK9_SITIO6_ENSAIO1	0,198
PCSK9_SITIO1_ENSAIO2	0,650
PCSK9_SITIO2_ENSAIO2	0,554
PCSK9_SITIO3_ENSAIO2	0,495
PCSK9_SITIO4_ENSAIO2	0,669
PCSK9_SITIO5_ENSAIO2	0,212
LDLRAP1_SITIO1_ENSAIO1	0,603
LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO1	0,291
LDLRAP1_SITIO3_ENSAIO1	0,324
LDLRAP1_SITIO1_ENSAIO2	0,065
LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO2	0,014
LDLRAP1_SITIO3_ENSAIO2	0,215

Legenda: *LDLR*: Gene do receptor da LDL; *PCSK9*: Gene da proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9; *LDLRAP1*: Gene da proteína adaptadora do receptor de lipoproteína de baixa densidade unidade 1

5.12 Resultados do estudo de Metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* com a presença de xantelasma

Para a avaliação da influência da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* (Tabela 1) com a presença de xantelasma, apenas comparou-se entre os grupos I x II, tendo em vista que o grupo III não havia nenhum indivíduo com a com a presença de xantelasma já descrito anteriormente (Tabela 3). Para a realização desta análise, primeiramente foi realizado o teste de Kolmogorov-

Sminorva. Após esta primeira análise, realizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney, o qual foi adotado significância de $p < 0,05$. Nesta análise os ensaios LDLR_SITIO1_ENSAIO1 ($p=0,047$), LDLR_SITIO4_ENSAIO1 ($p=0,041$), LDLR_SITIO5_ENSAIO1 ($p=0,036$), LDLR_SITIO6_ENSAIO1 ($p=0,039$) e LDLR_SITIO7_ENSAIO1 ($p=0,046$) foram os significativos nesta análise (Tabela 16).

Tabela 16. Análise da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* associado a presença de xantelasma

Ensaio	(valor de p)
LDLR_SITIO1_ENSAIO1	0,047
LDLR_SITIO2_ENSAIO1	0,162
LDLR_SITIO3_ENSAIO1	0,510
LDLR_SITIO4_ENSAIO1	0,041
LDLR_SITIO5_ENSAIO1	0,036
LDLR_SITIO6_ENSAIO1	0,039
LDLR_SITIO7_ENSAIO1	0,046
LDLR_SITIO1_ENSAIO2	0,295
LDLR_SITIO2_ENSAIO2	0,944
LDLR_SITIO3_ENSAIO3	0,675
LDLR_SITIO4_ENSAIO4	0,334
PCSK9_SITIO1_ENSAIO1	0,693
PCSK9_SITIO2_ENSAIO1	0,803
PCSK9_SITIO3_ENSAIO1	0,276
PCSK9_SITIO4_ENSAIO1	0,246
PCSK9_SITIO5_ENSAIO1	0,138
PCSK9_SITIO6_ENSAIO1	0,196
PCSK9_SITIO1_ENSAIO2	0,981
PCSK9_SITIO2_ENSAIO2	0,843
PCSK9_SITIO3_ENSAIO2	0,311
PCSK9_SITIO4_ENSAIO2	0,873
PCSK9_SITIO5_ENSAIO2	0,368
LDLRAP1_SITIO1_ENSAIO1	0,656
LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO1	0,905
LDLRAP1_SITIO3_ENSAIO1	0,732
LDLRAP1_SITIO1_ENSAIO2	0,375
LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO2	0,798
LDLRAP1_SITIO3_ENSAIO2	0,156

Legenda: *LDLR*: Gene do receptor da LDL; *PCSK9*: Gene da proteína convertase subtilisina/kesina tipo 9; *LDLRAP1*: Gene da proteína adaptadora do receptor de lipoproteína de baixa densidade unidade 1

5.13 Resultados do estudo de Metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* a presença de arco córneo

Para a avaliação da influência da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* (Tabela 1) e a presença de arco córneo, apenas comparou-se entre os grupos I x II, tendo em vista que o grupo III não havia nenhum indivíduo com a com a presença de arco córneo já descrito anteriormente (Tabela 3). Para a realização desta análise, primeiramente foi realizado o teste de Kolmogorov-Sminorva. Após esta primeira análise, realizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney, o qual foi adotado significância de $p < 0,05$. Nesta análise os ensaios LDLR_SITIO1_ENSAIO1 ($p=0,020$), LDLR_SITIO2__ENSAIO1 ($p=0,045$), LDLR_SITIO3__ENSAIO1 (0,048), PCSK9_SITIO1_ENSAIO1 (0,039), PCSK9_SITIO4_ENSAIO1 ($p=0,008$), PCSK9_SITIO5_ENSAIO1 ($p=0,023$) e PCSK9_SITIO6_ENSAIO1 ($p=0,001$) foram significativos nesta análise (Tabela 17)

Tabela 17. Análise da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* associado a presença de arco córneo

Ensaaios	(valor de p)
LDLR_SITIO1_ENSAIO1	0,020
LDLR_SITIO2__ENSAIO1	0,045
LDLR_SITIO3__ENSAIO1	0,048
LDLR_SITIO4__ENSAIO1	0,081
LDLR_SITIO5__ENSAIO1	0,097
LDLR_SITIO6__ENSAIO1	0,387
LDLR_SITIO7__ENSAIO1	0,683
LDLR_SITIO1_ENSAIO2	0,744
LDLR_SITIO2_ENSAIO2	0,340
LDLR_SITIO3_ENSAIO3	0,943
LDLR_SITIO4_ENSAIO4	0,648
PCSK9_SITIO1_ENSAIO1	0,039
PCSK9_SITIO2_ENSAIO1	0,330
PCSK9_SITIO3_ENSAIO1	0,229
PCSK9_SITIO4_ENSAIO1	0,008
PCSK9_SITIO5_ENSAIO1	0,023
PCSK9_SITIO6_ENSAIO1	0,001
PCSK9_SITIO1_ENSAIO2	0,258
PCSK9_SITIO2_ENSAIO2	0,330
PCSK9_SITIO3_ENSAIO2	0,520
PCSK9_SITIO4_ENSAIO2	0,528
PCSK9_SITIO5_ENSAIO2	0,494
Continua	

Ensaio	Continuação
	(valor de p)
LDLRAP1_SITIO1_ENSAIO1	0,979
LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO1	0,473
LDLRAP1_SITIO3_ENSAIO1	0,826
LDLRAP1_SITIO1_ENSAIO2	0,379
LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO2	0,334
LDLRAP1_SITIO3_ENSAIO2	0,124

Legenda: *LDLR*: Gene do receptor da LDL; *PCSK9*: Gene da proteína convertase subtilisina/kesina tipo 9; *LDLRAP1*: Gene da proteína adaptadora do receptor de lipoproteína de baixa densidade unidade 1

Como a presença da característica fenotípica de arco córneo está descrita na classificação dos critérios MEDPED em pacientes com até 45 anos, neste fenótipo foi avaliado a idade dos pacientes com esta manifestação e se os achados deste projeto estavam de acordo com os critérios MEDPED. Para esta análise foi avaliada apenas a comparação entre o grupo I e II, tendo em vista que o grupo III não apresenta esta característica (Tabela 3). Para esta análise foi realizado o teste de Kolmogorov-Sminorva, seguido do teste não paramétrico de Manny- Whitney, no qual foi adotado o nível de significância de $p < 0.05$. O resultado desta comparação apresentou diferença estatística significativa $p = 0,011$ (Tabela 18).

Tabela 18. Análise da presença de arco córneo associado com a idade

Dado biodemográfico	Presença de arco córneo nos grupos I e II n=19	Ausência de arco córneo nos grupos I e II n=99	(p valor)
Idade, média (DP)	58,2 ±13,7	46,5 ±19,6	0,011

Legenda: ; Grupo I: Pacientes com diagnóstico molecular confirmado pelo estudo fenotípico e genotípico (N=40); Grupo II: Pacientes fenotipicamente determinados como hipercolesterolemico, mas sem diagnóstico molecular confirmado pelo estudo genômico (N=93)

5.14 Resultados do estudo de Metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* com presença de espessamento de tendão

Para a avaliação da influência da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* (Tabela 1) com a presença de espessamento de tendão, apenas comparou-se os grupos I x II, tendo em vista que o grupo III não havia nenhum indivíduo com a com a presença de espessamento de tendão já descrito anteriormente

(Tabela 3). Para a realização desta análise, primeiramente foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Após esta primeira análise, realizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney, o qual foi adotado significância de $p < 0,05$. Nesta análise nenhum ensaio apresentou diferença estatística significativa (Tabela 19).

Tabela 19. Análise da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* associado a presença de espessamento de tendão

Ensaio	(valor de p)
LDLR_SITIO1_ENSAIO1	0,323
LDLR_SITIO2_ENSAIO1	0,982
LDLR_SITIO3_ENSAIO1	0,842
LDLR_SITIO4_ENSAIO1	0,285
LDLR_SITIO5_ENSAIO1	0,430
LDLR_SITIO6_ENSAIO1	0,436
LDLR_SITIO7_ENSAIO1	0,783
LDLR_SITIO1_ENSAIO2	0,258
LDLR_SITIO2_ENSAIO2	0,260
LDLR_SITIO3_ENSAIO3	0,131
LDLR_SITIO4_ENSAIO4	0,319
PCSK9_SITIO1_ENSAIO1	0,625
PCSK9_SITIO2_ENSAIO1	0,754
PCSK9_SITIO3_ENSAIO1	0,842
PCSK9_SITIO4_ENSAIO1	0,691
PCSK9_SITIO5_ENSAIO1	0,684
PCSK9_SITIO6_ENSAIO1	0,891
PCSK9_SITIO1_ENSAIO2	0,755
PCSK9_SITIO2_ENSAIO2	0,909
PCSK9_SITIO3_ENSAIO2	0,851
PCSK9_SITIO4_ENSAIO2	0,279
PCSK9_SITIO5_ENSAIO2	0,787
LDLRAP1_SITIO1_ENSAIO1	0,965
LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO1	0,396
LDLRAP1_SITIO3_ENSAIO1	0,613
LDLRAP1_SITIO1_ENSAIO2	0,604
LDLRAP1_SITIO2_ENSAIO2	0,941
LDLRAP1_SITIO3_ENSAIO2	0,934

Legenda: *LDLR*: Gene do receptor da LDL; *PCSK9*: Gene da proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9; *LDLRAP1*: Gene da proteína adaptadora do receptor de lipoproteína de baixa densidade unidade 1

DISCUSSÃO

6. Discussão

A HF é umas das desordens monogênicas codominantes de maior frequência nas populações de modo geral (Kamar et al., 2021), entretanto seu diagnóstico ainda é muito falho. À nível de Brasil, menos de 1% da população possui seu diagnóstico molecular confirmado através dos três principais genes relacionados ao fenótipo da doença (Nordestgaard et. al; 2013; Mszar et al., 2021; Vallejo-Vaz et al., 2021). Isso se dá ao elevado custo do sequenciamento genético e dificuldades de acesso à saúde de qualidade da população de baixa e média renda (Who, 2019).

Os dados biodemográficos dos 133 pacientes divididos entre os grupos I (n=40) e II (n=93), estão representados na tabela 2. Alguns dados chamam atenção na análise dos grupos. Do total de pacientes divididos entre os grupos I e II, respectivamente 47,5% e 40,7% possuem DAC; 35,0% e 25,6% já sofreram IAM; e 32,5% e 28,7% tiveram que ser submetidos à RM. O grupo I, apresentou valores CT e LDL-c discretamente superiores ao grupo II, no qual justificaria o agravamento e desenvolvimento de DAC, este valor da concentração plasmática pode estar sendo mascarado devido ao tratamento dos pacientes com estatina, que ocorreu em 38,2% e 61,8%, respectivamente. Outro achado importante é que os valores de TG ($p<0,003$) e VLDL-c ($p<0,011$) foram estatisticamente significativos entre o grupo I e II. Esse resultado pode ser devido ao tratamento de base oferecido na rede pública do Brasil, ou seja, incluir primordialmente estatina na prevenção e controle da hipercolesterolemia (Canaestaro, et al., 2014).

O grupo I apresenta maior porcentagem de ocorrência das características fenotípicas de HF, como arco córneo (31,6%), xantomas (25,6%) e espessamento de tendões (15,0%) em relação ao grupo II, exceto pela presença de xantelasma (22,5%), que possui maior porcentagem de pacientes com esta característica fenotípica no grupo II. Estes achados sugerem uma relação direta entre o aumento das concentrações plasmáticas de LDL-c e a presença destes fenotipos, como relatados em alguns estudos que mostraram o aumento das concentrações plasmáticas de LDL-c contribui para o agravamento clínico no HF e característica fenotípica dos mesmos (Youngblom et. al; 2014, Alonso et al., 2020, Izar et al., 2021).

Os grupos I e II apresentaram 67,5% e 65,6% do gênero feminino, em sua

grande maioria caucasiana, com doença coronariana 47,5% e 40,7%, respectivamente. Este achado vai de encontro com a literatura, na qual relata que as mulheres são a grande maioria acometidas por DAC (Who, 2020), e é uma consequência de HF, devido ao depósito de placas ateroscleróticas nas paredes da artéria coronarianas, levando a uma redução ou/e obstrução da passagem de sangue para o músculo cardíaco, desenvolvendo assim o IAM, necessitando em muitos casos a cirurgia de RM (Youngblom et. al; 2014; Brautbar et al., 2015; Paquette et. al., 2017; Vallejo-Vaz et al., 2018; Myers et al., 2019; Alonso et al., 2020). Este achado vai de encontro com os dados citados anteriormente em relação aos pacientes deste estudo.

Os dados biodemográficos da análise comparativa entre os grupos I (n=40), II (n=93) e III (n=23), demonstram que os parâmetros analisados, apresentaram diferença estatística significativa em relação a idade ($p= 0,002$), tabagismo ($p= 0,004$), etilismo ($p= 0,015$) e as frações do CT ($p<0,001$), HDL-c ($p<0,001$), LDL-c ($p= p<0,001$), VLDL-c ($p<0,001$) e TG ($p<0,001$). Este achado já era esperado, pois os indivíduos inclusos no grupo III, tenderam a mais jovens em relação aos grupos I e II. Além disso, este grupo apresentou valores inferiores no perfil lipídico, que foi o critério de inclusão deste grupo. Este achado foi confirmado pela realização do teste estatístico de Turkey, no qual as variáveis analisadas (CT, HDL-c e LDL-C) apresentaram resultados estatisticamente significativos em todas as comparações entre os grupos I x III e grupo II x III. As variáveis VLDL-c ($p=0,025$) e TG ($p=0,006$), diferentemente das frações lipídicas citadas anteriormente, foram estatisticamente significativa na análise de comparativa entre os grupos I x II. Além disso, estas frações apresentaram diferença estatística na comparação entre os grupos II e III (VLDL-c, $p< 0,001$) e (TG, $p< 0,001$).

Dados da literatura sugerem que em torno de 40% dos pacientes que apresentam as características fenotípicas de HF, quando avaliados genotipicamente, não apresentem alteração gênica, que justifique o fenótipo da doença (Guay et. al., 2016). Este número pode ser maior; estudo publicado por Talmud e colaboradores em 2013, que realizou teste genético em cascata de acordo com as recomendações do Reino Unido para identificação de parentes afetados com HF mostraram que 60% dos pacientes sequenciados no estudo não apresentaram variantes que justificassem o fenótipo da doença. Em outro estudo conduzido por Khera e colaboradores em 2019 nos Estados Unidos, no qual foi realizado sequenciamento em 2.081 pacientes com

IAM precoce, apenas 1,7% dos pacientes apresentaram variantes no gene *LDLR* causadoras de HF. Além disso, este estudo não encontrou nenhuma variante nos outros dois principais genes relacionados ao fenótipo de HF.

No presente estudo, do total de 133 pacientes HF fenotipicamente caracterizados, segundo os critérios MEDPED, 93 pacientes (grupo II) não apresentaram nenhuma variante previamente associada á HF, o que representa 70% do total de pacientes avaliados, este dado se mostrou superior ao relatado na literatura (Guay et. al., 2016). Entretanto, estes pacientes foram submetidos ao sequenciamento de 86 genes relacionados à HF, homeostasia do colesterol e resposta a estatina (Borges et. al., 2020), o que justificaria este número elevado em relação à literatura, pois os estudos citados anteriormente não realizaram sequenciamento de um painel tão amplo de genes (Talmud et al., 2013; Guay et. al., 2016; Khera et al., 2019). Salienta-se que ainda necessita uma avaliação da hipocolesterolemia poligenica, em andamento neste projeto principal.

Sabemos que nem todas as doenças são explicadas pela genética, com isso, os estudos epigéticos, dentre eles a metilação do DNA é uma alternativa para explicar o fenótipo da doença em pacientes que não apresentam nenhuma variante associada a HF. Em um estudo conduzido por Adaikalakoteswari e colaboradores em 2015, no qual foi identificado que a região promotora do gene *LDLR* e *SREBF1* foram hipometilados em condições de deficiência da vitamina B12. Como resultado houve aumento da expressão e biossíntese do colesterol nos pacientes do estudo (Adaikalakoteswari et. al., 2015). Em outro artigo publicado por Infante e colaboradores em 2019, a metilação dos segmentos específicos e a expressão relativa dos genes *LDLR*, *SREBF2* e *ABCA1* envolvidos na homeostase do colesterol, foram analisados através de células mononucleadas do sangue periférico, pela metodologia de qRT-PCR, em pacientes com suspeita de DAC, que foram submetidos á análise do escore de cálcio coronariano (EC). Neste estudo a percentagem de metilação do promotor do gene *LDLR* foi maior no grupo com DAC do que no grupo controle do estudo (Infante et. al., 2019).

Diferentemente do estudo citados anteriormente, no presente estudo foi utilizado DNA extraído de células periféricas do sangue. Este DNA passou pelo tratamento de bissulfito de sódio, posterior PCR e através da utilização da técnica de pirosequenciamento foi possível determinar a percentagem de metilação por sítio

CpG analisado. Foram avaliados os sítios CpG descritos na tabela 1 utilizando ensaios dos genes *LDLR* localizados em região de éxon 1 e intron 1 (Figura 5), *PCSK9* localizado em região promotora e éxon 1 (Figura 6), estes genes são dois dos principais relacionados a HF autossômica codominante. Além disso, neste estudo foi avaliado o ensaio do gene *LDLRAP1* localizado em região promotora e intron 1 (Figura 7), o qual está diretamente relacionado a HF autossômica recessiva.

Os sítios CpG presentes nos ensaios dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* (tabela 1) foram analisados na comparação entre os grupos I, II e III. Primeiramente foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal- Walls para estabelecer quais sítios CpG eram estatisticamente significativos ($p < 0,005$). Do total de 28 sítios CpG analisados dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1*, apenas os ensaios (*LDLR-1* e *LDLR-2*) e (*PCSK9-1* e *PCSK9-2*) tiveram sítios CpG estatisticamente significativo nesta primeira análise ($p < 0,005$) tabela 20. Após esta primeira análise, os sítios CpG que foram estatisticamente significativos foram submetidos ao teste complementar não paramétrico de Turkey para verificar a variância entre os grupos (Tabela 21) .

Como demonstrado nas figuras 10 e 11 houve diferença estatística significativa na análise comparativa da média de percentagem de metilação dos sítios CpG1 e CpG do ensaio 1 do gene *LDLR* na análise comparativa entre os grupos I e III ($p = 0,032$), ($p = 0,043$) e grupo II x III ($p = 0,012$), ($p < 0,001$). Os sítios CpG1 e CpG6 presentes no ensaio do gene *LDLR-1*, ambos localizados na região de éxon 1 demonstraram maior poder estatístico na análise comparativa entre o grupo II x III, este achado se torna interessante, pois o grupo II é constituído de pacientes que não tiveram seu diagnóstico molecular confirmado, sendo assim, podemos sugerir que as alterações na percentagem de metilação pode ser um fator que determina o fenótipo da doença, em comparação com os indivíduos normolipidêmicos, este dado tem que ser validado por ensaios funcionais *in vitro*.

Em um estudo publicado por Choi, 2010 mostra que a região de éxon a qual o ensaio *LDLR-1* pertence obteve um alto grau de metilação. Além disso, ele concluiu que a metilação parece funcionar juntamente com os nucleossomos exômicos e a H3K36me3 para gerar splicing alternativos com diferentes níveis de expressão (Choi, 2010). Os resultados obtidos neste estudo vai de encontro com este achado da

literatura (Figura 10 e 11). Quando comparado a metilação do DNA do ensaio localizado na região de éxon, o valor de p se mostrou com poder estatístico significativo maior, na comparação entre os dois grupos. A região de metilação de intron 1 avaliado teve diferença estatística significativa, apenas na comparação entre o grupo I x III dos sítios CpG2 ($p=0,020$) e CpG4 ($p=0,029$) do ensaio 2 do gene *LDLR* (Figura 12 e 13). Os demais sítios CpG presentes nos ensaios *LDLR-1* e *LDLR-2* não tiveram diferença estatística significativa (Tabela 20) (Figuras 23 a 35).

Lohoffet e colabores em 2018, conduziram um estudo em pacientes com transtorno por uso de álcool (TUA). Este estudo identificou uma região diferencialmente metilada no promotor do gene *PCSK9* no qual foi associada ao fenótipo de TUA. Os achados deste processo de regulação induzida por álcool representa um mecanismo subjacente entre o efeito do álcool sobre o metabolismo dos lípidos e o risco cardiovascular (Lohoffet et al., 2018). Em um estudo preliminar publicado por Plaket e colaboradores em 2020, foram identificadas alterações no perfil de metilação de 190 *loci* CpG relacionados aos lipídios, nos quais foram diferencialmente metilados na hipercolesterolemia quando comparados com os indivíduos controles. O estudo identificou a hipermetilação do *loci* CpG localizado da região promotora dos genes que regulam o metabolismo do colesterol, dentre eles o gene da *PCSK9* (Plaket et al., 2020)

Os sítios CpG do ensaio 1 do gene *PCSK9* demonstrou diferença estatística significativa em 5 dos 6 sítios CpG presentes no ensaio (Figuras 14 a 18). Este ensaio está localizado no éxon 1, diferentemente dos achados do gene *LDLR* (Choi, 2010), este ensaio não apresentou um perfil de metilação mais elevado quando comparado ao ensaio 2. Além disso, o sítio CpG4 apresentou diferença estatística apenas na comparação entre o grupo I x III ($p=0,015$), já os demais sítios CpG1, CpG2, CpG3 e Cp6 apresentaram diferença estatística nas duas comparações de grupo realizada (grupo I x III e grupo II x III). Assim como, no ensaio anterior, 4 dos 5 sítios CpG do ensaio 2 do gene *PCSK9* apresentaram diferença estatística significativa (Figuras 19 a 22). O ensaio 2 do gene *PCSK9* localizado na região promotora do gene, apresenta valores com poder estatístico maior em relação ao ensaio 1. Este achado vai de encontro com os estudos descritos anteriormente (Lohoffet et al., 2018; Plaket et al., 2020), nos quais relatam que a região promotora do gene *PCSK9* possui maior variabilidade de

metilação em relação as demais regiões.

Em um estudo conduzido por Guay e colaboradores em 2020, foram incluídas 69 mulheres grávidas normoglicêmicas, as quais foram acompanhadas durante a gestação. A análise da metilação do DNA proveniente da placenta foi realizada utilizando a técnica de pirossquenciamento. Este estudo demonstrou que a metilação do DNA no gene *LDLRAP1* foi previamente detectada no DNA extraído da placenta e correlacionada com as alterações de CT materno durante a gravidez (Guay et al., 2020). Castellano-Castilho e colaboradores em 2019 demonstraram que a metilação do gene *LDLRAP1* e a concentração de HDL-c em pacientes com síndrome metabólica obtiveram uma correlação positiva (Castellano-Castilho et al., 2019). No estudo conduzido por Plaket e colaboradores, em 2020, foi identificado um *loci* CpG do gene *LDLRAP1* hipermetilado no grupo de pacientes obesos e hipercolesterolêmicos quando comparados com o grupo controle (Plaket et al., 2020).

No presente estudo, a análise comparativa da média de percentagem de metilação por sítio CpG analisados do gene *LDLRAP1* (Tabela 1) ensaio 1 localizado no íntron 1 e ensaio 2 localizado na região promotora, não demonstraram diferença estatística significativa (Figuras 30 a 35) na análise comparativa entre os grupos I x III e grupo II x III. Entretanto o ensaio 2, possui maior percentagem de metilação, quando comparado ao ensaio 1. Este resultado vai de encontro com a literatura, no qual relata hipermetilação na região promotora deste gene (Castellano-Castilho et al., 2019; Guay et al., 2020; Plaket et al., 2020).

Após a realização da primeira etapa das análises estatísticas foi realizado a análise de correlação da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* (Tabela 1) com a idade e o perfil lipídico dos participantes dos grupos I e II. Para esta análise foi utilizado a correlação não paramétrica de Spearman's. Além disso, foi realizado a análise da influência da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* (Tabela 1) e o desenvolvimento de DAC, IAM e RM. Também se avaliou a influência da percentagem de metilação na presença das características fenotípicas de HF: xantomas, xantelasma, espessamento de tendões e arco córneo, neste último fenótipo, foi avaliado a idade dos pacientes que apresentava esta característica fenotípica. Para a realização destas análises, primeiramente, foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. A seguir, realizou-se o teste não

paramétrico de Mann-Whitney, o qual foi adotado significância de $p < 0,05$. Os achados destas análises estão descritos abaixo.

Na análise da influência da percentagem de metilação sobre a presença dos fenótipos de HF. Os sítios CpG1 ($p=0,047$), CpG4 ($p=0,041$), CpG5 ($p=0,036$), CpG6 ($p=0,039$) e CpG7 ($p=0,046$) presentes no ensaio 1 do gene *LDLR* obtiveram diferença estatística significativa com a presença de xantelasma. Além disso, os sítios CpG1 ($p=0,020$), CpG2 ($p=0,045$) e CpG3 ($p=0,04$) obtiveram diferença estatística com a presença de arco córneo. As análises comparativas realizadas anteriormente entre os grupos, os sítios CpG1 (I x III, $p=0,032$); (II x III, $p=0,012$) e CpG6 (I x III, $p=0,043$); (II x III, $p < 0,001$) apresentaram diferença estatística significativa.

As alterações da percentagem de metilação dos sítios CpG citados acima, principalmente as alterações encontradas no sítio CpG1, contribuem para a presença das características fenóticas de HF, este sítio CpG apresentou 2 das 4 características fenóticas consideradas na classificação da pontuação dos critérios MEDPED. Além disso, na análise comparativa entre os grupos, podemos observar que o maior poder estatístico foi encontrado na comparação entre o grupo II (indivíduos sem diagnóstico molecular confirmado) x III (indivíduos normolipidêmicos) ($p=0,012$). Este achado reforça que a presença de alteração na percentagem de metilação neste sítio está contribuindo para o fenótipo de HF.

O ensaio 1 do gene *LDLR* está localizado na região de éxon. Como relatado por Choi, 2010, esta região obteve um alto grau de metilação (Choi, 2010), o que justificaria 5 dos 7 sítios analisados apresentarem diferença estatisticamente significativa com o fenótipo xantelasma, e 3 desses sítios apresentarem diferença estatisticamente significativa com o fenótipo arco córneo.

As alterações na percentagem de metilação dos sítios CpG5 ($p=0,008$) e CpG6 ($p=0,049$) ensaio 1 do gene *PCSK9* obtiveram diferença estatística significativa com o IAM. Além disso, os sítios CpG1 ($p=0,039$), CpG4 ($p=0,008$), CpG5 ($p=0,023$) e CpG6 ($p=0,001$) obtiveram diferença estatística significativa com a presença de arco córneo. Do total de 6 sítios CpG presentes no ensaio 1 do gene *PCSK9*, 4 sítios apresentaram diferença estatisticamente significativa para este fenótipo. As alterações encontradas principalmente nos sítios CpG5 e CpG6, reforçam que as alterações da percentagem de metilação, além de influenciar na presença do fenótipo de HF, influenciam no IAM, no

qual é considerado um fator agravante do desenvolvimento de DAC (Vallejo- Vaz et al., 2018). Além disso, na análise comparativa entre os grupos I x III e grupo II x III, os sítios CpG1 ($p=0,045$; $p=0,010$) e CpG6 ($p=0,001$; $p=0,012$) ($p=0,012$) apresentou diferença estatisticamente significativa.

Este resultado colabora com o descrito anteriormente, no qual as alterações da percentagem de metilação destes sítios, em especial o sítio CpG6 influenciam no fenótipo de HF. Entretanto, o sítio CpG4, apresentou diferença estatística significativa apenas na comparação entre os grupos I x III ($p=0,015$). Este grupo teve seu diagnóstico molecular confirmado, podemos então sugerir que a presença de alguma variante está influenciando esta diferença.

O sítio CpG5 ($p<0,001$, $r=0,411$) do ensaio 2 do gene *PCSK9*, correlacionou-se positivamente moderada com a idade, ou seja, quanto maior a idade dos indivíduos, maior a percentagem de metilação, ou seja, considerado hipermetilado. Este sítio também apresentou diferença estatisticamente significativa na análise comparativa entre grupos I x III ($p<0,001$) e II x III ($p<0,005$), demonstrando assim, que os pacientes com as características fenotípicas de HF (pacientes com diagnóstico molecular confirmado e pacientes sem diagnóstico molecular confirmado) possuem alteração neste sítio em comparação com os indivíduos normolipidêmicos.

Este achado é interessante, pois a média de idade nos grupos I e II, foram de 49,2 ($\pm 20,1$); (48,6 $\pm 18,5$), enquanto que a média da idade no grupo III foi de 35,9 ($\pm 11,0$), ou seja, os grupos I e II são constituído por pacientes mais velhos em relação ao grupo III. Contudo, este sítio CpG está localizado na região promotora do ensaio 2 do gene *PCSK9* (Figura 6). Este achado de hipermetilação, vai de encontro com o estudo preliminar publicado por Plaket e colaboradores no qual identificou a hipermetilação do *loci* CpG localizado na região promotora dos genes que regulam o metabolismo do colesterol, dentre eles o gene da *PCSK9* (Plaket et al., 2020). Além disso, alteração na metilação em região promotora pode resultar no silenciamento do gene, pois inibe a ligação dos complexos de transcrição à suas regiões reguladoras (USHIJIMA; ASADA, 2010; DEATON; BIRD, 2011; Kato et al., 2019).

A análise da influência da percentagem de metilação do sítio CpG2 do ensaio 2 do gene *LDLRAP1* apresentou diferença estatística significativa no desenvolvimento de DAC ($p < 0,001$), IAM ($p=0,030$) e RM ($p=0,021$). Este mesmo sítio CpG apresentou

diferença estatística significativa com a presença de xantoma ($p=0,014$). Este achado é muito interessante, pois a alteração neste sítio CpG está levando ao desenvolvimento de DAC e suas complicações, além de influenciar em umas das características fenóticas de HF.

Este sítio CpG está localizado na região promotora do gene *LDLRAP1*, como descrito anteriormente, alterações na região promotora pode resultar no silenciamento do gene, pois inibe a ligação dos complexos de transcrição à suas regiões reguladoras (USHIJIMA; ASADA, 2010; DEATON; BIRD, 2011; Kato et al., 2019).

A presença do fenótipo arco córneo foi comparada com a idade dos pacientes nos grupos I e II. O resultado encontrado foi significativo nesta comparação ($p=0,011$), contudo, um dado chama a atenção. Segundo os critérios MEDPED, este fenótipo é considerado como fator somente para a caracterização dos pacientes com suspeita de HF em indivíduos com até 45 anos, porém, a média de idade encontrado neste trabalho foi de $58,2 \pm 13,7$ (grupo com a presença de arco córneo) e $46,5 \pm 19,6$ (grupo com a ausência de arco córneo). Este achado, pode ser explicado devido ao baixo diagnóstico de HF no Brasil, no qual representa menos de 1% da população (Nordestgaard et. al; 2013). Além disso, o acesso à saúde de qualidade em países de baixa e média renda como o Brasil ainda é muito precário, os pacientes demoram muito tempo na busca do primeiro atendimento médico especializado.

LIMITAÇÕES

7. Limitações

Durante o período de 19/06/2019 á 15/12/2019 estive de licença maternidade, tendo que interromper os experimentos do laboratório. Após o retorno em pouco tempo houve total restrição a entrada no laboratório devido a pandemia, portanto fiquei impedida de prosseguir com o projeto até meados de Agosto de 2020, quando obtive autorização para voltar a realizar os experimentos. Isto não permitiu um estudo amostral maior que foram obtidos pelo projeto principal do grupo.

CONCLUSÕES

8. Conclusões

A diferença no perfil de metilação dos pacientes caracterizados fenotipicamente e genotipicamente como HF é caracterizada apenas nos sítios CpG presentes nos genes *LDLR* e *PCSK9* em comparação aos indivíduos normolipidêmicos.

As alterações no perfil de metilação dos sítios CpG apenas nos genes *PCSK9* e *LDLRAP1* nos pacientes caracterizados fenotipicamente e genotipicamente como HF presentes contribuem para a presença das manifestações clínicas de DAC, IAM e RM.

As alterações no perfil de metilação dos sítios CpG presentes nos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* pode contribuir no diagnóstico epigenético dos fenótipos de HF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. Referências Bibliográficas

Abifadel M, Varret M, Rabés J-P. **Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia.** Nature Genetics, v.34, n.2, 2003.

Al-Allaf AF, Coutelle C, Waddington SN et al. **LDLR-Gene therapy for familial hypercholesterolaemia: problems, progress, and perspectives.** International Archives of medicine. 3:36, 2010.

Alonso R, Peres de Isla, Muñiz- Grijalvo et al. **Barriers to Early Diagnosis and Treatment of Familial Hypercholesterolemia: Current Perspectives on Improving Patient Care.** Vascular Health and Risk Management, 2020

Azevedo JM, Franco MM. **S-adenosil-L-homocisteína como substância desmetilante de DNA no cultivo de células doadoras de núcleo.** Rev.Bras.Reprod.Anim,Belo Horizonte, v.43, n3, p. 260-265, 2013.

Adaikalakoteswari A, Finer S, Voyias et al. **Vitamin B12 insufficiency induces cholesterol biosynthesis by limiting s-adenosylmethionine and modulating the methylation of SREBF1 and LDLR genes.** Clinical Epigenetics, 7:14, 2015.

Bayona A, Arrieta F, Rodríguez- Jiménez et al. **Loss-of-function mutation of PCSK9 as a protective factor in the clinical expression of familial hypercholesterolemia.** Medicine, 99:34, 2020.

Bjune K, Wierod L, Naderi S. **Triciribine increases LDLR expression and LDL uptake through stabilization of LDLR mRNA.** SCieNtific REPOrTS, 8:16174, 2018.

Brautbar A, Leary E, Rasmussen K, et al. **Genetics of Familial Hypercholesterolemia.** Current atherosclerosis reports, abr. 2015. v. 17, n. 4, p. 20.

Borges JB. **Ultrassequenciamento exômico dos principais genes relacionados com a hipercolesterolemia familiar.** 2018. 194f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Borges, J.B.; J.B. OLIVEIRA, V. F. FERREIRA, G. M. LOS, B. BARBOSA, T. K. A. A. MARCAL, E. S. R. DAGLI-HERNANDEZ, C. FREITAS, R. C. C. BORTOLIN, R. H. MORI, A. A. HIRATA, T. D. C. NAKAYA, H. T. I. BASTOS, G. M. THUROW, H. S. GONCALVES, R. M. ARAUJO, D. B. ZATZ, H. P. BERTOLAMI, A. FALUDI, A. A. BERTOLAMI, M. C. SOUSA, A. G. M. R. FRANCA, J. I. D. JANNES, C. E. PEREIRA, A. C. NAKAZONE, M. A. , et al. ; **Genomics, epigenomics and pharmacogenomics of Familial Hypercholesterolemia (FHBGEP): A study protocol.** Research in Social & Administrative Pharmacy, v. S1551, p. 31138-31147, 2020.

Castro LR. **Análise exômica em pacientes portadores de cardiomiopatia hipetrófica.** 2015. 143f. Tese (Doutorado em Medicina, Tecnologia e Intervenção Cardiologia)- Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, São Paulo, 2015.

Chemello K, Garcia- Nafria J, Gallo A et al. **Lipoprotein metabolism in familial hypercholesterolemia.** J. Lipid Res., 62, 2021.

CIVEIRA, F. **International Panel on Management of Familial Hypercholesterolemia. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia.** (2004) *Atherosclerosis*. 173(1):55-68.

Choi JK. **Contrasting chromatin organization of CpG islands and exons in the human genome.** *Genome Biology*, R:70,11, 2010.

DEATON, A. M.; BIRD, A.; **CpG islands and the regulation of transcription.** *Genes and Development*, v. 25, p. 1010–1022, 2011.

Dron JS, Wang J, McIntyre AD et al. **Six years' experience with LipidSeq: clinical and research learnings from a hybrid, targeted sequencing panel for dyslipidemias.** *BMC Medical Genomics* 13:23, 2020.

Elia L, Condorelli G. **The involvement of epigenetics in vascular disease development.** *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 107 (2019) 27-31.

Farnier M, Civeira F, Descamps et al. **How to implement clinical guidelines to optimise familial hypercholesterolaemia diagnosis and treatment.** *Atherosclerosis Supplements* 26, p. 25-35, 2017.

France M. **Homozygous familial hypercholesterolaemia update on management.** *Paediatrics and International Child Health*, 36:4, 243-247, 2016.

Freitas AIC. **Caracterização Bioquímica e Molecular da Hipercolesterolemia Familiar na Região Norte e Centro de Portugal.** 2010.

Feinberg AP. **Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease.** *Nature*, v 447, n 7143, p. 433-40, 2007.

Fredrickson, DS (1971). **Mutants, hyperlipoproteinaemia and coronary artery disease.** *British Medical Journal*, 2, 187.

FOULKES, J. M.; PARNELL, K. M.; NIX, R. N.; CHAU, S.; SWIERCZEK, K.; SAUNDERS, M.; WRIGHT, K.; HENDRICKSON, T. F.; HO, K. K.; MCCULLAR, M. V.; KANNER, S. B.; **Epigenetic drug discovery: targeting DNA methyltransferases.** *Journal of Biomolecular Screening*, v. 17, n. 1, p. 2-17, 2012.

García-U, Benito-Vicente A, Uribe KB. **Mutation type classification and pathogenicity assignment of sixteen missense variants located in the EGF-precursor homology domain of the *LDLR*.** *Scientific Reports*, 10:1727, 2020.

Guay SP, Brisson D, Munger J, et al. **ABCA1 gene promoter DNA methylation is associated with HDL particle profile and coronary artery disease in familial hypercholesterolemia.** *Epigenetics* 2012;7(5):464-72.

Guay SP, Brisson D, Lamarche B et al. **Epipolymorphisms within lipoprotein genes contribute independently to plasma lipid levels in familial hypercholesterolemia.** *Epigenetics* 9:5, 718–729; 2014

Guay SP, Légaré C, Brisson D. **Epigenetic and genetic variants at the *TNNT1* gene locus are associated with HDL-C levels and coronary artery disease.** *Future medicine Ltd*, 2016.

Guay SP, Houde A-A, Breton E. **DNA methylation at *LRP1* gene locus mediates the association between maternal total cholesterol changes in pregnancy and cord blood leptin levels.** J Dev Orig Health Dis. 11(4):369-378, 2020.

Ghafarian F, Pashirzad M, Khazaei M et al. **The clinical impact of exosomes in cardiovascular disorders: From basic science to clinical application.** Journal of Cellular Physiology; 1-11,2018.

Girelli D, Piubelli C, Martinelli N et al. **A decade of progression the genetic basis of coronary artery disease. Practical insights for the internist.** Europe Journal of Internal MedicineXXX,2016.

Han M, Li J, Cao Y et al. **A role for LSH in facilitating DNA methylation by DNMT1 through enhancing UHRF1 chromatin association.** Nucleic Acids Research, v.48, n°21,p.12116-12134, 2020.

Harrington, C. T., Lin, E. I., Olson, M. T., & Eshleman, J. R. (2013). **Fundamentals of pyrosequencing.** *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 137(9), 1296–1303. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0463-RA>.

Harst P V, Windt L J, Chambers J C. **Translational Perspective on Epigenetics in Cardiovascular Disease.** J Am Coll Cardiol. 01; 70(5): 590–606, 2017

HENDERSON, R.; O'KANE, M.; MCGILLIGAN, V.; WATTERSON, S. **The genetics and screening of familial hypercholesterolemia.** (2016) Journal of Biomedical Science.

Hayatsu H. **The bisulfite genomic sequencing used in the analysis of epigenetic states, a technique in the emerging environmental genotoxicology research.** Mutat Res., v.659, p.77-82,2008.

Güntekin Ü, Gümrükçüoğlu HA, Mehmet Y et al. **Compliance with dyslipidemia guidelines in Daily practice: How effective is cardiovascular risk prevention?.** Clinical Therapeutics. v.40, n. 12, 2018.

Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. **Molecular biology of *PCSK9*: its role in LDL metabolism.** Trends Biochem Sci 2007;32:71-7.

Infante T, Forte E, Schiano C et al. **Evidence of association of circulating epigenetic-sensitive biomarkers with suspected coronary heart disease evaluated by Cardiac Computed Tomography.** Plos, one, January, 23,2019.

Izar MCO, Lottenberg AM, Rocha VZ et al. **Position Statement on Fat Consumption and Cardiovascular Health.** 2021.

Jeltsch A, Jurkowska RZ. **New concepts in DNA methylation.** Cell Press, v.39, n.7, 2014.

Jiang Y-Z, Jiménez JM, Ou K et al. Jiang Y-Z, Jiménez JM, Ou K et al. **Hemodynamic disturbance induces differential DNA Methylation of endothelial kruppel-like factor 4 (KLF4) promoter in vitro and in vivo.** Circ Res. 2014; 115(1):32-43. . Circ Res. 2014; 115(1):32-43.

Jillinger PS, Handelsman Y, Rosenblit PD. **American association of clinical endocrinologists and American college of endocrinology guidelines for management of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease.** Endocr Pract, 23 (Suppl 2), 2017

Kamar A, Khalil A, Nemer G. **The digenic causality in familial hypercholesterolemia: Revising the Genotype- Phenotype Correlations of the**

Disease. Frontiers in Genetic, v.11, 2021.

Kato M, Natarajan R. Epigenetics and epigenomics in diabetic kidney disease and metabolic memory. *Nat Rev Nephrol*; 15(6):327-345, 2019.

Khera AV, Chaffin M, Zekvat et al. **Whole genome sequencing to characterize monogenic and polygenic contributions in patients hospitalized with early-onset myocardial infarction.** *Circulation*, 139(13): 1593-1602, 2019.

Langmann T, Porsch- Özcürümez M, Heimerl S et al. **Identification of Sterol-independent Regulatory Elements in the Human ATP-binding Cassette Transporter A1 Promoter.** *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. Vol. 277, No. 17, Issue of April 26, pp. 14443–14450, 2002

Lambert G., Charlton F., Rye K-A., Piper DE. **Molecular basis of PCSK9 function.** *Atherosclerosis*, 2009; 203:1-7.

Lázaro P, Isla LP, Watts GF et al. **Cost-effective of a cascade screening program for the early detection of familial hypercholesterolemia.** *Jornal of Clinical Lipidology*. 11, 260-271, 2017.

Li S, Zhao X, Zhang Y et al. **Novel circulating lipid measurements for current dyslipidemias in non-treated patients undergoing coronary angiography: PCSK9, apoC3 and sdLDL-C.** *Oncotarget*, Vol. 8, (No. 7), pp: 12333-12341, 2017.

Lindgren V, Luskey KL, Russell DW, Francke U. **Human genes involved in cholesterol metabolism: chromosomal mapping of the loci for the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase with cDNA probes.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82(24):8567-8571.

Lohoff FW, Sorcher JL, Rosen AD et al. **Methylomic profiling and replication implicates deregulation of PCSK9 in alcohol use disorder.** *Mol Psychiatry*. September ; 23(9), 2018.

López V, Fernández AF, Fraga MF. **The role of 5-hydroxymethylcytosine in development, aging and age-related diseases.** *Ageing Research Reviews*(763),2017.

Mesh. Dyslipidemia. Disponível : em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=Dyslipidemia>. Acesso em 04 de janeiro de 2022.

Mszar R, Santos RD, Nasir K. Addressing Gaps in Racial/Ethnic Representation in Familial Hypercholesterolemia Registries. *Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes*. V.14, n.2, 2021.

Mytilinaïou M, Kyrou I, Khan M et al. **Familial Hypercholesterolemia: New Horizons for Diagnosis and Effective Management.** *Frontiers in Pharmacology*, v. 9, 2018.

Mollaki V, Progiar P, Drogari E. **Novel LDLR variants in patients with familial hypercholesterolemia: in silico analysis as a tool to predict pathogenic variants in children and their families.** *Ann Hum Genet*. 2013; 77(5):426-34.

Mousavi SA, Berge KE, Leren TP. **The unique role of protein convertase subtilisin/kexin9 in cholesterol homeostasis.** *J, Inten. Med* 2009; 266(6):507-519. MullerPY,

Muller PY, Miserez AR. **Identification of mutations in the gene encoding sterol regulatory element binding protein (SREBP)-2 in hypercholesterolaemic subjects.** J ed Genet 2002; 39:271–275. Muller HR, Prado KB. Epigenética: um novo campo da genética. RUBS 2008;1(3):61-9.

Myers K D, Knowles J W, Staszak D, Shapiro M D et al. **Precision screening for familial hypercholesterolaemia: a machine learning study applied to electronic health encounter data.** Lancet Digit Health. 2019 December ; 1(8): e393–e402. doi:10.1016/S2589-7500(19)30150-5.

Nikasa P, Rabbani B, Hejazi MS et al. **A case of autosomal recessive hypercholesterolemia with a novel mutation in the *LDLRAP1* gene.** Clinical Pediatric Endocrinology, v.30, n.04, pp: 201-204,201.

Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE et al. **Familial hypercholesterolemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease.** EuropeHeartJournal, v.34, p.3478-3490, 2013.

Paquette M, Chong M ,Thériault S et al. **Polygenic Risk Score Predicts Prevalence of Cardiovascular Disease in Patients with Familial Hypercholesterolemia.** Journal of Clinical Lipidology, v 1100, p. 1933-2874, 2017.

Pourmasouni M, Hadi A, Rafie N. **The effect of ginger supplementation on lipid profile: A systematic review and meta-analysis of clinical trials.** Phytomedicine . 2018 Apr 1;43:28-3

Platek T, Polus AP, Górska J et al. **DNA methylation microarrays identify epigenetically regulated lipid related genes in obese patients with hypercholesterolemia.** Molecular Medicine, 26:93, 2020.

Pedro-Botet J, Climent E, Benaiges D. **Familial Hypercholesterolemia: Do HDL Play a Role?.** Biomedicine, 9, 810, 2021.

Qureshi I A, Mehler M F. **Epigenetic mechanisms underlying nervous system diseases.** Handb Clin Neurol. V.147:43-58, 2018.

Rasool M, Malik A, Naseer MI, et. al., **The role of epigenetics in personalized medicine: challenges and opportunities.** BMC Med Genomics, 2015;8 Suppl1:S5.

Rodríguez-Jiménez C, Gómez-Coronado D, Vargas et al. **A new variant (c.1A>G) in *LDLRAP1* causing autosomal recessive hypercholesterolemia: Characterization of the defect and response to PCSK9 inhibition.** Atherosclerosis, v.284, p.223–229, 2019.

Santos R.D., Gagliardi A.C.M., Xavier H.T., et al. **Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF).** Arq Bras Cardiol 2012;99(2Supl. 2):1-28

Sharma K, Baliga RR. **Genetics of Dyslipidemia and Ischemic Heart Disease.** Curr Cardiol Rep, 2017.

Sposito, AC et al. **IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia.** Arq. Bras. Cardiol. 2007; 88 : 1, pp. 2-19. ISSN 0066-782X.

Strom TB, Laerdahl JK, Leren TP. **Mutations affecting the transmembrane domain of the LDL receptor: impact of charged residues on the membrane insertion.** Human Molecular Genetics, 2017.

Sundararaman SS, Doring Y, Van der Vost EPC. **PCSK9: A Multi-Faceted Protein That Is Involved in Cardiovascular Biology.** Biomedicines, 9, 793, 2021.

Szyf M. **The Dynamic Epigenome and its Implication in Toxicology.** Toxicology Science, v 100, n 1, p. 7-23, 2007.

Tada H, Takamura M, Kawashiri M-A. **Familial Hypercholesterolemia: A Narrative Review on Diagnosis and Management Strategies.** Vascular Health and Risk Management, 2021.

Talmud P, Shah S, Whittall R et al. **Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: a case-control study.** Lancet, v.381:1293-301, 2013.

USHIJIMA, T.; ASADA, K.; Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. **Cancer Science**, v. 101, n. 2, p. 300-305, 2010.

Vallejo-Vaz AJ, Kondapally-Seshasai SR, Cole D, et al. **Familial hypercholesterolaemia: A global call to arms.** Atherosclerosis, 243(1):257-9, 2015.

Vallejo- Vaz AJ, Ray KK. Epidemiology of familial hypercholesterolaemia: Community and clinical. Atherosclerosis, v. 277, p. 289-297, 2018.

Vallejo- Vaz AJ, Packrad CJ, Ference B et al. **LDL-cholesterol lowering and clinical outcomes in hypercholesterolemic subjects with and without a familial hypercholesterolemia phenotype: Analysis from the secondary prevention 4S trial.** Atherosclerosis, v. 320 , p.1-9, 2021.

WIJERS,M.; KUIVENHOVEN, J.A.; SLUIS, B.V. **The life cycle of the low-density lipoprotein receptor: insights from cellular and in-vivo studies.** Curr Opin Lipidol, 2015.v. 26, n. 2, p. 82-87.

WHO. **World Health Statistic**, Monitoring Health for the Sustainable Development Goals, 2020.

WHO. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)-](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) , 2019. Acessado em novembro de 2021.

Wong ND. **Epidemiology and prevention of cardiovascular disease.** Oxford University Press, 2015.

Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, et al.. **V Diretriz Brasileira de Dislipidemia e prevenção de aterosclerose.** Sociedade Brasileira de Cardiologia, Arq Bras Cardiol 2013.

Xu Y, Doonan S R, Ordog T et al. **Translational Opportunities for Microfluidic Technologies to Enable Precision Epigenomics.** Anal Chem, 16;92(12):7389-7997, 2020.

Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, et al. **The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA.** Cell. 1984, 39(1):27-38.

Youngblom E, Pariani M, Knowles JW. **Familial Hypercholesterolemia. Synonyms: Hypercholesterolemia, Autosomal Dominant; Hypercholesterolemia Type IIA, Familial Hypercholesterolemia.** Gene Reviews, 2014.

Zhang X, Hu M, Lyu X et al. **DNA Methylation Regulated Gene Expression in Organ Fibrosis.** Molecular Basis of Disease. 2017.

ANEXOS

10. Anexos

Apêndice 1

Tabela 20. Análise da média e desvio padrão da percentagem de metilação dos sítios CpG dos genes *LDLR*, *PCSK9* e *LDLRAP1* na comparação entre os grupos I, II e III

Ensaio	Grupo	Média	Desvio Padrão ($\pm$)	(p valor)
LDLR_SÍTIO1_ENSAIO1	I	2,62	3,06	0,018
	II	2,56	3,09	
	III	1,69	1,96	
LDLR_SÍTIO2_ENSAIO1	I	2,87	2,65	0,113
	II	3,23	4,49	
	III	2,52	3,46	
LDLR_SÍTIO3_ENSAIO1	I	3,30	3,78	0,258
	II	2,48	3,04	
	III	1,91	1,72	
LDLR_SÍTIO4_ENSAIO1	I	5,67	3,92	0,880
	II	7,17	10,9	
	III	6,17	7,67	
LDLR_SÍTIO5_ENSAIO1	I	2,42	2,63	0,100
	II	2,64	2,90	
	III	1,91	1,92	
LDLR_SÍTIO6_ENSAIO1	I	1,90	2,47	0,008
	II	2,13	2,70	
	III	1,39	1,92	
				Continua

				Continuação
Ensaio	Grupo	Média	Desvio Padrão (±)	(p valor)
LDLR_SÍTIO7__ENSAIO1	I	2,15	3,49	0,163
	II	2,34	2,96	
	III	1,82	1,66	
LDLR_SÍTIO1_ENSAIO2	I	2,80	1,53	0,891
	II	3,49	5,28	
	III	4,60	7,83	
LDLR_SÍTIO2_ENSAIO2	I	2,80	1,50	0,038
	II	3,33	4,10	
	III	3,17	5,26	
LDLR_SÍTIO3_ENSAIO3	I	1,62	1,14	0,393
	II	1,97	2,26	
	III	2,34	3,83	
LDLR_SÍTIO4_ENSAIO4	I	2,42	1,86	0,039
	II	2,21	2,73	
	III	1,86	2,94	
PCSK9_SÍTIO1_ENSAIO1	I	4,37	1,67	0,014
	II	4,46	2,06	
	III	3,47	1,12	
PCSK9_SÍTIO2_ENSAIO1	I	4,37	1,86	0,023
	II	4,20	2,24	
	III	3,34	1,07	
				Continua

				Continuação
Ensaio	Grupo	Média	Desvio Padrão (±)	(p valor)
PCSK9_SÍTIO3_ENSAIO1	I	6,02	2,05	0,003
	II	5,53	2,42	
	III	4,52	1,16	
PCSK9_SÍTIO4_ENSAIO1	I	8,37	1,84	0,019
	II	8,55	5,69	
	III	7,17	1,55	
PCSK9_SÍTIO5_ENSAIO1	I	6,62	1,94	0,158
	II	6,81	4,14	
	III	5,95	1,39	
PCSK9_SÍTIO6_ENSAIO1	I	6,57	2,17	0,004
	II	6,79	5,08	
	III	4,91	1,70	
PCSK9_SÍTIO1_ENSAIO2	I	10,0	2,31	0,001
	II	9,43	2,53	
	III	7,91	1,97	
PCSK9_SÍTIO2_ENSAIO2	I	10,7	2,47	0,008
	II	10,9	5,34	
	III	8,78	1,90	
PCSK9_SÍTIO3_ENSAIO2	I	11,6	3,37	0,028
	II	11,9	6,58	
	III	9,39	2,08	
				Continua

				Continuação
Ensaio	Grupo	Média	Desvio Padrão (±)	(p valor)
PCSK9_SÍTIO4_ENSAIO2	I	33,0	4,57	0,797
	II	33,1	6,75	
	III	31,4	6,51	
PCSK9_SÍTIO5_ENSAIO2	I	18,6	4,04	0,000
	II	17,2	3,91	
	III	13,4	2,99	
LDLRAP1_SÍTIO1_ENSAIO1	I	13,0	2,15	0,361
	II	13,5	2,16	
	III	13,2	1,45	
LDLRAP1_SÍTIO2_ENSAIO1	I	3,97	1,54	0,300
	II	4,54	2,57	
	III	4,13	1,81	
LDLRAP1_SÍTIO3_ENSAIO1	I	3,82	1,31	0,616
	II	3,94	1,56	
	III	3,56	0,72	
LDLRAP1_SÍTIO1_ENSAIO2	I	6,20	1,58	0,867
	II	6,47	2,04	
	III	6,17	0,83	
LDLRAP1_SÍTIO2_ENSAIO2	I	12,7	3,68	0,652
	II	13,1	4,67	
	III	12,0	1,77	
LDLRAP1_SÍTIO3_ENSAIO2	I	45,2	8,53	0,422
	II	47,8	7,89	
	III	46,8	3,24	

LDLR: Gene do receptor da LDL; PCSK9: Gene da proteína convertase subtilisina/kesina tipo 9; LDLRAP1: Gene da proteína adaptadora do receptor de lipoproteína de baixa densidade unidade 1; Grupo I: Pacientes com diagnóstico molecular confirmado pelo estudo fenotípico e genotípico (N=40); Grupo II: Pacientes fenotipicamente determinados como hipercolesterolemico, mas sem diagnóstico molecular confirmado pelo estudo genômico (N=93); Grupo III: com 23 indivíduos fenotipicamente determinados normolipidêmicos de acordo com a V Diretriz Brasileira de Dislipidemia.

Tabela 21. Análise comparativa dos sítios CpG estatísticas significativo utilizando o teste de Turkey na comparação entre os grupos I, II e III

Váriavel	Comparação	(p valor)
LDLR_Sítio1_Ensaio1	Grupo I x Grupo II	0,972
	Grupo I x Grupo III	0,032
	Grupo II x Grupo III	0,012
LDLR_Sítio6_Ensaio1	Grupo I x Grupo II	0,610
	Grupo I x Grupo III	0,043
	Grupo II x Grupo III	p<0,001
LDLR_Sítio2_Ensaio2	Grupo I x Grupo II	0,945
	Grupo I x Grupo III	0,020
	Grupo II x Grupo III	0,072
LDLR_Sítio4_Ensaio2	Grupo I x Grupo II	0,229
	Grupo I x Grupo III	0,029
	Grupo II x Grupo III	0,305
PCSK9_Sítio1_Ensaio1	Grupo I x Grupo II	1,000
	Grupo I x Grupo III	0,045
	Grupo II x Grupo III	0,010
PCSK9_Sítio2_Ensaio1	Grupo I x Grupo II	0,653
	Grupo I x Grupo III	0,006
	Grupo II x Grupo III	0,033
PCSK9_Sítio3_Ensaio1	Grupo I x Grupo II	0,122
	Grupo I x Grupo III	p<0,001
	Grupo II x Grupo III	0,038
PCSK9_Sítio4_Ensaio1	Grupo I x Grupo II	0,178
	Grupo I x Grupo III	0,015
	Grupo II x Grupo III	0,180
PCSK9_Sítio6_Ensaio1	Grupo I x Grupo II	0,458
	Grupo I x Grupo III	0,001
	Grupo II x Grupo III	0,012
PCSK9_Sítio1_Ensaio2	Grupo I x Grupo II	0,294
	Grupo I x Grupo III	p<0,001
	Grupo II x Grupo III	0,005
PCSK9_Sítio2_Ensaio2	Grupo I x Grupo II	0,764
	Grupo I x Grupo III	0,001
	Grupo II x Grupo III	0,001
PCSK9_Sítio3_Ensaio2	Grupo I x Grupo II	0,781
	Grupo I x Grupo III	0,003
	Grupo II x Grupo III	0,022
PCSK9_Sítio5_Ensaio2	Grupo I x Grupo II	0,245
	Grupo I x Grupo III	p<0,001
	Grupo II x Grupo III	p<0,001

LDLR: Gene do receptor da LDL; PCSK9: Gene da proteína convertase subtilisina/kesina tipo 9; Grupo I: Pacientes com diagnóstico molecular confirmado pelo estudo fenotípico e genotípico (N=40); Grupo II: Pacientes fenotipicamente determinados como hipercolesterolemico, mas sem diagnóstico molecular confirmado pelo estudo genômico (N=93); Grupo III: com 23 indivíduos fenotipicamente determinados normolipidêmicos de acordo com a V Diretriz Brasileira de Dislipidemia.

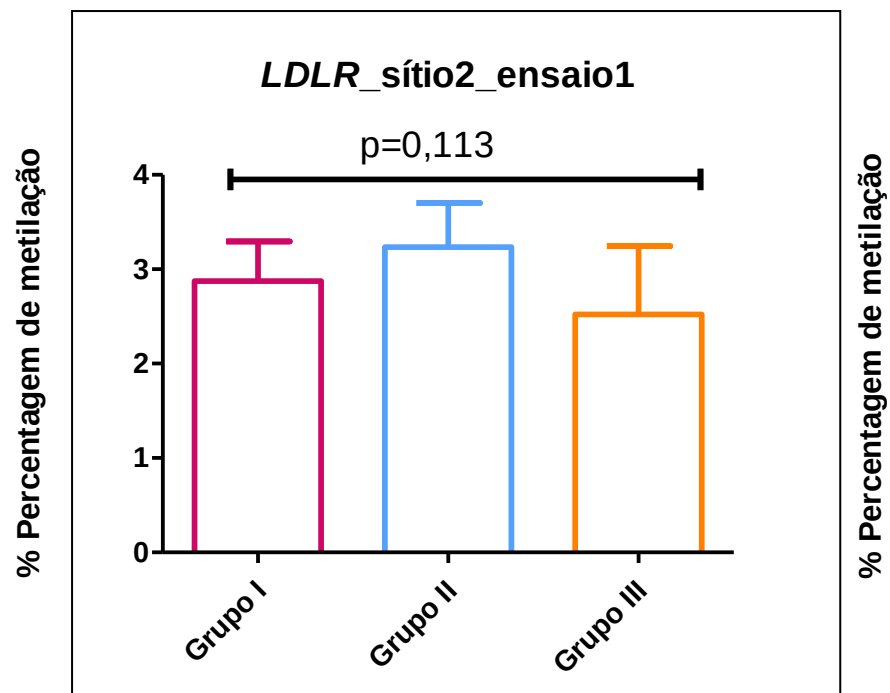


Figura 23: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *LDLR-1* sítio CpG 2

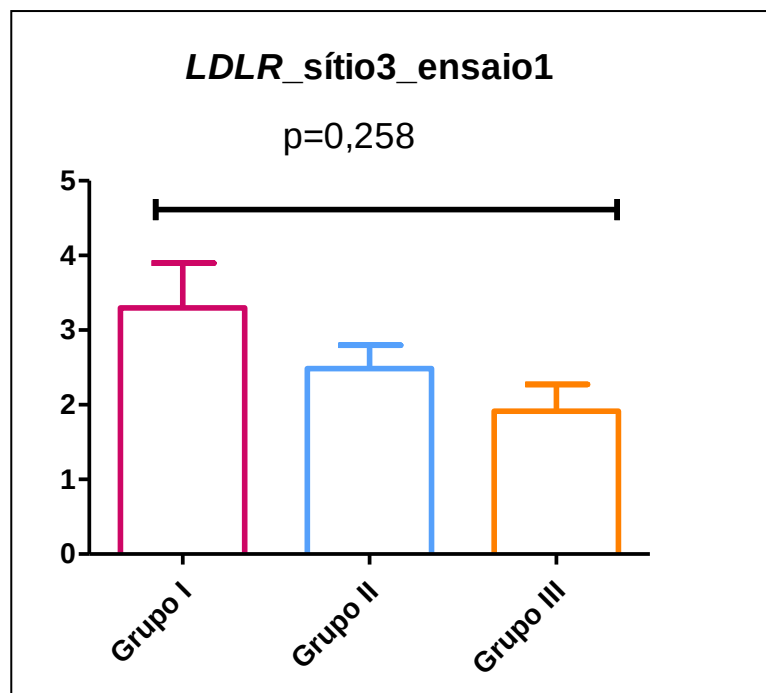


Figura 24: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *LDLR-1* sítio CpG 3

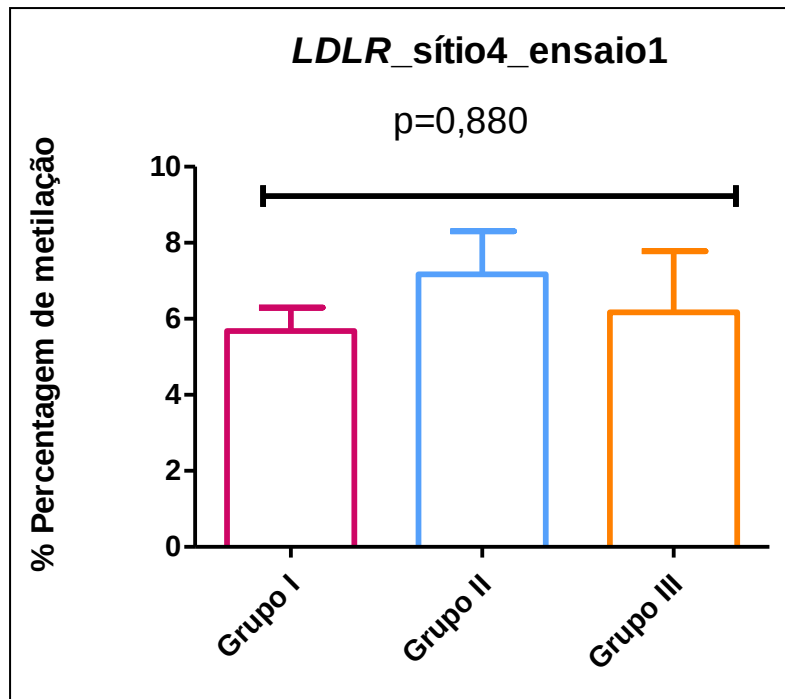


Figura 25: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *LDLR-1* sítio CpG 4

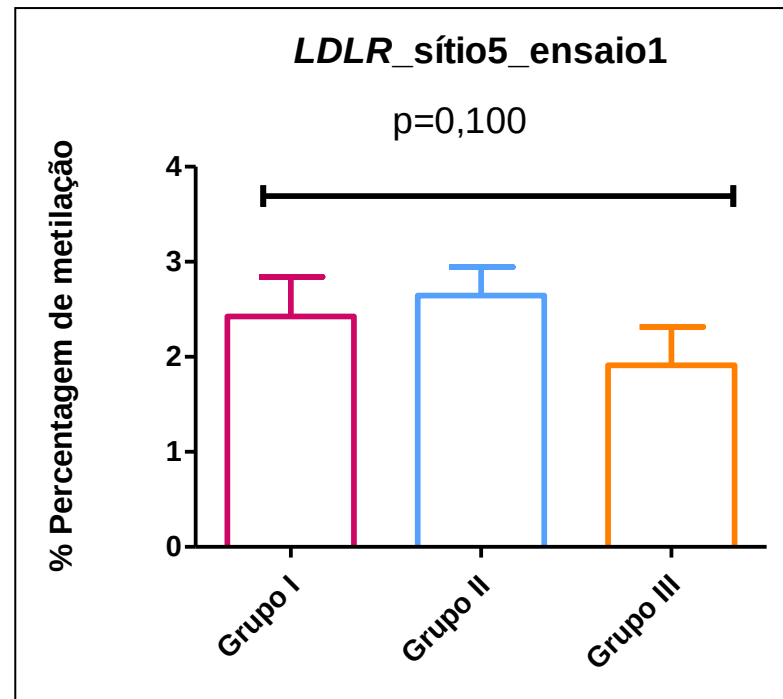


Figura 26: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *LDLR-1* sítio CpG 5

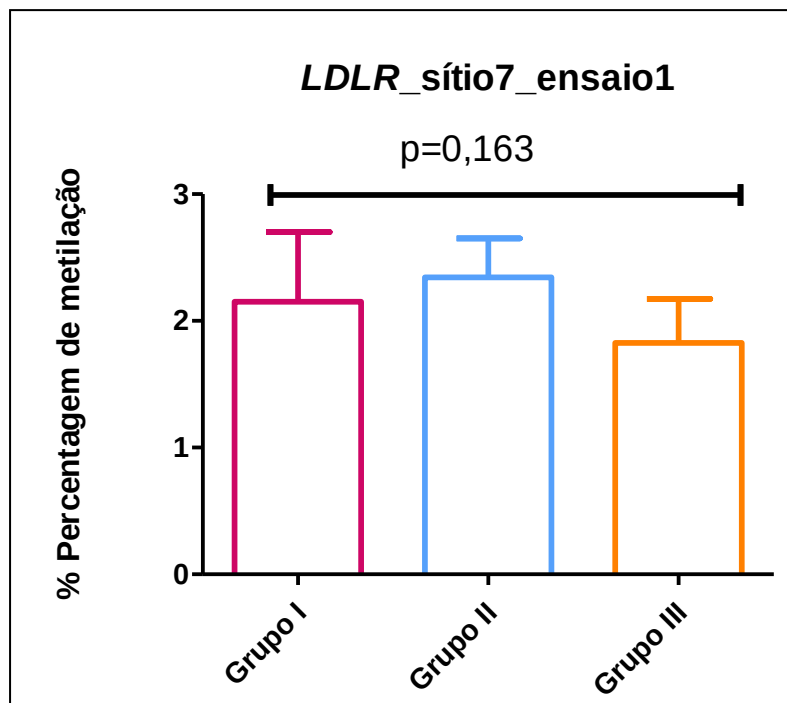


Figura 27: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *LDLR-1* sítio CpG 7

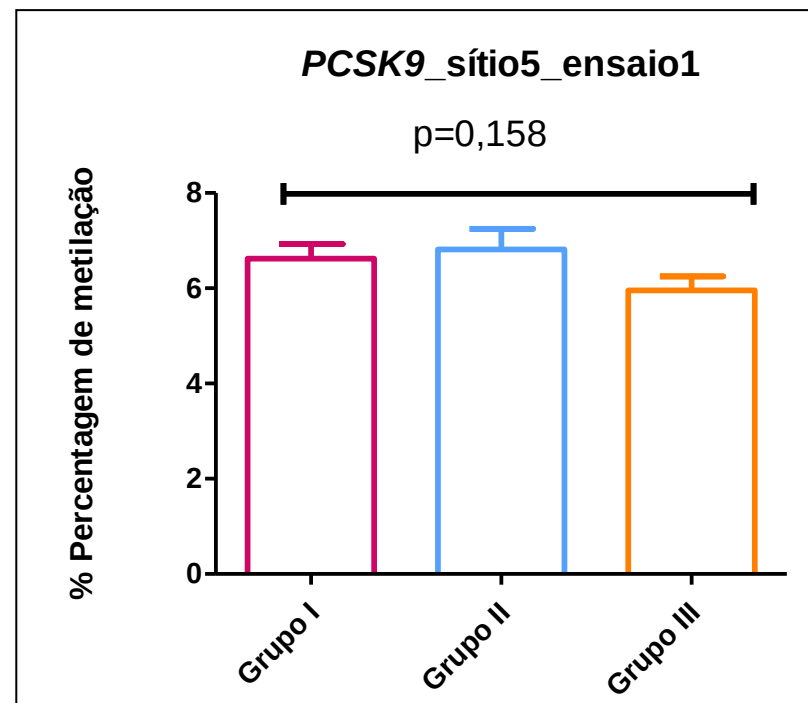


Figura 28: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *PCSK9-1* sítio CpG 5

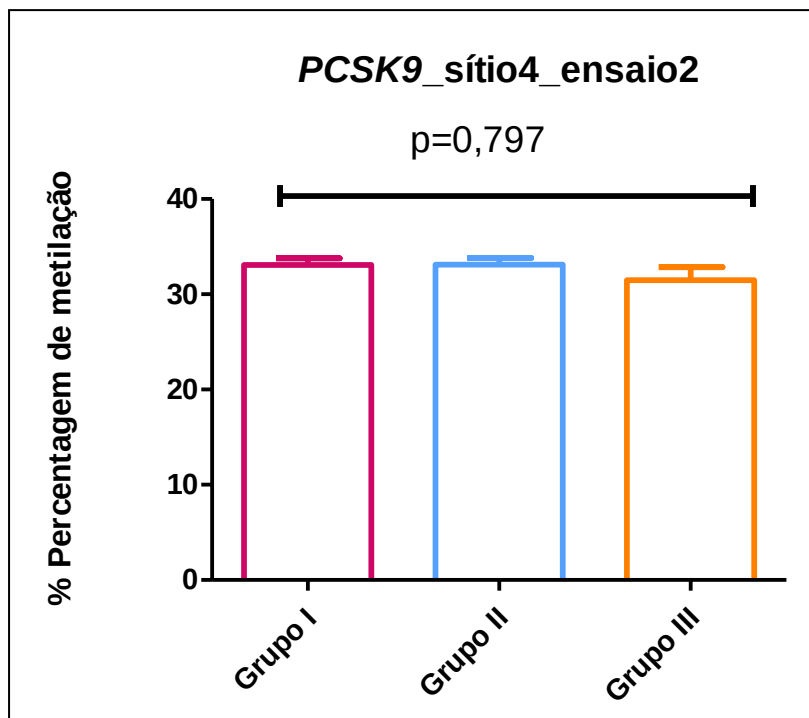


Figura 29: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *PCSK9*-2 sítio CpG 4

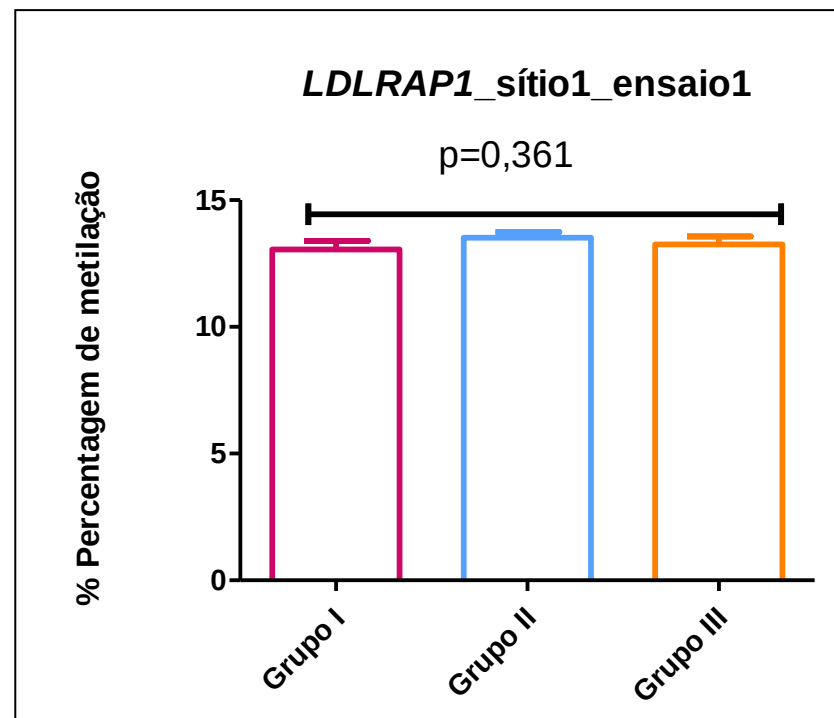


Figura 30: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *LDLRAP1*-1 sítio CpG 1

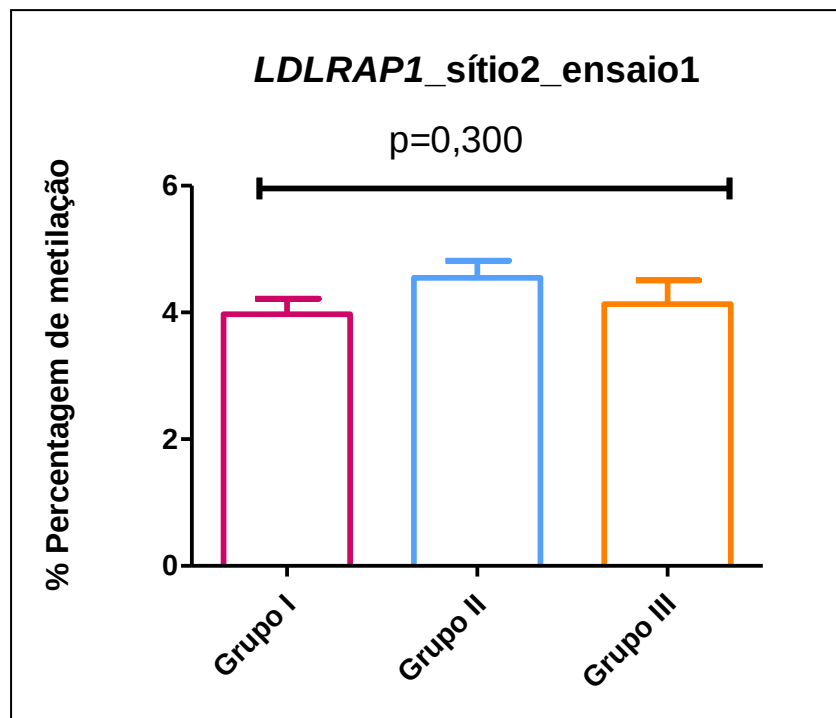


Figura 31: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *LDLRAP1-1* sítio CpG 2

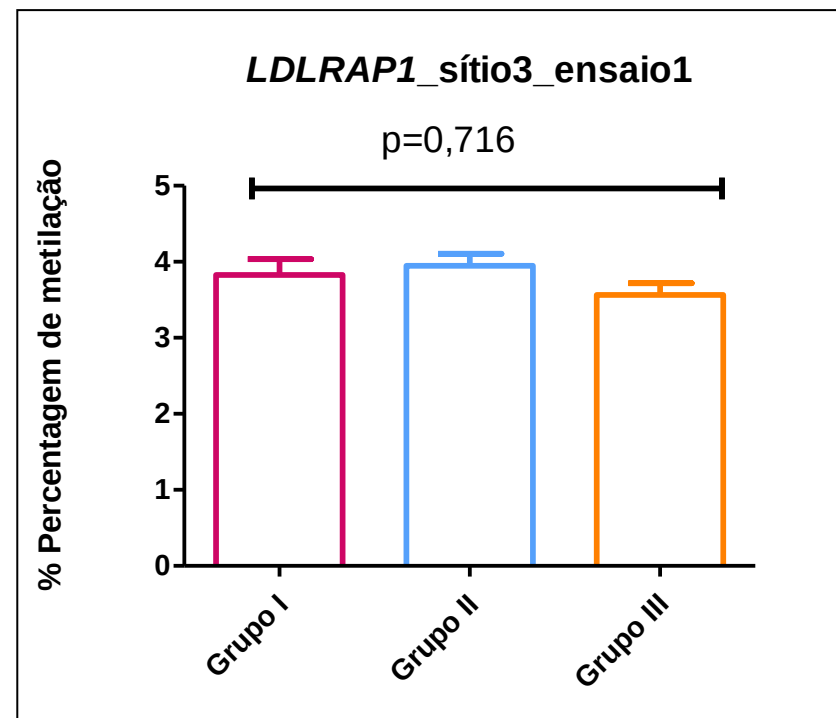


Figura 32: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *LDLRAP1-1* sítio CpG 3

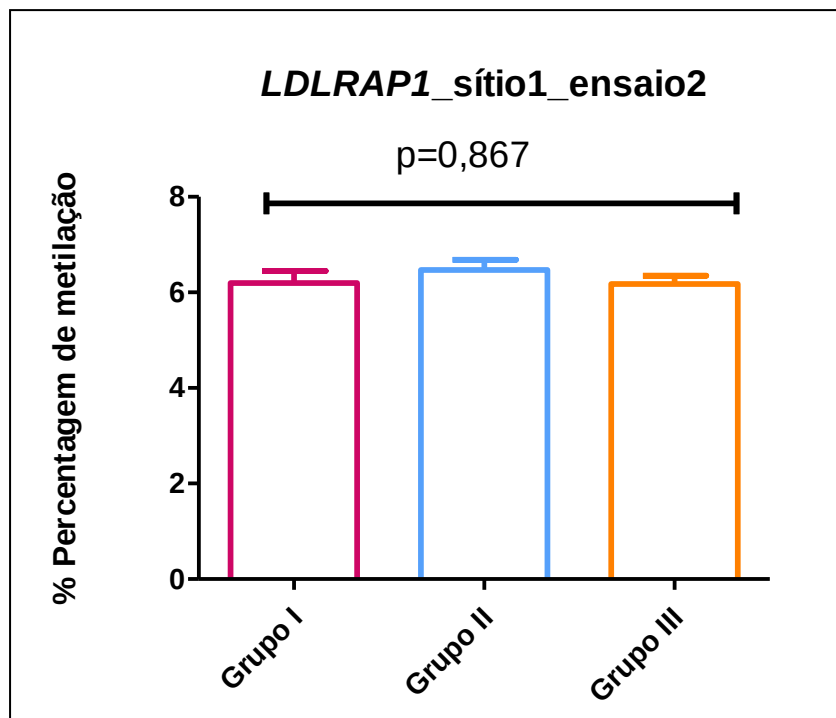


Figura 33: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *LDLRAP1*-2 sítio CpG 2

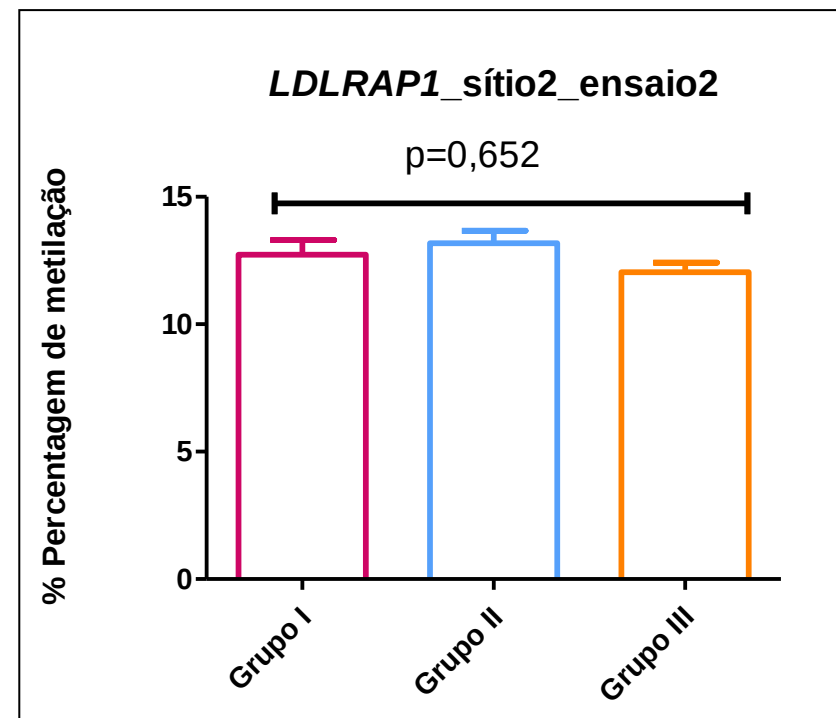


Figura 34: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *LDLRAP1*-2 sítio CpG 2

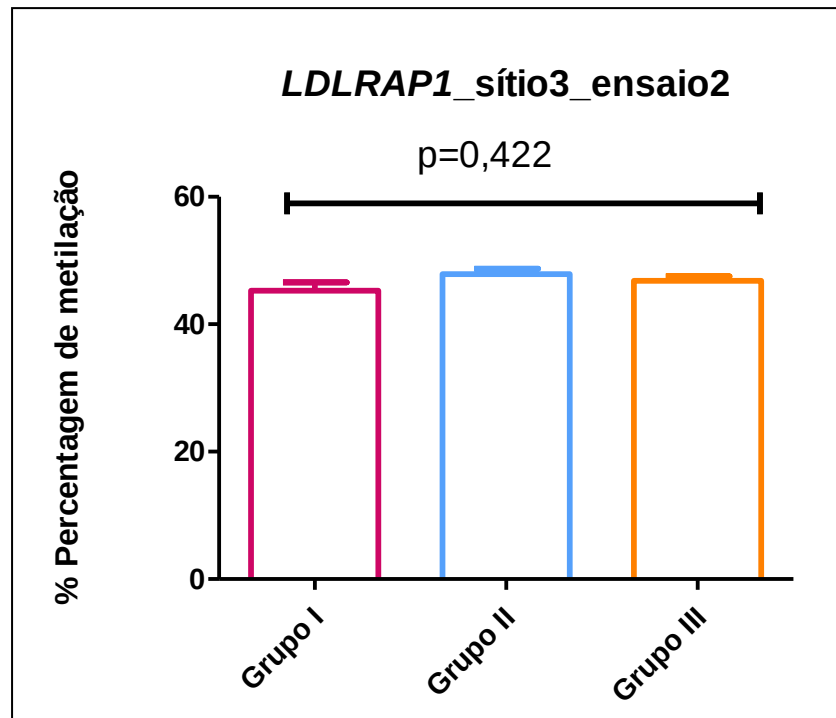


Figura 35: Análise comparativa entre os grupos I, II e III do ensaio *LDLRAP1*-2 sítio CpG 3



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Ultrassequenciamento exômico dos principais genes relacionados com a hipercolesterolemia familiar

Pesquisador: Jéssica Bassani Borges

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 8

CAAE: 24618713.0.1001.5462

Instituição Proponente: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia - SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

CNPQ

FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.587.235

Apresentação do Projeto:

Nº DO PROTOCOLO DO CEP: 4398/ 2013

A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença autossômica dominante com bases genéticas ainda não totalmente esclarecidas. O presente

estudo propõe a análise genômica, epigenômica e farmacogenômica de portadores de HF monogênica e poligênica. Serão recrutados pacientes

com HF diagnosticada fenotipicamente, em seis centros de pesquisa de diferentes regiões do Brasil. Os métodos utilizados incluem: (i)

ultrassequenciamento dos principais genes relacionados à HF e outras dislipidemias primárias utilizando o equipamento MiSeq (Illumina); (ii) análise

funcional de novas variantes nos genes LDLR, APOB e PCSK9 por citometria de fluxo, com estudo de interação com receptores de LDL em

linfócitos primários e com estudo de mutagenese dirigida utilizando CRISPR/Cas9 em células HepG2 e HUVEC; (iii) perfil de expressão diferencial

de miRNAs circulantes em amostras de plasma por PCR array; (iv) perfil de metilação dos genes LDLR, APOB e PCSK9 em leucócitos por

Endereço: Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 6º andar
Bairro: Ibirapuera **CEP:** 04.012-909
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5085-6040 **Fax:** (11)5085-6040 **E-mail:** cep@dantepazzanese.org.br



pirossequenciamento; (v) análise farmacogenômica incluindo genes envolvidos no metabolismo e na resposta a hipolipemiantes. As análises de bioinformática serão realizadas utilizando-se os programas MiSeq Reporter e CLC Genomic Workbench. Este estudo é pioneiro no país e a sua realização na população brasileira, altamente miscigenada, é inovadora e desafiadora. Os resultados deste estudo visam contribuir para o conhecimento das bases moleculares da HF, fornecer elementos para direcionamento no diagnóstico genético e na terapia personalizada de pacientes afetados, e possibilitar a criação de um banco nacional de dados genômicos que auxilie na orientação da conduta diagnóstica molecular para pacientes com fenótipo HF e seus familiares. Contribuirá para a formação de recursos humanos, consolidação da pesquisa e integração das instituições envolvidas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar as causas genéticas das dislipidemias primárias dos pacientes diagnosticados fenotipicamente no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.

Objetivo Secundário:

- Sequenciar os exomas dos genes relacionados a dislipidemias de origem genética e verificar o perfil das novas variantes polimórficas em pacientes com diagnóstico de hipercolesterolemia familiar.
- Identificar novas variantes nos genes relacionados com alteração do metabolismo do colesterol.
- Avaliar as correlações entre as mutações e as alterações fenotípicas.
- Caracterizar a funcionalidade de variantes do gene LDLR in vitro pelo perfil de captação de LDL, em cultura primária de linfócitos oriundos de portadores de HF;
- Caracterizar a funcionalidade de variantes do gene APOB in vitro pelo perfil de captação de LDL oriunda de portadores de HF, em células HepG2 e HUVEC;
- Realizar a mutagênese de variantes dos genes LDLR e PCSK9, encontradas no sequenciamento, em células HepG2 e HUVEC para avaliar sua funcionalidade independente da presença de outras variantes.

Endereço: Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 6º andar

Bairro: Ibirapuera

CEP: 04.012-909

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5085-6040

Fax: (11)5085-6040

E-mail: cep@dantepazzanese.org.br



Continuação do Parecer: 2.587.235

- Avaliar o perfil de expressão diferencial de miRNAs circulantes entre os diferentes padrões fenotípicos de HF encontrados em nossa população;
- Avaliar o perfil de metilação das ilhas CpG dos genes LDLR, APOB e PCSK9 de portadores de HF com diferentes padrões fenotípicos;
- Avaliar a associação de variantes em genes envolvidos no metabolismo e na resposta a medicamentos hipolipemiantes, em pacientes HF.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os participantes deste estudo não se submeterão a procedimentos adicionais, exceto a coleta de material biológico para dosagem dos biomarcadores, que em alguns serviços fazem parte da rotina do atendimento desses pacientes. Os riscos físicos referentes à coleta de amostra de sangue para o estudo são: hematoma, flebite, breve dor. Algumas pessoas têm vertigens quando coletam sangue, mas os sintomas desaparecem quando a pessoa se deita.

Benefícios:

Os participantes deste estudo não poderão receber nenhum benefício direto por fazer parte do Estudo. As informações obtidas deste estudo serão importantes para melhorar o diagnóstico, prognóstico e a prevenção dos eventos cardiovasculares em pacientes com dislipidemias primárias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem restrições do ponto de vista de ética em pesquisa

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1_ Inclusão de 4 centros participantes;

USP

HC de porto alegre

UNICAMP

Cruzeiro do sul educacional s.a

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem restrições do ponto de vista de ética em pesquisa

Endereço: Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 6º andar

Bairro: Ibirapuera

CEP: 04.012-909

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5085-6040

Fax: (11)5085-6040

E-mail: cep@dantepazzanese.org.br



INSTITUTO DANTE
PAZZANESE DE CARDIOLOGIA



Continuação do Parecer: 2.587.235

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012, resolução 510/96 e da Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, em reunião ordinária de 27/03/2018 manifesta-se pela aprovação da emenda.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	emenda_inclusaoacentors.pdf	20/03/2018 09:50:50	Pedro Silvio Farsky	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1072404_E6.pdf	16/03/2018 14:26:04		Aceito
Outros	Carta_Emenda.pdf	30/06/2016 16:01:00	Jéssica Bassani Borges	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	HF_CEP_ultima_versao.pdf	30/06/2016 16:00:32	Jéssica Bassani Borges	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	HF_TCLE2.pdf	30/06/2016 15:59:44	Jéssica Bassani Borges	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Justificativa_CEPIDPC_vinculo_Institucional.pdf	11/12/2015 16:40:04	Jéssica Bassani Borges	Aceito
Folha de Rosto	PLATAFORMA BRASIL - JESSICA.pdf	06/03/2015 11:01:08		Aceito
Outros	Troca de Pesquisador.pdf	08/12/2014 10:17:29		Aceito
Outros	Troca pesquisador.pdf	08/12/2014 10:17:29		Aceito
Outros	Carta de mudança de pesquisador.pdf	14/11/2014 12:20:49		Aceito
Outros	DECLARAÇÕES CEP Thiago D C Hirata.pdf	12/11/2013 14:32:38		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 6º andar
Bairro: Ibirapuera **CEP:** 04.012-909
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5085-6040 **Fax:** (11)5085-6040 **E-mail:** cep@dantepazzanese.org.br

SAO PAULO, 09 de Abril de 2018

Assinado por:
Pedro Silvio Farsky
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 6º andar
Bairro: Ibirapuera **CEP:** 04.012-909
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5085-6040 **Fax:** (11)5085-6040 **E-mail:** cep@dantepazzanese.org.br

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aplicado aos participantes do projeto.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO ESTUDO: "AVALIAÇÃO EXÔMICA DOS PRINCIPAIS GENES RELACIONADOS COM A HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR "

CENTRO: INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA

INVESTIGADOR: Thiago Dominguez Crespo Hirata

NÚMERO DO PACIENTE: _____

INICIAIS DO PACIENTE: _____

OBJETIVO DESTE ESTUDO

Você está sendo convidado para participar deste estudo que irá avaliar as alterações genéticas que podem ser causadoras de dislipidemia primária ou afetar o seu tratamento. As informações obtidas deste estudo serão importantes para melhorar o diagnóstico, prognóstico e a prevenção dos eventos cardiovasculares em pacientes com dislipidemias primárias (gorduras no sangue alteradas de origem genética).

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Caso você concorde em participar deste estudo, você receberá o mesmo cuidado que hoje é aplicado nesta instituição a todos os pacientes que passam no Departamento de Dislipidemias. Será necessário que você responda algumas perguntas sobre hábitos de vida, histórico de doenças, uso de medicamentos e doenças existentes nas pessoas de sua família.

A seguir serão coletadas amostras sanguíneas (total de 20 ml) para os exames laboratoriais e os testes genéticos. Se o(a) senhor(a) concordar, seu sangue será conservado

Rubricas	
Paciente	
Investigador	

Av. Dr. Dante Pazzanese, 500, Prédio da Administração, 1º andar • Ibirapuera • São Paulo – SP • CEP: 04012-909 •
Laboratório de Biologia Molecular (LIMC) • Fone: (11) 5085-6086 • E-mail: thiagodch@gmail.com

FORM 001IDPC Mar/09 rev.1

Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
Comitê de Ética em Pesquisa
Av. Dr. Dante Pazzanese, 500 - 6º andar - Torre
Ibirapuera - 04012-909 - São Paulo



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA



e guardado no Laboratório de Investigação Molecular de Cardiologia (LIMC), por, no máximo, 5 anos.

O(a) senhor(a) concorda que seu sangue seja armazenado?

Sim, eu concordo () Não, eu não concordo ()

Mesmo que o(a) senhor(a) não concorde que parte do seu sangue seja armazenado, o(a) senhor(a) poderá participar do estudo.

Abaixo está a lista de exames de análises clínicas que serão realizados:

- | | |
|-------------------------------|--------------------------------------|
| a. Hemograma completo | g. Glicemia |
| b. Ácido úrico | h. Hemoglobina glicada |
| c. Apo A | i. Proteína C reativa ultra sensível |
| d. Apo B | j. TGO (AST), TGP (ALT) |
| e. Colesterol Total e frações | k. TSH, T4 |
| f. Triglicérides | |

RISCOS E DESCONFORTOS

Os participantes deste estudo não terão riscos além das intercorrências inerente à punção venosa periférica (coleta de amostra de sangue) como formação de hematomas, flebite, breve dor, que são raras e sem maiores complicações clínicas. Algumas pessoas têm vertigens quando coletam sangue, mas os sintomas desaparecem quando a pessoa se deita.

BENEFÍCIOS POTENCIAIS

Você não receberá qualquer benefício direto ou pagamento por sua participação, pois se trata de um estudo desenhado para determinação dos processos fisiopatológicos visando ao incremento do conhecimento sobre o tema.

Caso seja de seu interesse, será disponibilizado os resultados dos exames laboratoriais e dos testes genéticos no final da pesquisa.

Rubricas	
Paciente	
Investigador	

Av. Dr. Dante Pazzanese, 500, Prédio da Administração, 1º andar • Ibirapuera • São Paulo – SP • CEP: 04012-908 •
Laboratório de Biologia Molecular (LIMC) • Fone: (11) 5085-6086 • E-mail: thiagodch@gmail.com

FORM 001IDPC Mar/09 rev.1



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA



ALTERNATIVAS À PARTICIPAÇÃO

Caso você não queira participar deste estudo, e esteja sendo tratado na instituição você continuará recebendo o tratamento já utilizado de rotina.

CONFIDENCIALIDADE

Assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido você está aceitando participar deste estudo e permitindo que todos os seus registros médicos sejam verificados pela equipe de pesquisa em busca de dados para o estudo.

Sua identidade será mantida em segredo quando os resultados do estudo forem publicados, pois, você está autorizando que os seus dados a serem publicados como artigos em revistas, artigos e serem tema de debates e aulas. As informações coletadas durante o estudo serão armazenadas em um computador, mas seu nome não. A coleta e análise de dados de estudos médicos são consideradas pessoais protegidas por leis nacionais e internacionais. Seu médico será informado de sua participação neste estudo.

NOVOS ACHADOS

Você será informado sobre quaisquer novos achados importantes que se tornarem disponíveis durante o estudo que possam influenciar seu desejo de continuar ou não a participar do estudo.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA E CONSENTIMENTO

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir, a qualquer momento durante o estudo, sem ter que dar explicações. Isso não mudará a qualidade de atendimento que você estará recebendo muito menos em qualquer tipo de penalidade.

Rubricas	
Paciente	
Investigador	

Av. Dr. Dante Pazzanese, 500, Prédio da Administração, 1º andar • Ibirapuera • São Paulo – SP • CEP: 04012-909 •
Laboratório de Biologia Molecular (LIMC) • Fone: (11) 5085-6086 • E-mail: thiagodch@gmail.com

FORM 001IDPC Mar/09 rev.1



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA



Por qualquer motivo, independente do seu consentimento, os membros da equipe de pesquisa poderão encerrar sua participação no estudo, sendo explicado imediatamente a você os motivos para tal acontecimento. Caso isso venha a acontecer seu tratamento continuará sendo feito pelo seu médico.

SOLICITAÇÃO DE INFORMAÇÕES ADICIONAIS

O pesquisador Thiago Dominguez Crespo Hirata, tel. (011) 5085-6086 ou (011) 99680-5086 irá responder todas as dúvidas que você possa ter sobre sua participação neste estudo. Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia no telefone (011) 5085-6040. Uma cópia deste termo será entregue para você.

Li e compreendi este termo de consentimento e todas as minhas dúvidas foram resolvidas. Recebi explicações sobre o objetivo da pesquisa, os procedimentos de estudo a que serei submetido e os possíveis riscos, desconfortos e benefícios que posso apresentar. As alternativas à minha participação neste estudo também foram discutidas. Portanto, concordo voluntariamente em fornecer meu consentimento para participar deste estudo clínico.

Assinatura do Paciente

Data

____ : ____ h
Hora

Testemunha (se necessário)

Data

____ : ____ h
Hora

Assinatura do Investigador

Data

____ : ____ h
Hora

Rubricas	
Paciente	
Investigador	

Av. Dr. Dante Pazzanese, 500, Prédio da Administração, 1º andar • Ibirapuera • São Paulo – SP • CEP: 04012-909 •
Laboratório de Biologia Molecular (LIMC) • Fone: (11) 5085-6086 • E-mail: thiagodch@gmail.com

FORM 001IDPC Mar/09 rev.1