

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Estudos da atividade do receptor da LDL em pacientes com Hipercolesterolemia
Familiar

Thaís Kristini Almendros Afonso

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

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Estudos da atividade do receptor da LDL em pacientes com Hipercolesterolemia
Familiar

Thaís Kristini Almendros Afonso

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

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

São Paulo
2018

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

A111e AFONSO, THAIS KRISTINI ALMENDROS
Estudos da atividade do receptor da LDL em
pacientes com Hipercolesterolemia Familiar / THAIS
KRISTINI ALMENDROS AFONSO. - São Paulo, 2018.
72 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia.
Orientador: HIRATA, MARIO HIROYUKI

1. hipercolesterolemia familiar. 2. LDLr. 3.
validação. 4. docking molecular. I. T. II. HIRATA,
MARIO HIROYUKI, orientador.

Thaís Kristini Almendros Afonso

Estudos da atividade do receptor da LDL em pacientes com Hipercolesterolemia
Familiar

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr.
Orientador
Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

4º Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2019.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu serenidade e força para superar todos os desafios.

Ao meu tão amado esposo Lucas de Paula Barbosa, por todo amor, paciência, companheirismo e ajuda em todas as etapas, principalmente no final da dissertação, eu te amo.

Agradeço a minha mãe, Sandra Afonso e minha avó Jacyra Almendros, pela ajuda em orações, proteção e incentivo em meus estudos desde a graduação até agora, se hoje concluo essa etapa é graças a vocês. Agradeço também ao meu pai Denis Afonso e minhas irmãs Maria Luiza Almendros e Leticia Almendros e minha querida sobrinha Manuella Sayuri por toda ajuda durante essa etapa e compreenderem minha ausência.

As amigas Jéssica Bassani Borges, Elisangela Rodrigues da Silva Marçal e Bruna Los, que foram meu suporte no desenvolvimento desse projeto, desde a elaboração até a conclusão dos experimentos, sem vocês eu não conseguiria. Agradeço a amizade dentro e fora do laboratório, irei levar pra vida.

Ao professor Mario Hiroyuki Hirata agradeço pela confiança e oportunidade de realizar um grande sonho, mais que orientador o senhor foi um paião.

Tania Cristina Python Curi por permitir a utilização dos equipamentos no ICAFE-UNICSUL.

Renata Gorjão por toda ajuda na padronização dos experimentos, carinho e atenção e seus alunos Heloisa Helena, Laiane Cristina, Vinicius Leonardo e Amanda Lins.

Ao Glaucio Monteiro Ferreira Banco pelo auxílio no docking molecular.

Aos amigos do LIMC Gisele Medeiros, Adriana Regina Garófalo, Lin Hui-Tzu Wang, Helena Strelow Thurow, Ana Cristina Lopes

Aos amigos do LABMAD Professora Rosário Dominguez Crespo Hirata, Carolina Dagli Hernandez, Renata Caroline, Raul Bortolin, Augusto Akira Mori e Cristina Farjado.

À Professora Doutora Helena Bonciani Nader e as técnicas do laboratório Lab.Confocal e Citometria de Fluxo da Escola Paulista de Medicina-UNIFESP, Beth e Carol pela ajuda na microscopia confocal

Aos pacientes que aceitaram participar do estudo.

“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

AFONSO, T. K. A. **Estudos da atividade do receptor da LDL em pacientes com Hipercolesterolemia Familiar.** 2018 72 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2018

A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença autossômica dominante considerada como uma das formas mais graves de hiperlipidemia, assim como, a principal causa de morbimortalidade por ser o principal fator desencadeante da aterosclerose. A alteração primária e mais freqüente da HF incide no gene do receptor da LDL (LDLr), sabe-se que mais de 1600 mutações são descritas na literatura e a principal consequência dessas alterações resultam no comprometimento da remoção da LDL, aumentando a concentração plasmática. Atualmente, o ultrasequenciamento genômico permite gerar muitos dados, que podem identificar novas mutações gênicas de forma eficiente, reprodutiva e rápida. No entanto, somente a validação da nova mutação por atividade funcional pode realmente estabelecer a associação com a doença. O presente estudo tem como objetivo realizar a análise da atividade do receptor da LDL, identificadas através do sequenciamento de alto rendimento, no gene *LDLr* realizado pelo nosso grupo de pesquisa e correlacionar com dados clínicos, *in vitro*, *in silico* e estrutural. Para cumprir esta meta, os linfócitos T dos portadores de HF foram isolados do sangue periférico, cultivados e submetidos a estímulo para a expressão de receptores da LDL, incubados com LDL marcada para avaliação de ligação e interiorização pelas células de cada paciente. Dos 30 pacientes selecionados para esse estudo, 63% apresentaram mutação no *LDLR*, sendo que quase todas as variantes (p.Gly373Asp, p.Asp601His, p.Ile488Thr, p.Gly549Asp, p.Gly592Glu e Gly681Asp) são localizadas no segundo domínio entre os éxons 7 ao 14. De acordo com o *docking* molecular a variante p.Gly592Glu (rs137929307), que já foi identificada na população polonesa, espanhola e brasileira, já relacionada com a HF, pode aumentar a interação do LDLr com a ApoB e conseqüentemente o modo de interação entre as proteínas, no estudo *in vitro* foi possível notar um aumento tanto na média de fluorescência da ligação e da ligação e interiorização em relação a quantidade de LDLr na superfície celular.

Palavras-chave: hipercolesterolemia familiar, *LDLr*, validação, *docking* molecular

ABSTRACT

AFONSO, T. K. A. **Studies of LDL receptor activity in patients with familial hypercholesterolemia. 2018 72 f. Dissertation (Master)** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2018.

Familial hypercholesterolemia (HF) is an autosomal dominant disease considered as one of the most severe forms of hyperlipidemia, as well as the main cause of morbidity and mortality because it is the main triggering factor for atherosclerosis. The primary and more frequent alteration of the HF affects the LDL receptor gene (LDLR), it is known that more than 1600 mutations are described in the literature and the main consequence of these alterations results in the compromise of the LDL removal, increasing the plasma concentration. Nowadays, genomic ultrasequencing allows the generation of many data, which can identify new gene mutations efficiently, reproductively and rapidly. However, only the validation of the new functional activity mutation can actually establish association with the disease. The aim of the present study was to analyze LDL receptor activity, identified by high-throughput sequencing, in the LDLR gene performed by our research group and to correlate with clinical, in vitro, in silico and structural data. To meet this goal, the T lymphocytes from the HF carriers were isolated from the peripheral blood, cultured and challenged for the expression of LDL receptors, incubated with labeled LDL for binding assessment and internalization by the cells of each patient. Of the 30 patients selected for this study, 63% had a mutation in LDLR, and almost all variants (p.Gly373Asp, p.Asp601His, p.Ile488Thr, p.Gly549Asp, p.Gly592Glu and Gly681Asp) are located in the second domain between exons 7 to 14. According to the molecular docking the variant p.Gly592Glu (rs137929307), which has already been identified in the Polish, Spanish and Brazilian population, already related to HF, can increase the interaction of LDLR with ApoB and consequently the mode of interaction between proteins, in the in vitro study it was possible to note an increase in both the mean fluorescence of binding and binding and internalization in relation to the amount of LDLR on the cell surface.

Key words: familial hypercholesterolemia, LDLR, validation, molecular docking

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABCA1 - Transportador de cassete ligante de ATP subfamília A membro 1
- AGL - Ácidos graxos livres
- Ala - Alanina
- ApoA-I - Apolipoproteína A I
- ApoB - Apolipoproteína B
- APOB* - gene da Apolipoproteína B
- ApoC-II - Apolipoproteína C II
- ApoC-III - Apolipoproteína C III
- ApoE - Apolipoproteína E
- APOE - Apolipoproteína E
- Arg - Arginina
- ARH - Proteína adaptadora do receptor de lipoproteína de baixa densidade
- Asn - Asparagina
- Asp - Aspartato
- CETP - Proteína de transferência de colesterol esterificado
- CT - Colesterol sérico total
- Cys - Cisteína
- DCV - Doenças cardiovasculares
- Dutch MEDPED - Dutch Lipid Clinic Network - Make Early Diagnosis to Prevent Early Deaths*
- EGF - Fator de crescimento epidermal
- EGFR - Receptor do fator de crescimento epidermal
- FBS - Soro fetal bovino
- FCF - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
- FDB - Deficiência familiar de apoB-100
- Gln - Glutamina
- Glu – Glutamato
- Gly - Glicina
- HDL - Lipoproteína de alta densidade
- HDL-c - Colesterol da lipoproteína de alta densidade

HF - Hipercolesterolemia familiar
His - Histidina
HMGCR - 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase
IDL - Lipoproteína de densidade intermediária
IDPC - Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
LCAT - Lecitina colesterol aciltransferase
LDL - Lipoproteína de baixa densidade
LDL-c - Colesterol da lipoproteína de baixa densidade
LDLr - Gene do receptor da lipoproteína de baixa densidade
LDLr - Receptor da lipoproteína de baixa densidade
LDLrAP1 - Proteína adaptadora do receptor de LDL 1
Leu - Leucina
LIPA - Lipase A
Lp (a) - Lipoproteína (a)
LPDS - Soro deficiente de lipoproteínas
LPL - Lipoproteína lipase
LRP1 - Proteína relacionada ao receptor de LDL 1
Lys - Lisina
Met - Metionina
mRNA - RNA mensageiro
MTTP - Proteína microsomal de transferência de triacilglicerol
NGS - *Next Generation Sequencing*
NPC1 - Niemann-Pick tipo C1
NPC2 - Niemann-Pick tipo C2
OMS - Organização Mundial da Saúde
pb - Pares de bases
PCSK9 - Proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9
QM - Quilomícrons
Pro - Prolina
Ser - Serina
SREBF1 - Fator de transcrição do elemento regulador do esterol 1

TG - Triacilgliceróis

Thr - Treonina

Trp - Triptofano

Tyr - Tirosina

Val - Valina

VLDL - Lipoproteína de muita baixa densidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Manifestações clínicas HF: (A) arco córneo, (B) xantelasmas, (C) xantomas tuberosos e (D) xantomas tendinosos..	20
Figura 2 Representação esquemática do LDLr com seus 5 domínios..	23
Figura 3 Depósito de variantes no ClinVar de acordo com país.	24
Figura 4 Representação das classes de mutações no LDLr..	25
Figura 5 Representação esquemática das mutações encontradas nos 30 pacientes.....	40
Figura 6 Esquema com as variantes encontradas nos pacientes de acordo com a localização do exon e domínio.....	41
Figura 7 Mapa com as variantes e localização geográfica.	41
Figura 8 Média de fluorescência adquirida por citometria de fluxo, em A gráfico representativo da relação entre a média de fluorescência do LDLr nos linfócitos totais e em B dos linfócitos CD3+.....	43
Figura 9 Média de fluorescência adquirida por citometria de fluxo, em A gráfico representativo da relação entre a média de fluorescência na ligação (A) e ligação interiorização (B) da LDL comercial. 44	44
Figura 10 Média de fluorescência de acordo com a presença e tipo de mutação, de acordo com a ligação e interiorização (A), ligação (B) e LDLr (C). 44	44
Figura 11 Demonstração dos resultados do docking molecular, microscopia confocal e citometria de fluxo. À esquerda esta a demonstração do docking molecular entre as proteínas LDLr e ApoB, acima está a representação entre a interação das proteínas selvagens e abaixo, a interação entre as proteínas com a presença da variante no LDLr. Na parte central, estão as imagens da microscopia confocal do paciente (HF 02) portador dessa variante, mostrando a ligação, ligação e interiorização e receptores à superfície, as marcações em vermelho representam as células CD3+ (PE), em verde o LDL comercial (BODIPY FL) e em cinza LDLr (Alexa 647). À direita são os histogramas obtidos através da citometria de fluxo, sendo que as porcentagens sinalizadas à direita, são as células positivas.....	46
Figura 12 Demonstração dos resultados do docking molecular, microscopia confocal e citometria de fluxo. À esquerda esta a demonstração do docking molecular entre as proteínas LDLr e ApoB, acima está a representação entre a interação das proteínas selvagens e abaixo, a interação entre as proteínas com a presença da variante no LDLr. Na parte central, estão as imagens da microscopia confocal do paciente (HF 20) portador dessa variante, mostrando a ligação, ligação e interiorização e receptores à superfície, as marcações em vermelho representam as células CD3+ (PE), em verde o LDL comercial (BODIPY FL) e em cinza LDLr (Alexa 647). À direita são os histogramas obtidos através da citometria de fluxo, sendo	

que as porcentagens sinalizadas à direita, são as células positivas.....47

Figura 13 Demonstração dos resultados do docking molecular, microscopia confocal e citometria de fluxo. À esquerda esta a demonstração do docking molecular entre as proteínas LDLr e ApoB, acima está a representação entre a interação das proteínas selvagens e abaixo, a interação entre as proteínas com a presença da variante no LDLr. Na parte central, estão as imagens da microscopia confocal do paciente (HF 40) portador dessa variante, mostrando a ligação, ligação e interiorização e receptores à superfície, as marcações em vermelho representam as células CD3+ (PE), em verde o LDL comercial (BODIPY FL) e em cinza LDLr (Alexa 647). À direita são os histogramas obtidos através da citometria de fluxo, sendo que as porcentagens sinalizadas à direita, são as células positivas.....49

Figura 14 Demonstração dos resultados do docking molecular, microscopia confocal e citometria de fluxo. À esquerda esta a demonstração do docking molecular entre as proteínas LDLr e ApoB, acima está a representação entre a interação das proteínas selvagens e abaixo, a interação entre as proteínas com a presença da variante no LDLr. Na parte central, estão as imagens da microscopia confocal do paciente (HF 58) portador dessa variante, mostrando a ligação, ligação e interiorização e receptores à superfície, as marcações em vermelho representam as células CD3+ (PE), em verde o LDL comercial (BODIPY FL) e em cinza LDLr (Alexa 647). À direita são os histogramas obtidos através da citometria de fluxo, sendo que as porcentagens sinalizadas à direita, são as células positivas.....50

Figura 15 Demonstração dos resultados do docking molecular, microscopia confocal e citometria de fluxo. À esquerda esta a demonstração do docking molecular entre as proteínas LDLr e ApoB, acima está a representação entre a interação das proteínas selvagens e abaixo, a interação entre as proteínas com a presença da variante no LDLr. Na parte central, estão as imagens da microscopia confocal do paciente (HF 15) portador dessa variante, mostrando a ligação, ligação e interiorização e receptores à superfície, as marcações em vermelho representam as células CD3+ (PE), em verde o LDL comercial (BODIPY FL) e em cinza LDLr (Alexa 647). À direita são os histogramas obtidos através da citometria de fluxo, sendo que as porcentagens sinalizadas à direita, são as células positivas.....51

Figura 16 Demonstração dos resultados do docking molecular, microscopia confocal e citometria de fluxo. À esquerda esta a demonstração do docking molecular entre as proteínas LDLr e ApoB, acima está a representação entre a interação das proteínas selvagens e abaixo, a interação entre as proteínas com a presença da variante no LDLr. Na parte central, estão as imagens da microscopia confocal do paciente (HF 11) portador dessa variante, mostrando a ligação, ligação e interiorização e receptores à superfície, as marcações em vermelho representam as células CD3+ (PE), em verde o LDL comercial (BODIPY FL) e em cinza LDLr (Alexa 647). À direita são os histogramas obtidos através da citometria de fluxo, sendo

que as porcentagens sinalizadas à direita, são as células positivas.....52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Critérios diagnósticos da HF baseado nos critérios da Dutch MEDPED e adaptado da atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção de aterosclerose.....	33
Tabela 2 Dados biodemográficos dos 30 pacientes selecionados para estudo.	39
Tabela 4 Análise in silico dos pacientes com mutações missense.....	42
Tabela 3 Correlação entre a LDL-c e a ligação e interiorização, ligação e LDLr.	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.2 DISLIPIDEMIAS	18
1.3 SEQUENCIMENTO DE NOVA DE GERAÇÃO	26
1.4 FERRAMENTAS DE PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i>	26
1.5 <i>DOCKING</i> MOLECULAR.....	27
1.6 ESTUDO FUNCIONAL DAS VARIANTES ASSOCIADAS COM HF.....	28
2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 AMOSTRA BIOLÓGICAS.....	33
4.2 SEPARAÇÃO E CULTURA DE LINFÓCITOS T	34
4.3 CULTURA PRIMÁRIA DE LINFÓCITOS T HUMANOS.....	35
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE E EXPRESSÃO DE LDL _r PELA CITOMETRIA DE FLUXO	35
4.5 MICROSCOPIA CONFOCAL POR VARREDURA A LASER.....	36
4.6 <i>DOCKING</i> MOLECULAR.....	37
4.7 ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	37
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS DADOS CLÍNICOS, <i>IN VITRO</i> , <i>IN SILICO</i> E ESTRUTURAL.....	45
6 CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXO 1	58
ANEXO 2	62
ANEXO 3	68

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que em 2030, aproximadamente 23,6 milhões de óbitos ocorrerão por decorrência das doenças cardiovasculares (DCV), tornando-as com uma das principais causas de mortalidade no mundo. No Brasil, essa perspectiva não é diferente, cerca de 30% dos óbitos registrados no país são pelas DCV (WHO, 2014).

As DCV possuem etiologia e fisiopatologia complexas resultantes da combinação de diversos fatores de risco, como os biológicos (hipertensão, dislipidemias, hiperglicemia e obesidade), ambientais (tabagismo, hábitos alimentares nocivos, consumo excessivo de álcool e sedentarismo) e fixos (idade, sexo, etnia e genética). A morbi-mortalidade associadas às DCV podem ser reduzidas através de intervenções que podem interferir nesses fatores de risco (ANDERSON *et al.*, 2014; XAVIER, *et al.*, 2013).

Entre os fatores de risco, a dislipidemia constitui um importante problema de saúde pública, uma vez que a população brasileira possui prevalência de 59,74%. A alterações na concentração plasmática de lipídios pode ser decorrente de diferenças genéticas ou estilo de vida, incluindo variações nos hábitos alimentares e de atividade física (COELHO, 2012; CARROLL *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2004; FREITAS, 2010).

Os lipídeos são substâncias orgânicas caracterizadas pela baixa solubilidade em meio aquoso. Podem ser de origem endógena, obtidos pela síntese de colesterol no fígado e exógena, através da absorção e transporte de gorduras obtidos pela dieta. São representados pelos: ácidos graxos (AGL), triacilgliceróis (TG), fosfolipídeos (FL), colesterol livre (CL) e colesterol esterificado (CE). Desempenham funções biológicas de extrema importância, tais como: síntese de hormônios, ácidos biliares, vitaminas lipossolúveis, formação da estrutura das membranas celulares, além de serem sinalizadores de várias reações bioquímicas intracelulares. Sendo estas moléculas pouco solúveis no sangue, necessitam ser transportadas por complexos macromoleculares de lipídeos e proteínas, as lipoproteínas (LP) (QUINTÃO *et al.*, 2011; COELHO, 2012; DA SILVA, 2007; VASCONCELOS, 2015; WERUTSKY, 2006).

As lipoproteínas são estruturas esféricas cujo núcleo hidrofóbico é constituído por CE e TG e à superfície apresentam uma monocamada de moléculas hidrofílicas FL, CL e Apolipoproteínas, estas possuem diversas funções no metabolismo das LP, como é o caso das ApoB e ApoE, que atuam como ligantes a receptores de membrana, ou cofatores enzimáticos, como as ApoC-II, ApoC-III e ApoA-I (QUINTÃO *et al.*, 2011; COELHO, 2012; VASCONCELOS, 2015).

As LP podem ser classificadas de acordo com a migração eletroforética, conformação, composição de lipídeos e apolipoproteínas, tamanho e densidade. A densidade dessas partículas

varia em relação inversa com o seu tamanho, ou seja, quanto maior a proporção lipídica, menor a densidade, e quanto maior a fração proteica presente na superfície, maior a densidade. Seguindo essa relação, das maiores às menores temos: quilomícrons (QM), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína (a) [Lp (a)], a composição lipídica desta LP (a) é semelhante à LDL por possuir ApoB-100. Alguns estudos associaram essa LP com a formação e progressão da placa aterosclerótica (QUINTÃO *et al.*, 2011; COELHO, 2012; DA SILVA, 2007; VASCONCELOS, 2015; WERUTSKY, 2006; MARANHÃO *et al.*, 2014).

Estudos epidemiológicos demonstraram que elevadas concentrações de colesterol plasmático, principalmente o transportado pela lipoproteína de baixa densidade (LDL) são relacionados com o desenvolvimento de aterosclerose e o aumento das DCV (CARROLL *et al.*, 2005; FREITAS, 2010; WU *et al.*, 2004)

1.2 DISLIPIDEMIAS

A dislipidemia é um conjunto de alterações decorrentes de perturbações funcionais em qualquer fase do metabolismo lipídico. Estas se manifestam pelo aumento da concentração do colesterol sérico total (CT), do colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) e dos triacilgliceróis (TG), ou pela diminuição do colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-c) (MESH, 2006).

A classificação era realizada conforme fenótipo de Fredrickson, baseada na separação eletroforética e/ou por ultracentrifugação das frações lipoproteicas, considerando apenas a elevação na concentração de colesterol e/ou TG, não sendo considerado o HDL-c, mas atualmente, as dislipidemias são categorizadas como primária ou secundária. As primárias decorrem de mutações genéticas únicas ou múltiplas que afetam a síntese e o metabolismo de lipoproteínas com superprodução ou remoção plasmática defeituosa de TG e colesterol da LDL, ou baixa produção da HDL (FALUDI *et al.*, 2017).

As dislipidemias primárias podem ser classificadas fenotipicamente, por meio de análises bioquímicas ou genotipicamente. Na classificação genotípica, as dislipidemias dividem-se em monogênicas, causadas por mutações em único gene e poligênicas, causadas por múltiplas mutações que isoladas não alteram o fenótipo, mas quando estão associadas causam a doença (WIJERS *et al.*, 2016).

A classificação fenotípica ou bioquímica considera os valores do CT, LDL-c, TG e HDL-c. Compreende quatro tipos principais bem definidos de interesse clínico (SPOSITO,

2007), (i) hipercolesterolemia isolada: Aumento isolado do colesterol da LDL sérico > 160 mg/dL, (ii) hipertrigliceridemia isolada: aumento isolado dos TG séricos (>150 mg/dL), que reflete o aumento do volume de partículas ricas em TG como VLDL, IDL e quilomícrons (colesterol não-HDL-c), (iii) hiperlipidemia mista ou combinada: valores aumentados de ambos, LDL-c (> 160 mg/dL) e TG (>150 mg/dL), (iv) colesterol da HDL (HDL-c) baixo: Redução da HDL-c (homens <40 mg/dL e mulheres <50 mg/dL) isolada ou em associação com aumento de LDL- c ou de TG (WIJERS et al., 2016; DA SILVA, 2007).

As dislipidemias secundárias estão relacionadas a outros tipos de doenças como o *diabetes mellitus*, o hipotireoidismo, as doenças renais ou hepáticas, no entanto, fatores como a obesidade, menopausa, dieta rica em ácidos graxos, sedentarismo, tabagismo e alcoolismo encontram-se também associados. O tratamento das secundárias consiste em controlar primeiramente a doença de base e em casos singulares, recorrer ao tratamento farmacológico com hipolipemiantes (FREITAS, 2010).

1.2.1 Hipercolesterolemia Familiar

A Hipercolesterolemia Familiar (HF) é uma doença autossômica dominante considerada como uma das formas mais graves de hiperlipidemia. Devido à elevada prevalência e frequência de complicações cardiovasculares, é reconhecida como um problema de saúde pública mundial pela Organização Mundial da Saúde, que afetam 30 milhões de indivíduos em todo o mundo em diferentes proporções (BRAUTBAR *et al.*, 2015; VALLEJO-VAZ *et al.*, 2015).

Inicialmente descrita, em 1974, como sendo uma doença monogênica de transmissão autossômica dominante, cuja causa seria a ausência total ou parcial de LDLr, causando uma maior permanência dessas partículas na circulação. Nos indivíduos heterozigotos a quantidade de receptores é reduzida pela metade, ao passo que, nos homozigotos, ocorre praticamente a ausência de receptores funcionais ou com a funcionalidade reduzida (WERUTSKY, 2006; GOLDSTEIN & BROWN, 2009).

A forma de herança clássica da HF é autossômica dominante que é causada por mutações funcionais nos genes das proteínas que regulam a homeostase do colesterol, do receptor de lipoproteína de baixa densidade (*LDLr*), da apolipoproteína B-100 (*APOB*) e da proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (*PCSK9*) (NAJAM; RAY, 2015; SANTOS; MARANHÃO, 2014).

Portadores de mutações no gene *LDLr* em heterozigose, cuja a frequência é de 1: 200, apresentam a concentração plasmática de LDL-c duas vezes acima da faixa de referência da população saudável (300 – 440 mg/dL), e em homozigose, 1: 160.000, e a concentração plasmática de LDL-c de cinco a sete vezes acima do valor de referência (600 – 1.200 mg/dL)

(SANTOS *et al.*, 2012). Esse aumento da LDL plasmática resulta em infiltração acelerada de colesterol para alguns tecidos, levando a manifestações clínicas características como: arco córneo, xantomas tuberosos (lesões cutâneas derivadas do acúmulo de derivados do colesterol) e tendinosos (deposição de lipídeos sobre os tendões, abaixo do tecido cutâneo, é a forma mais indicativa de HF), xantelasmas (é um tipo de xantoma visualizados nas pálpebras próximo a narina) (BRAUTBAR *et al.*, 2015), conforme **figura 1**.

A manifestação mais importante é deposição de colesterol na íntima das artérias com aumento importante no risco de desenvolver aterosclerose prematura na infância (LIBBY; BORNFELDT; TALL, 2016).

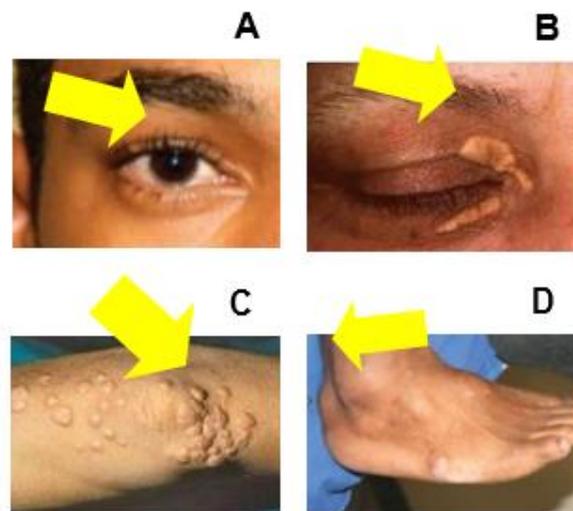


Figura 1 Manifestações clínicas HF: (A) arco córneo, (B) xantelasmas, (C) xantomas tuberosos e (D) xantomas tendinosos. Fonte: FALUDI *et al.*, 2017.

Mutações na região do gene que codifica o domínio de ligação da apoB-100 ao receptor de LDL são responsáveis por aproximadamente 5% dos casos, causam a deficiência familiar de apoB-100 (FDB) (SORIA *et al.*, 1989). Estas alterações diminuem a remoção plasmática de LDL circulante, pois a apoB-100 é responsável pelo reconhecimento pelo receptor (QUINTÃO, *et al.*, 2011).

A PCSK9 é uma enzima, altamente expressa no fígado, intestino e rins é responsável pela regulação pós-transcricional do receptor de LDL, através da ligação ao domínio EGF deste receptor, facilitando a interiorização no compartimento lisossomal, onde este é degradado. O efeito disso é a redução do número de receptores da LDL disponíveis na superfície celular para remover o LDL-c (ABIFAEEL *et al.*, 2012; CORRAL, 2014; LARGO & MILAR, 2010; HORTON; COHEN; HOBBS, 2007; LAMBERT *et al.*, 2009; MOUSAVI; BERGE; LEREN, 2009).

Mutações no gene da *PCSK9* do tipo ganho de função (*gain-of-function*), como p.Ser127Arg, p.Phe216Leu e outras, são causa de cerca de 1% da HF autossômica dominante,

através do aumento da taxa de degradação de receptores de LDL resultando em um aumento expressivo de LDL-c (ABIFADEL *et al.*, 2003; LAMBERT *et al.*, 2009; MOUSAVI; BERGE; LEREN, 2009; WIEGMAN *et al.*, 2015).

Algumas mutações no gene da *PCSK9* também podem causar a perda de função (*loss-of-function*), como as p.Arg46Leu e p.Cys679Ter, reduzindo a degradação de receptores LDL, o que resulta em valores diminuídos de LDL-c e menor risco de doença cardiovascular (COHEN *et al.*, 2006).

Há também as formas autossômicas recessivas de HF que são mais raras (frequência estimada em 1:5 000.000). Uma decorre de mutações no gene que codifica a proteína adaptadora 1 do LDLr (*LDLrAPI*). Esta proteína é responsável pela associação de receptores da LDL com as clatrininas, nas fendas revestidas da membrana de superfície celular. Mutações no gene *LDLrAPI* levam a perda de função da proteína acarretando aumento de LDL-c. Somente os indivíduos homozigotos ou heterozigotos compostos apresentam o fenótipo de HF. Os indivíduos heterozigotos não manifestam HF (BRAUTBAR *et al.*, 2015; SANTOS; MARANHAO, 2014).

A HF é usualmente diagnosticada pela caracterização fenotípica com base na presença de sinais clínicos típicos, mencionados acima, assim como a história familiar de HF. Os sinais clínicos são específicos, mas pouco sensíveis, pois nem sempre estão presentes na forma heterozigótica da doença. Isso dificulta o diagnóstico que é confirmado tardiamente tendo como consequência um pior prognóstico (SANTOS *et al.*, 2012). Embora nos indivíduos HF heterozigotos, o fenótipo seja menos grave (GOLDSTEIN *et al.*, 2001), a triagem em outros membros da família dos afetados é imprescindível especialmente em crianças, antes da manifestação dos sintomas clínicos. Assim, identificar precocemente os indivíduos assintomáticos portadores da doença pode melhorar significativamente seu prognóstico através de intervenções terapêuticas adequadas. Vários estudos indicam que, em indivíduos com hipercolesterolemia não tratados, a mortalidade média de acordo com as idades em anos é 30 anos (20%), 40 anos (50%), 50 anos (60%) e 60 anos (85%) (QUINTÃO *et al.*, 2011).

Com o desenvolvimento tecnológicos resultantes do projeto Genoma humano, e o fato dessa doença ser responsável por mortalidade elevada, surgiram projetos que recomendam a investigação genética populacional. O critério do *Dutch Lipid Clinic Network Make Early Diagnosis to Prevent Early Death* (Dutch MEDPED) escolhido e adaptado pela diretriz brasileira, inclui além das características clínicas já citadas a análise de mutações nos genes do *LDLr*, *APOB* e *PCSK9* (SANTOS *et al.*, 2012).

1.2.1.1 Gene do Receptor da LDL (*LDLr*)

O gene *LDLr* está localizado no braço curto do cromossomo 19 (19p13.2 – 19p13.3), compreende 18 éxons e 17 íntrons. Esse gene é majoritariamente expresso no fígado, embora também seja expresso em células do tecido periférico. A proteína é inicialmente sintetizada sob a forma de um precursor com um peso molecular aparente de 120 kDa, que posteriormente migra para o aparelho de Golgi onde sofre glicosilação extensa, atingindo a forma madura com 160 kDa. Contém sequências reguladoras em *cis* que atuam no controle da expressão do gene. Entre os 200 pares de bases (pb) que antecedem o *codon* de iniciação da tradução encontram-se três repetições diretas imperfeitas, sendo que, duas destas repetições interagem com o fator de transcrição Sp1 para promover a transcrição e a outra repetição, contém um local de regulação condicional positiva por esteróis (SER, *sterol regulatory element*); as TATA boxes e um grupamento (*cluster*) de locais de iniciação do RNA mensageiro (mRNA). A tradução do mRNA do *LDLr* resulta um polipeptídeo com 860 aminoácidos, após a remoção do peptídeo sinal durante sua translocação para o retículo endoplasmático segue para o complexo de Golgi até ser transportada para a membrana plasmática como proteína madura de 839 aminoácidos (WERUTSKY, 2006; DA SILVA, 2007; COELHO, 2012; VASCONCELOS, 2015).

É constituído por cinco domínios estruturais funcionalmente distintos distribuídos entre os seus éxons, com exceção do éxon 1 que codifica a região 5' UTR, o peptídeo sinal, com 21 aminoácidos hidrofóbicos (DA SILVA, 2007; VASCONCELOS, 2015).

O primeiro domínio é o amino-terminal (N-terminal), localizado entre os exons 2 ao 6, constituído por 292 aminoácidos com sete sequências repetitivas, com seis resíduos de cisteína. Nesse domínio cadeias laterais de aminoácidos carregados negativamente, que interagem com um domínio positivamente carregado da apoB-100 ou com a ApoE (WERUTSKY, 2006; DA SILVA, 2007; COELHO, 2012; VASCONCELOS, 2015).

O segundo domínio possui 35% de homologia com o gene precursor do fator de crescimento epidermal (EGF). Compreende os éxons 7 ao 14 e é composto por cerca de 400 aminoácidos, possui três repetições, A, B e C ricas em cisteína, intercalados por uma sequência que contém o motivo conservado Tyr-Trp-Thr-Asp (YWTD). Esse domínio é essencial para posicionar o LDLr na superfície de modo a ligar-se ao ligante e para a dissociação das lipoproteínas do receptor nos endossomos, tendo importante participação na reciclagem do receptor (WERUTSKY, 2006; DA SILVA, 2007; COELHO, 2012; VASCONCELOS, 2015). O terceiro domínio possui função pouco conhecida, acredita-se que contribui com o domínio de ligação da apoB-100 mantendo adequadamente posicionada para o acesso desta proteína. É codificado no éxon 15, formado 58 aminoácidos, constituído por serinas e treonina cadeias ricas em açúcares glicosilados (WERUTSKY, 2006; DA SILVA, 2007; VASCONCELOS, 2015).

O quarto domínio corresponde a região transmembrana, sendo formada por 22 aminoácidos hidrofóbicos, codificados no éxon 16 e na extremidade 5' do éxon 17, que

atravessam a membrana plasmática e são responsáveis pela fixação a seu receptor (DA SILVA, 2007; COELHO, 2012; VASCONCELOS, 2015).

O quinto domínio é importante para a localização do receptor nas vesículas de clatrina e para endocitose do receptor através de um motivo conservado, Asp-Pro-Val-Tyr (NPVY) contido nessa cauda citoplasmática. Situa-se na continuação do éxon 17 e região 5' do éxon 18, codificam 50 aminoácidos (**figura 2**)(WERUTSKY, 2006; DA SILVA, 2007; COELHO, 2012; VASCONCELOS, 2015).

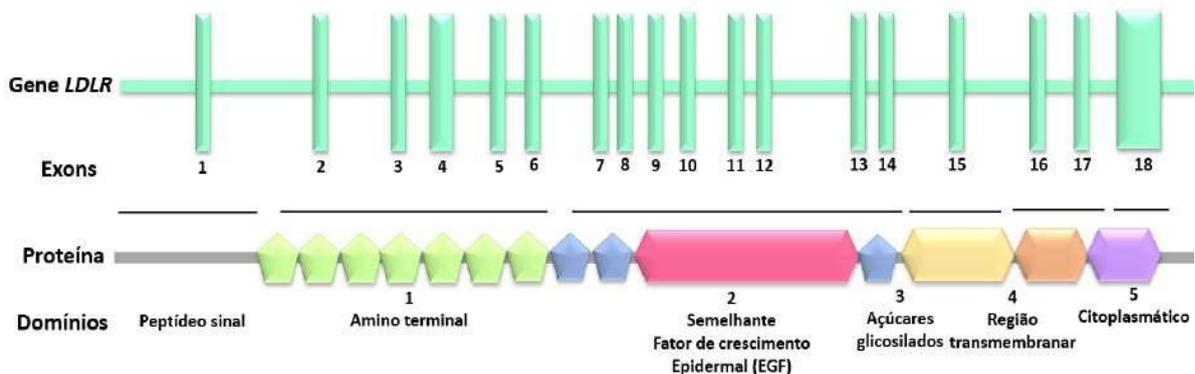


Figura 2 Representação esquemática do LDLr com seus 5 domínios. Fonte: próprio autor.

Mutações nesse gene são responsáveis por cerca de 79% dos casos de HF, tendo maior prevalência no continente europeu. As primeiras mutações relacionadas foram identificadas no gene *LDLr* pelos pesquisadores Goldstein e Brown. Eles detectaram que a ausência total ou parcial de LDLr era responsável pela fisiopatologia dessa doença. Desde essa data, esse gene tem sido alvo de vários estudos (CHORA *et al.*, 2017; BROWN; GOLDSTEIN, 1974; GOLDSTEIN; BROWN, 1974; WIEGMAN *et al.*, 2015).

De acordo com a base de dados *Leiden Open Source Variation Database* (LOVD) existem 1.707 variantes no *LDLR* e segundo outra base de dados responsável pela depósito de variantes neste gene, o ClinVar, recurso financiado pelo NCBI que inclui uma infinidade de recursos interconectados para auxiliar na interpretação de variantes informando a possível significância clínica. Segundo o depósito dessa base de dados existem 1.614 (70,2%) patogênica/ possivelmente patogênica, 200 (8,7%) benigna/possivelmente benigna, 182 (7,9%) significância incerta, 303 (13,2%) conflito de informações e 15 sem informações fornecidas. De acordo com o depósito de variantes no gene *LDLR* no ClinVar, em 13 países, o maior número de variantes é proveniente do continente europeu, com principal contribuição do Reino Unido (1670). Embora Brasil não esteja entre os principais, o Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração (InCor) foi responsável pelo depósito de 201 variantes, conforme **figura 3**.

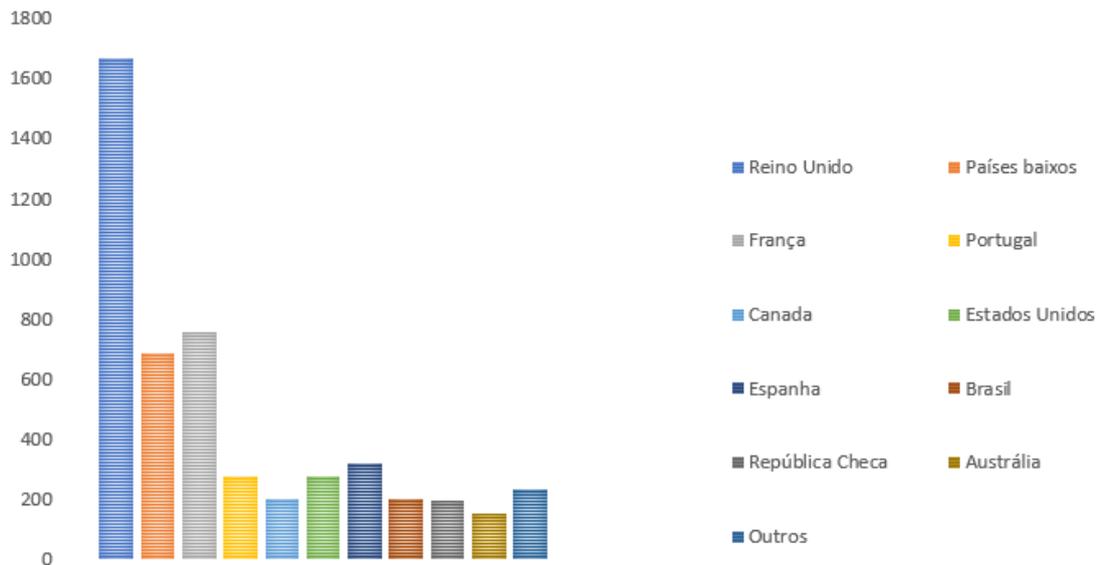


Figura 3 Depósito de variantes no *ClinVar* de acordo com país. Adaptado IACOCCA, *et al.*, 2018.

As mutações neste gene podem ser agrupadas em 5 classes (CHOUMERIANOU; DEDOUSSIS, 2005; SCHAEFER *et al.*, 2012): (i) Classe I: são as mais comuns, tais como grandes deleções, mutações nas regiões promotora, 5' não traduzida (5'UTR) e codificadora do gene que resultam em uma proteína de LDLr não detectável; (ii) Classe II: causa um bloqueio parcial ou completo do transporte do LDLr do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi; (iii) Classe III: afetam o domínio de ligação do receptor às partículas de LDL, os receptores atingem a membrana citoplasmática, mas não se ligam ou ligam-se parcialmente; (iv) Classe IV: defeito na interiorização da cavidade revestida por clatrina, de forma que o complexo receptor/LDL não se difundem no endossomo; (v) Classe V: impedem a dissociação do complexo LDL- receptor sendo degradado junto com a molécula de LDL no endossomo, causando prejuízo na reciclagem do receptor para a superfície celular, essas últimas são as formas menos graves de hipercolesterolemia pelo fato de um certo número de receptores ainda se encontrar ao longo de toda a superfície celular (**figura 4**) (VASCONCELOS, 2015; WERUTSKY, 2006).

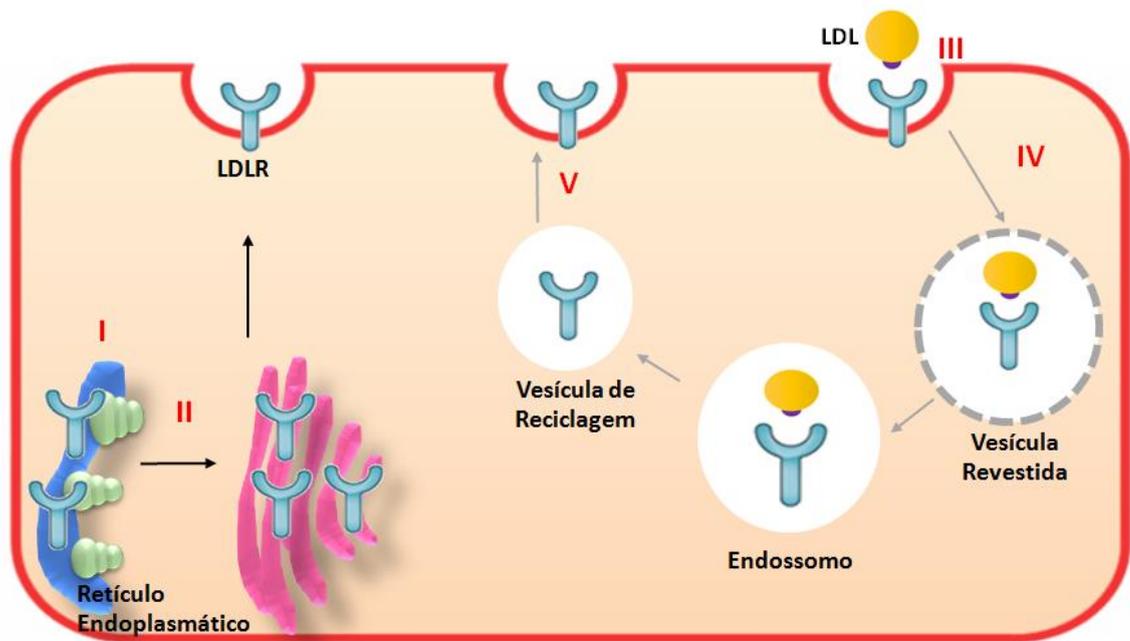


Figura 4 Representação das classes de mutações no LDLr. Fonte: próprio autor.

A concentração do LDL-c plasmática, apesar de ser um fator independente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares são de especial importância naqueles pacientes com as mutações de classe I (ALONSO *et al.*, 2014) causadoras de fenótipos mais severos clinicamente. A mesma associação entre as diferentes mutações com doenças cardiovasculares e resposta a estatina foi confirmada em uma população brasileira com HF heterozigótica (SANTOS, *et al.*, 2012).

A frequência de diferentes mutações neste gene, varia no mundo, e podem ser comuns a várias etnias. No Brasil, devido ao grau de miscigenação, a população é constituída por vários grupos étnicos causando a heterogenicidade (VASCONCELOS, 2015; WERUTSKY, 2006).

As principais alterações no *LDLr* são as mutações de grandes rearranjos cromossômicos (9%), mutações sem sentido (*nonsense*, 9%), mutações por deslocamento (*frameshift*, 18%), mutações na região de processamento de RNA (*splicing*, 9%) e mutação de sentido trocado (*missense*, 46%) (CHORA *et al.*, 2017).

Aproximadamente, 36 variantes foram descritas na região 5'UTR e promotora do gene *LDLr*, muitas das quais têm demonstrado alterar a ligação de fatores de transcrição importantes envolvidos no controle da expressão de *LDLr* (LIU *et al.*, 2000; NATESAMPILLAI *et al.*, 2006). Dessas, três, estão descritas na literatura em pacientes com diagnóstico de HF, na região promotora (c.-101T>C, c.-121T>C e c.-215A>G) (USIFO *et al.*, 2012

1.3 SEQUENCIAMENTO DE NOVA DE GERAÇÃO

As novas tecnologias de sequenciamento, denominadas de tecnologias de sequenciamento de nova geração *Next Generation Sequencing* (NGS), promovem o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida, sendo uma alternativa poderosa para estudos de genômica estrutural e funcional (CARVALHO; SILVA, 2010; MARDIS, 2013).

Essa tecnologia tem permitido a descoberta de novas alterações genéticas, além da detecção de diversas regiões em um único procedimento, o que facilita a caracterização das doenças ocasionadas por alterações em vários genes, como é o caso da HF que pode ser causada pela mutação nos genes *LDLr*, *APOB* e *PCSK9* (CARVALHO; SILVA, 2010).

Contudo, a descoberta de novas mutações relacionada a essa doença gera muitos questionamentos, pois embora essa técnica possibilite um conhecimento amplo em um curto período de tempo, esse sistema não é capaz de prever a malignidade dessas mutações, surgindo a necessidade de validá-las através do estudo de análise funcional, utilizando culturas celulares por exemplo (CARVALHO; SILVA, 2010).

1.4 FERRAMENTAS DE PREDIÇÃO *IN SILICO*

Existem diversas ferramentas de bioinformática (*in silico*) que avaliam as substituições de aminoácidos na estrutura e/ou função da proteína e as consequências dessas modificações, classificando-as em; benignas, neutras, de baixo impacto ou tolerada, isso quando a troca não altera a estrutura e/ou função, porém, quando pode alterar são categorizadas como; alterações possivelmente danosas, de médio ou alto impacto e deletérias. É importante ressaltar que tais classificações são referentes a proteína e não implica na possível patogenicidade da variante (RIBEIRO, 2010; BARBOSA, 2013).

A ferramenta *CONsensus DELeiteriousness score (CONDEL)* avalia a probabilidade de um conjunto de variantes *missense* ser deletéria. Esta ferramenta pode fornecer algumas informações importantes sobre o impacto da mutação na atividade biológica das proteínas através de uma abordagem ponderada de mutações a partir das distribuições cumulativas complementares de escores de mutações deletérias e neutras. Valores próximos de 0 são preditores de variantes neutras e próximos de 1 de variantes deletérias (RIBEIRO, 2010; BARBOSA, 2013; ALENCAR, 2010).

O algoritmo *Sorts Intolerant From Tolerant substitutions (SIFT)* realiza alinhamentos da sequência da proteína de interesse com substituições de resíduos de aminoácidos. Para isso, utiliza-se a sequência proteica de referência e realiza múltiplos alinhamentos com outras sequências similares. Em seguida, o algoritmo utiliza as sequências resultantes desta primeira

busca que obtiveram um *score* de similaridade acima do limite de 90% para criar uma matriz de valores posição-específica baseada neste alinhamento. Esta matriz fornece *score* mais alto para regiões conservadas e mais baixo para as regiões pouco conservadas. Dessa forma, as substituições que apresentam um valor de tolerância menor do que 0,05 são preditas intolerantes ou deletérias, enquanto aquelas que apresentam um valor maior do que 0,05 são preditas tolerantes. Em estudos em que o programa foi utilizado para analisar SNPs presentes em genes associados a doenças humanas, foi demonstrado uma precisão de predição entre 65 e 92% (ALENCAR, 2010).

O *Polymorphism Phenotyping (Polyphen)* assim como o *SIFT* avalia o impacto funcional e estrutural das substituições. As predições são realizadas através de três bases de dados que indicam alta confiabilidade na predição: *SwissProt* inserir a sequência obtida no banco de dados; *BLAST* para o alinhamento múltiplo de sequências e informações estruturais. O primeiro passo nesse algoritmo é a busca e o alinhamento múltiplo de sequências homólogas usando a ferramenta *BLAST*. Em seguida, o alinhamento múltiplo resultante é usado pelo *software PSIC (Position-Specific Independent Counts)* para calcular uma matriz. Esses elementos são razões logarítmicas entre a probabilidade de um dado resíduo de aminoácido ocorrer em uma posição específica e a probabilidade deste resíduo de aminoácido ocorrer em qualquer posição da proteína, após essa etapa, é calculado o valor absoluto da diferença entre os perfis dos resíduos de aminoácidos variantes na posição de interesse. Valores altos podem indicar que a substituição é raramente (ou nunca) observada. A precisão de predição do programa foi avaliada em 80%. Valores altos indicam maior probabilidade da mutação ter característica deletéria (RIBEIRO, 2010; BARBOSA, 2013; ALENCAR, 2010).

1.5 DOCKING MOLECULAR

Proteínas e ácidos nucleicos são os dois tipos mais importantes de macromoléculas na célula. Com o avanço da genômica e proteômica a compreensão dos processos biológicos envolvidos em nível molecular amplia o conhecimento sobre a fisiologia e possibilita o desenvolvimento de intervenções terapêuticas ou medicamentos direcionados às interações, como por exemplo; investigações dos modos de ligação da proteína ao ligante e os correspondentes padrões intermoleculares de interações que estabilizam o complexo ligante-receptor e como as substituições de alguns aminoácidos devido às mutações no DNA podem alterar o funcionamento (BARBOSA, 2013; ALENCAR, 2010).

Uma troca de aminoácido em uma interface, em um sítio de ligação, pode afetar a ligação entre moléculas, seja pela inserção de uma cadeia volumosa, que pode resultar no bloqueio do sítio ativo, alterar a especificidade, podendo aumentar o diminuir a afinidade (BARBOSA, 2013; ALENCAR, 2010).

Dado ao alto custo e as dificuldades de métodos experimentais, o *docking* molecular, auxilia nesse processo, pois prevê através de ferramentas computacionais com um grau substancial de precisão, a conformação de ligantes dentro do local de ligação ao alvo apropriado (BARBOSA, 2013; ALENCAR, 2010).

O *docking* molecular realiza a busca conformacional através do posicionamento de duas estruturas individuais mediante a simulações possíveis, modos de ligação de uma estrutura relacionada à outra em várias orientações no sítio ativo do receptor, fornecendo classificações e pontuando de forma recursiva até convergir para uma solução de energia mínima. Durante a simulação, são realizadas pequenas modificações na translação do centro de gravidade, orientação, e rotação ao redor de cada um dos ângulos internos flexíveis e a cada modificação resulta em uma nova configuração onde a energia despendida nesse processo é avaliada sendo comparada ao valor obtido no passo anterior, aceitando a configuração onde a energia possui o menor valor, dessa forma, é possível estabelecer uma classificação entre os compostos de maior e de menor afinidade a um determinado receptor (BARBOSA, 2013; ALENCAR, 2010).

1.6 ESTUDO FUNCIONAL DAS VARIANTES ASSOCIADAS COM HF

Em um estudo de 2006, Cameron e colaboradores estudaram o efeito de duas mutações de ganho de função (p.Ser127Arg e p.Asp374Tyr) no gene *PCSK9* em células HepG2 transfectadas, ambas diminuíram em 23% as concentrações de LDLr na superfície celular o que levou a redução de 38% da interiorização do LDL. Outras quatro mutações foram relacionadas com a perda de função (p.Arg46Leu, p.Gly106Arg, p.Asn157Lys e p.Arg237Trp) aumentando a concentração de LDLr na superfície celular em 16% e a interiorização do LDL em 35% (CAMERON *et al.*, 2006). Outras duas mutações foram posteriormente associadas com ganho de função (p.Leu108Arg e p.Asp35Tyr) (ABIFADEL *et al.*, 2012).

Ettxebarria e colaboradores, avaliaram as mutações no *LDLr*, na população espanhola em portadores de HF, e observaram duas variantes como causadoras de HF (p.Glu288Lys e p.Ala299Thr) (ETTXEBARRIA *et al.*, 2012). Um estudo em Portugal, avaliou a patogenicidade de 6 mutações *missense* no *LDLr*, através da mutagênese dirigida, utilizando células CHO-ldlA7, sem expressão endógena do *LDLr*. As células que expressavam as construções p.Trp469Arg e p.Val408Leu apresentaram expressões muito baixas de atividade do *LDLr* e expressão de proteína à superfície foram igualmente reduzidos. A variante p.Gly248Arg apresentou em torno de 40% da atividade normal do receptor das LDL e expressões normais de proteína à superfície. As variantes p.Ser627Pro e p.Pro664Ser mostraram reter respectivamente 40% e 60% de atividade, e a variante p.Val838Met mostrou uma atividade comparável à do *LDLr* normal, sugerindo que essa alteração é uma variante silenciosa, enquanto as outras 5

serão mutações causadora de HF (DA SILVA, 2007).

Recentemente, em 2014, Khamis e colaboradores estudaram a funcionalidade de quatro novas variantes na região 5'UTR do gene *LDLr*. Os ensaios funcionais realizados sugeriram que as variantes c.-101T4C e c.-121T4C são patogênicas, enquanto a variante c.-13A4G é benigna, e o *status* da c.-215A4G ainda não foi elucidado (KHAMIS *et al.*, 2015).

Em 2012, Motazacker e colaboradores, descobriram através de um estudo de sequenciamento, em duas famílias não relacionadas, novas alterações no gene da *APOB*. Os ensaios *in vitro* em HepG2 mostram uma redução de 28-49% em ensaios de captação de LDL em pacientes portadores de alterações heterozigotas no resíduo Arg3059 e Lys3394 (MOTAZACKER *et al.*, 2012).

No ano seguinte, um estudo semelhante sequenciou a região codificadora da *APOB* por pirosequenciamento em 65 pacientes diagnosticados com HF e avaliou a patogenicidade das variantes identificadas através do ensaio de ligação e interiorização de LDL utilizando linfócitos e hepatócitos semelhante às células HepG2. O ensaio mostrou que a mutação p.Arg1164Thr interiorizou 40% menos de LDL do que o controle. A variante p.Gln4494del, quando comparado com o controle normal apresentou uma diminuição de 44% na interiorização de LDL. Os mesmos resultados foram observados no ensaio com as células HepG2 e foram condizentes com os fenótipos dos pacientes (ALVES *et al.*, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

Um melhor conhecimento das causas genéticas da HF e da correlação entre o genótipo/fenótipo, permitirá a identificação prévia de pacientes que apresentam o risco mais elevado de desenvolver DCV, permitindo um acompanhamento clínico e terapêutico mais eficiente, além de contribuir para o desenvolvimento de metodologias mais sensíveis, específicas e reprodutíveis (SILVA *et al.*, 2012).

Avaliar a relação das diferentes variantes encontradas por ultrasequenciamento em amostras DNA de pacientes com HF é de grande importância para compreender os mecanismos pelos quais as variações genéticas influenciam na concentração de colesterol e consequentemente o processo patológico desta doença (FORTI *et al.*, 2003; DA SILVA *et al.*, 2012).

Com o advento das novas plataformas de sequenciamento, nos últimos anos houve um crescente avanço na geração de dados genômicos e proteômicos. No entanto, a enorme quantidade de dados atualmente disponíveis requer o auxílio de métodos que possibilitem a análise do significado biológico dessas alterações, principalmente em relação às novas mutações (RIBEIRO, 2010; BARBOSA, 2013; ALENCAR, 2010).

Um dos maiores desafios em estudos de associação tem sido identificar variantes funcionais de forma eficiente. No entanto, a disponibilidade atual de sequências e estruturas proteicas em banco de dados biológicos públicos, como o *PDB - Protein Data Bank* que contém estruturas de proteínas experimentais de complexos receptor e ligante, permite o uso de ferramentas computacionais para a avaliação preliminar das características estruturais, interações moleculares, propriedades dinâmicas e outros aspectos relevantes ao estudo do impacto causado pela substituição de resíduos de aminoácidos nas proteínas (RIBEIRO, 2010; ALENCAR, 2010).

A correta modelagem molecular das conformações das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos é importante para se compreender vários aspectos da estrutura e função proteica, como a interação com outras moléculas e a estabilidade termodinâmica e dessa forma, priorizar as mutações para estudos de validação experimental de forma rápida e econômica para estabelecer a relação genótipo-fenótipo, as implicações clínicas dessas alterações (CAMERON *et al.*, 2006; CAMERON *et al.*, 2009; ABIFADEL *et al.*, 2012).

Pesquisas vêm sendo conduzidas para compreender os efeitos funcionais de variantes encontradas nos genes *LDLr*, *APOB* e *PCSK9*. Para isso são utilizadas várias estratégias, tais como: (i) estudos de mutagênese sítio dirigida das variantes encontradas no sequenciamento;

(ii) estudos de captação de LDL natural e oxidada, em cultura primária de monócitos; e (iii) estudos de ligação e interiorização de LDL, em cultura primária de linfócitos (DA SILVA, 2007; ETXEBARRIA *et al.*, 2012; ALVES, *et al.*, 2014; KHAMIS *et al.*, 2015)

Outro estudo que está sendo conduzido pelo nosso grupo, intitulado “Ultrassequenciamento exômico dos principais genes relacionados com a hipercolesterolemia familiar”, busca encontrar novas mutações associadas à HF através do sequenciamento de éxons utilizando plataformas NGS. Uma vez obtidas as informações desse sequenciamento, o presente estudo visa realizar a análise funcional das mutações correlacionando-as com os dados clínicos, resultados *in vitro*, *in silico* e estrutural para avaliar a patogenicidade das alterações encontradas no gene *LDLr* em pacientes portadores de HF, através de cultura primária de linfócitos obtidos a partir do sangue periférico.

Este estudo fornecerá dados preliminares que poderão ser utilizados para auxiliar na predição do impacto causado por mutações no *LDLr* e também na escolha de polimorfismo para estudos experimentais sobre possíveis associações com a Hipercolesterolemia Familiar.

3 OBJETIVOS

Realizar a análise funcional das mutações, identificadas através do sequenciamento de alto rendimento, no gene LDLR.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar a análise da atividade do receptor da LDL pela cultura primária de linfócitos oriundos de portadores de HF com diferentes padrões fenotípicos da doença.
- ✓ Estabelecer a relação entre o perfil de mutações e de captação de LDL em portadores de HF com diferentes padrões fenotípicos da doença.
- ✓ Associar os resultados com: dados clínicos, *in vitro*, *in silico* e estrutural.

4 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA BIOLÓGICAS

As amostras biológicas do presente estudo são provenientes do projeto “Ultrassequenciamento exômico dos principais genes relacionados com a hipercolesterolemia familiar” que está sendo executado pela Doutoranda Jéssica Bassani Borges sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dantes Pazzanese de cardiologia (IDPC). Foram incluídos pacientes de acordo com a I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar **tabela 1**. Indivíduos com insuficiência hepática, insuficiência renal (clearance de creatinina <30ml/min) e/ou síndrome nefrótica, neoplasias clinicamente não controladas, com sorologia positiva para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), hipotireoidismo não controlado e doença de Cushing não foram incluídos no presente estudo.

Tabela 1 Critérios diagnósticos da HF baseado nos critérios da Dutch MEDPED e adaptado da atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção de aterosclerose.

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

Xantoma tendinoso	6
Arco corneano < 45 anos	4
Concentração de LDL-c	
≥ 330 mg/dl	8
250 - 329 mg/dL	5
190 - 249 mg/dL	3
155 - 189 mg/dL	1
Diagnóstico de HF	
Certeza se	>8 pontos
Provável se	6-8 pontos
Possível se	3-5 pontos

Fonte: Retirado e adaptado da atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção de aterosclerose (FALUDI *et al.*, 2017).

4.2 SEPARAÇÃO E CULTURA DE LINFÓCITOS T

Devido à inviabilidade da cultura celular de células hepáticas do próprio paciente, e fundamentando-se em alguns estudos (DA SILVA, 2007; ETXEBARRIA *et al.*, 2012; ALVES, *et al.*, 2014; KHAMIS *et al.*, 2015; WIJERS *et al.*, 2015) que utilizam a cultura primária de linfócitos, pelo fato de fácil obtenção e essas células expressarem genes responsáveis pelo fenótipo da doença e por essa razão, este modelo foi adotado para realizar este estudo. De cada indivíduo foi coletado 16 mL de sangue periférico em 4 tubos contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracetato de potássio (EDTA-K), para a obtenção de linfócitos. Para isso, utilizou-se o reagente de gradiente de densidade Ficoll-Paque (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Em um tubo cônico de 15 mL foram adicionados 3 mL de Ficoll-Paque e em seguida, cuidadosamente, 6 mL de sangue diluído em solução tampão fosfato (PBS) na proporção de 1:2. Após essa etapa, foi realizada a centrifugação a 400 X g por 30 minutos à temperatura ambiente. Esta centrifugação proporciona a separação dos componentes celulares, onde na parte superior permanece o plasma, na interface as células mononucleares seguida do Ficoll-Paque, e por fim os eritrócitos e granulócitos sedimentam no fundo do tubo. Com uma pipeta Pasteur foram coletadas as células mononucleares através da aspiração do anel de células

presentes na interface e transferidas para o tubo cônico de 50 mL. Posteriormente, as células foram diluídas em PBS. Após a diluição, a suspensão foi centrifugada duas vezes a 400 X g por 10 minutos a 37°C. O sedimento final foi ressuspenso em 1 mL de PBS. Para a obtenção dos linfócitos, as células mononucleares foram incubadas em ambiente estéril em um frasco de cultura com área de 75 cm² contendo meio de cultura RPMI – 1640, enriquecido com glutamina 2 nM, tamponado com bicarbonato de sódio 24 nM, HEPES 20 nM, 10% de soro fetal bovino (FBS) e antibiótico (1000 U/mL de penicilina e 1000 µg/mL de estreptomicina). As células mononucleares foram incubadas em cultura por 1 hora, a 37°C / 95% ar atmosférico / 5 % CO₂. Os monócitos aderiram à garrafa e os linfócitos permaneceram no sobrenadante. Os linfócitos obtidos como descrito acima, foram centrifugados a 400 g por 10 minutos e após, desprezado o sobrenadante. As células foram ressuspenso em PBS. Após, foi retirada uma alíquota para contagem de células em câmara de Neubauer. As células foram armazenadas em -80°C com FBS 90% e dimetilsulfóxido (DMSO) 10% até o momento da sua utilização.

4.3 CULTURA PRIMÁRIA DE LINFÓCITOS T HUMANOS

Antes de utilizadas, as células passaram por duas etapas de lavagem em soro fetal bovino e em seguida, mantidos em meio RPMI – 1640, enriquecido com glutamina 2 nM, tamponado com bicarbonato de sódio 24 nM, HEPES 20 nM, 10% de FBS e antibiótico (1000 U/mL de penicilina e 1000 µg/mL de estreptomicina), em um frasco de cultura com área de 75 cm², foram mantidas em cultura por 4 horas, a 37°C / 95% ar atmosférico / 5 % CO₂. Após essa etapa, as células foram mantidas em cultura em placa de 96 poços, pelo período necessário para ativação dos linfócitos T, de 72 horas (TADA et al., 2009), em meio RPMI – 1640, enriquecido com glutamina 2 nM, tamponado com bicarbonato de sódio 24 nM, HEPES 20 nM, antibiótico (1000 U/mL de penicilina e 1000 µg/mL de estreptomicina, 10% de soro deficiente de lipoproteínas (LDPS; Sigma-Aldrich Steinheim, Alemanha), com a finalidade de aumentar a expressão dos receptores na superfície dos linfócitos e 2 µl de beads magnéticas anti-CD3/CD28 (DynaL Biotech, Oslo, Noruega), estas, mimetizam a ativação de linfócitos T in vivo, por células apresentadoras de antígenos, através dos sinais CD3 e CD28 (TADA et al., 2009).

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE E EXPRESSÃO DE LDLr PELA CITOMETRIA DE FLUXO

As células foram recuperadas, lavadas duas vezes em PBS contendo 1% de albumina de soro bovino (PBS-BSA a 1%), e incubadas durante 4 horas com 10 µg/mL de BODIPY® FL

LDL (Life Technologies, Forest City, USA), está lipoproteína comercial, cujo BODIPY® FL é complexado aos domínios hidrofóbicos da LDL. Para determinar a sua atividade, que corresponde à LDL tanto interiorizado e complexos LDLr-LDL extracelular, a amostra foi incubada a 4°C, para avaliar a ligação da LDL ao seu receptor, e a 37°C, e para determinar a quantidade de LDL ligado ao receptor e interiorizado (ETXE BARRIA et al.,2012). Após a incubação com BODIPY® FL LDL (Life Technologies, Forest City, USA) foi adicionado o reagente de viabilidade, BD *Horizon™ Fixability Viability Stain 620*, conforme protocolo do fabricante. Este corante reage e se liga covalentemente a amins intracelulares e à superfície celular de células plasmáticas permeáveis, permite a difusão intracelular e a ligação covalente em quantidade superior às células vivas com membranas plasmáticas impermeáveis. Após essa etapa, os linfócitos foram lavados duas vezes em PBS- BSA a 1%, fixados em paraformaldeído 4% durante 10 minutos, e lavados mais duas vezes com PBS-BSA a 1%. Para avaliar a atividade do LDLr, foi mensurado as intensidades de fluorescência total de BODIPY® FL LDL, correspondendo à LDL tanto internalizado e complexos LDLr-LDL extracelular. Para avaliar a expressão, os linfócitos (2×10^5 células/mL) cultivados por 72 horas foram, ressuspensos em PBS-BSA a 1% e lavados duas vezes. As células foram incubadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-LDLr conjugado com Alexa Fluor 647 (1: 100; 2,5 mg / l; Santa Cruz, Biotechnology) durante 30 minutos à temperatura ambiente, lavadas duas vezes com PBS-BSA a 1%. A intensidade de fluorescência foi medida em um Citômetro de Fluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences) localizado no ICAFE Instituto de Ciências da Atividade Física e Esporte da Universidade Cruzeiro do Sul, sob supervisão da Prof. Dra. Renata Gorjão. Os linfócitos T estimulados foram separados dos não estimuladas de acordo com as áreas de análise de citometria de fluxo, com aquisição de 10.000 eventos por amostra. O filtros utilizados foram FL1 (BODIPY FL LDL – excitação máxima: 515 nm / emissão máxima: 520 nm); FL2 (PE – excitação máxima: 496 nm / emissão máxima: 578 nm); FL3 (*Horizon™ Fixability Viability Stain 620* – excitação máxima: 523 nm / emissão máxima: 617 nm) e FL4 (Alexa Fluor 647– excitação máxima: 650 nm / emissão máxima: 665 nm). Os histogramas foram analisados através do “BD-C6 Sampler Software” (Becton Dickinson).

4.5 MICROSCOPIA CONFOCAL POR VARREDURA A LASER

Microscopia confocal por varredura a laser foi utilizada para visualizar a ligação e interiorização da LDL e expressão na superfície celular de LDLr. Para a realização desta etapa, antes da aquisição dos resultados no citômetro de fluxo, foi retirada uma alíquota de 10 µL de

células, que foram plaqueadas em lâminas de vidro revestidas com polilisina (Sigma-Aldrich Steinheim, Alemanha), juntamente com meio de montagem Fluoroshield™ (Sigma-Aldrich Steinheim, Alemanha), para preservar a fluorescência das células, após foi adicionado uma lamínula. Para obtenção de dados da população celular, foram adquiridos 8 planos aleatórios de cada amostra. As amostras foram visualizadas utilizando o microscópio Confocal Zeiss LSM 780-NLO localizado no Lab.Confocal e Citometria de Fluxo da Escola Paulista de Medicina-UNIFESP, sendo a Professora Doutora Helena Bonciani Nader responsável pelo setor que permitiu a utilização.

4.6 DOCKING MOLECULAR

A estrutura 3D das proteínas LDLr e ApoB consideradas para este estudo e a configuração de aminoácidos foi baseada em relatos prévios descritos na literatura (THOMPSON & BONASZAK, 2002; RUDENKO *et al.*, 2002). As estruturas cristalinas do complexo foram derivadas do RCSB Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) 1LSH (ApoB) e 1N7D (LDLr). Antes da ancoragem, as moléculas ligantes de água foram removidas e os átomos de hidrogênio foram adicionados na geometria padrão usando o módulo Biopolímero implementado na plataforma SYBYL 2.1. O docking foi realizado usando o programa HDOCK, com o auxílio do doutorando Glaucio Monteiro Ferreira Banco (PAIVA *et al.*, 2017). As variantes *missense* selecionadas foram: p.Gly373Asp, p. Ile488Thr, p.Gly592Glu, p.Gly549Asp, p.Asp601His, p.Cys184Tyr.

4.7 ANÁLISES IN SILICO

Os efeitos previstos das alterações do LDLr foram avaliados usando os seguintes *software* de acesso aberto: PolyPhen-2, SIFT e CONDEL. O programa *PolyPhen-2* da previsões de provavelmente prejudicial, possivelmente prejudicial ou benigna, já os programas SIFT e CONDEL prevêm se uma substituição de aminoácidos é deletéria ou neutra (ETXEBARRIA *et al.*, 2012).

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram analisados através dos softwares SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) e GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Antes de efetuar os testes de comparações das variáveis quantitativas, foi avaliado se os parâmetros

seguiam uma distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis devido tamanho da amostra ($n=30$). As correlações foram avaliadas através do coeficiente de correlação de Spearman. O nível de significância adotado para as análises foi de $p<0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a aprovação dos comitês de ética em pesquisa, parecer 4398, foi possível reconvocar os pacientes nos quais foram realizados o sequenciamento “Ultrassequenciamento exômico dos principais genes relacionados com a hipercolesterolemia familiar”, dos 64 pacientes incluídos nesse projeto, sendo 43 casos index, 15 familiares e 6 exclusões, foram selecionados 40 pacientes para realizar os testes funcionais, contudo foi possível incluir 30 pacientes. Os dados biodemográficos desses pacientes são demonstrados a **tabela 2**.

Tabela 2 Dados biodemográficos dos 30 pacientes selecionados para estudo.

Dados biodemográficos		$\bar{x} \pm DP$
Idade		20,2 ± 25,6 anos
Gênero:	Mulheres	67%
	Homens	33%
Etnia:	Caucasianos	70%
	Pardos	17%
	Negros	13%
IAM		27%
DAP		30%
DAC		50%
HAS		50%
Uso de hipolipemiantes		80%
Parâmetros laboratoriais:	CT	248,6 ± 66,7mg/dl
	LDL	166,3±64,3mg/dl
	HDL	48,9±12,5mg/dl
	VLDL	27,9±14,3mg/dl
	TG	161,0±130,2mg/dl
Sinais clínicos:	Xantomas	33%
	Xantelasmas	30%
	Arco córneo	20%
	Espessamento dos tendões	7%
Critério HF:	Certeza	40%
	Possível	17%
	Provável	13%

Legenda: HF – Hipercolesterolemia Familiar; DAC - Doença Arterial Coronariana; IAM – Infarto Agudo do Miocárdio, DAP – Doença Arterial Periférica

Em 19 pacientes foram encontradas variantes no gene *LDLR*, sendo elas: sete variantes do tipo *missense*, duas *stop gained*, sete em região *3'UTR*, e uma em região de *splice*. Nos outros 11 não foram identificadas variantes no gene de estudo, conforme esquema abaixo.

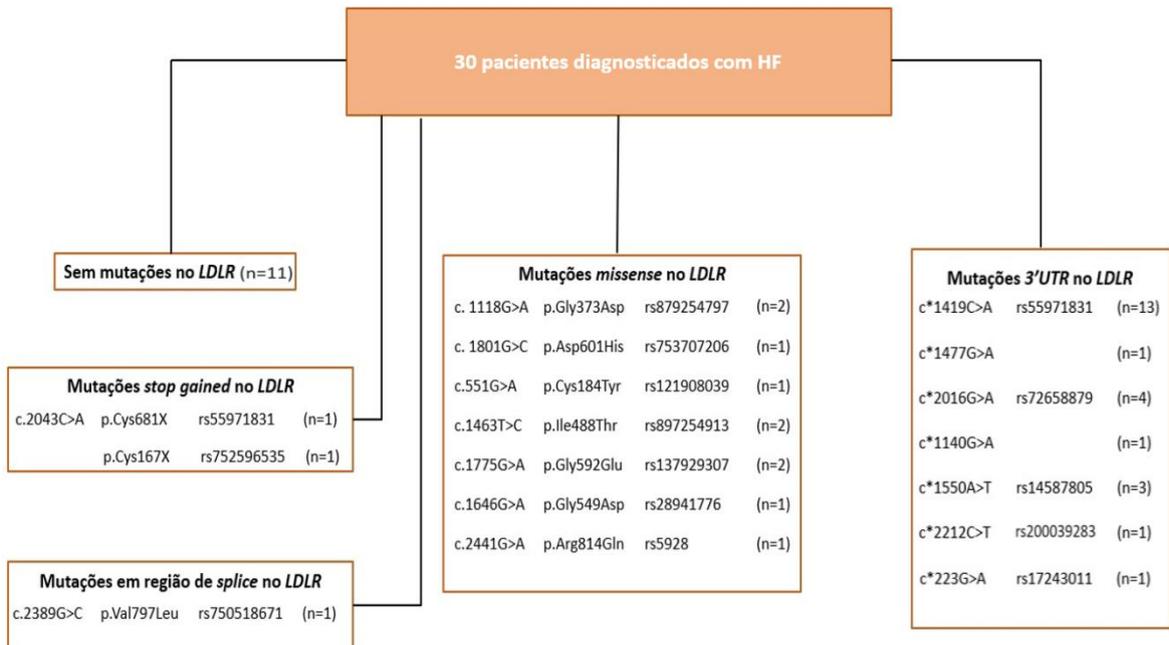


Figura 5 Representação esquemática das mutações encontradas nos 30 pacientes.

A porcentagem entre os pacientes com mutação no *LDLR* foi de 63%, embora alguns estudos evidenciem que a mutação neste gene são responsáveis por 80 a 90% dos casos de HF, contudo, outro estudo realizado no Sul do Brasil em 2017, mostrou que 62,5% identificadas nos pacientes foram neste gene (RODRIGUEZ-CALVO & MASANA, 2018; MOLFETTA *et al.*, 2017).

Quase todas as variantes (p.Gly373Asp, p.Asp601His, p.Ile488Thr, p.Gly549Asp, p.Gly592Glu e Gly681Asp) estão localizadas no segundo domínio, que possui homologia com o precursor do fator de crescimento epidermal (EGF), localizado entre os éxons 7 ao 14 (**figura 6**). Esses resultados concordam com alguns dados relatados na literatura onde os exons 4, 10, 13 e 14 foram descritos como portadores da maioria das mutações no gene *LDLR* (SCHMIDT & KOSTNER, 2000; HUMPHRIES *et al.*, 2006).

Esse domínio é essencial para posicionar o LDLr na superfície de modo a ligar-se ao ligante e para a dissociação das lipoproteínas do receptor nos endossomos, tendo importante participação na reciclagem do receptor, com exceção da variante p.Cys184Tyr que está localizada no primeiro domínio, que compreende os exons 2-6, responsável pela interação da ApoB com o LDLr (WERUTSKY, 2006; DA SILVA, 2007; COELHO, 2012; VASCONCELOS, 2015).

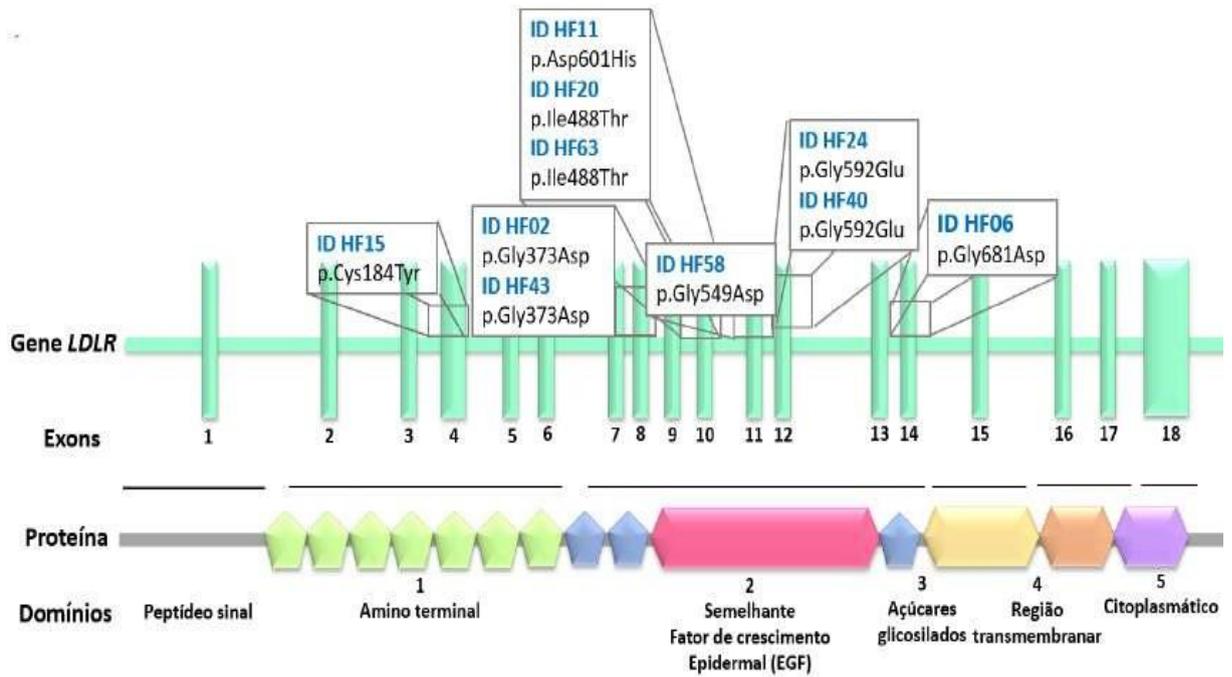


Figura 6 Esquema com as variantes encontradas nos pacientes de acordo com a localização do exon e domínio. Fonte: próprio autor.



Figura 7 Mapa com as variantes e localização geográfica. Fonte: próprio autor.

De acordo com Chora (2017) a maioria das variantes no *LDLr* são encontradas na

população da Europa, e esse fato reflete na população brasileira devido a miscigenação decorrente dos movimentos migratórios de países europeus. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) durante o período de 1884-1933 as nacionalidades dos indivíduos que migraram ao Brasil foram italianos (1.401.335), portugueses (1.145.737), espanhóis (587.114), alemães (154.397), japoneses (142.737), sírios e turcos (3.823). Em virtude disso, as mutações encontradas são reflexos da identidade genética trazida por essas populações como é observado na **figura 7** que contém as variantes *missense* dos pacientes incluídos no estudo de acordo com o país de origem (IBGE, 2000).

Para verificar a predição *in silico* das variantes *missense* foram utilizadas 3 ferramentas: *Polyphen-2*, *SIFT* e *CONDEL*. Nas sete variantes *missense* estudadas apenas uma foi considerada benigna (p.Asp601His) segundo o *Polyphen-2*, e uma tolerada (p.Arg814Gln) de acordo com *SIFT*, entretanto, em ambos os casos as outras duas ferramentas discordam com essa informação, o restante das variantes foram classificadas como provavelmente danificada (*Polyphen-2*) e deletéria (*SIFT* e *Condel*), assim como no estudo de Bourbon (2017), conforme **tabela 4**.

Tabela 3 Análise *in silico* dos pacientes com mutações *missense*.

ID HF	Exon	Troca Nucleotídeo	Troca Aminoácidos	ID dbSNP	Polyphen-2	SIFT	Condel
02/43	8	1118G>A	p.Gly373Asp	rs879254797	PD	D	D
11	10	1801G>C	p.Asp601His	rs753707206	B	D	D
20/63	10	1463T>C	p.Ile488Thr	rs897254913	PD	D	D
24/40	12	1775G>A	p.Gly592Glu	rs137929307	PD	D	D
58	11	1646G>A	p.Gly549Asp	rs28941776	PD	D	D
15	4	551G>A	p.Cys184Tyr	rs121908039	PD	D	D
61	17	2441G>A	p.Arg814Gln	rs5928	PD	T	D

Legenda: PD - possivelmente deletéria, B - benigna, T - tolerável e D – deletéria, ID – identificação

Foi avaliada a ligação da LDL (4°), ligação e interiorização da LDL (37°C) e expressão da proteína LDLr na superfície dos linfócitos totais e CD3+, nos 30 pacientes do estudo. De acordo com os testes para escolha do melhor protocolo para estimulação de linfócitos T, o

protocolo utilizado por Tada *et al.* (2009) foi adaptado e inserindo uma etapa adicional, em razão da necessidade de congelar as células, com isso, foi adicionado duas lavagens em soro fetal bovino e os linfócitos foram mantidos em meio enriquecido para uma melhor recuperação das células e somente depois foram mantidas em meio deficiente de lipoproteínas. Como elucidado por Goldstein e Brown, em um experimento onde foi removido as lipoproteínas do meio de cultura, foi verificado que ao longo do período de 24 horas a atividade da HMG-CoA redutase aumentou 50 vezes e conseqüentemente o aumento dos receptores presentes na superfície das células (Goldstein & Brown, 2009), assim como o que foi encontrado no estudo de Romano *et al.* (2011).

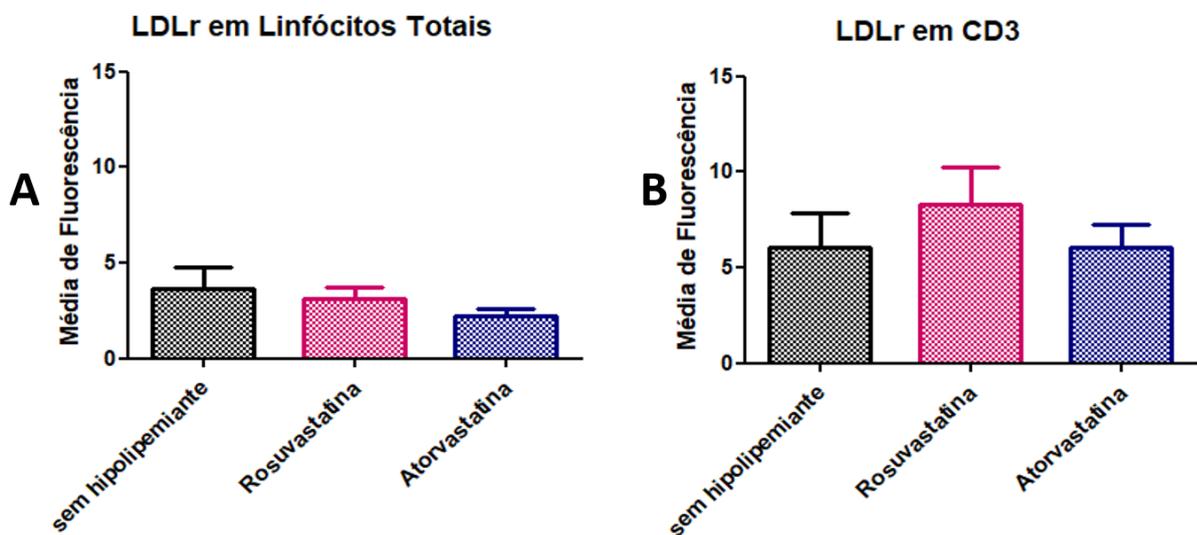


Figura 8 Média de fluorescência adquirida por citometria de fluxo, em A gráfico representativo da relação entre a média de fluorescência do LDLr nos linfócitos totais e em B dos linfócitos CD3+. Legenda: preto – pacientes sem uso de hipolipemiantes, rosa – em uso de rosuvastatina, azul – em uso de atorvastatina.

Ao comparar expressão da proteína LDLr na superfície dos linfócitos totais e CD3, agrupando de acordo com os pacientes com os pacientes que faziam uso (80%) e sem uso de hipolipemiantes (Atorvastatina e Rosuvastatina) de forma isolada ou em associação com Ezetimibe. Houve um aumento, embora sutil, na média de fluorescência, apresentando-se de forma superior em relação aos linfócitos estimulados dos não estimulados, assim como, houve uma média de fluorescência superior em paciente em uso de hipolipemiantes de alta potência, como é o caso da Rosuvastatina, contudo, não foi estatisticamente diferente, assim como no estudo de Vasconcelos (2015).

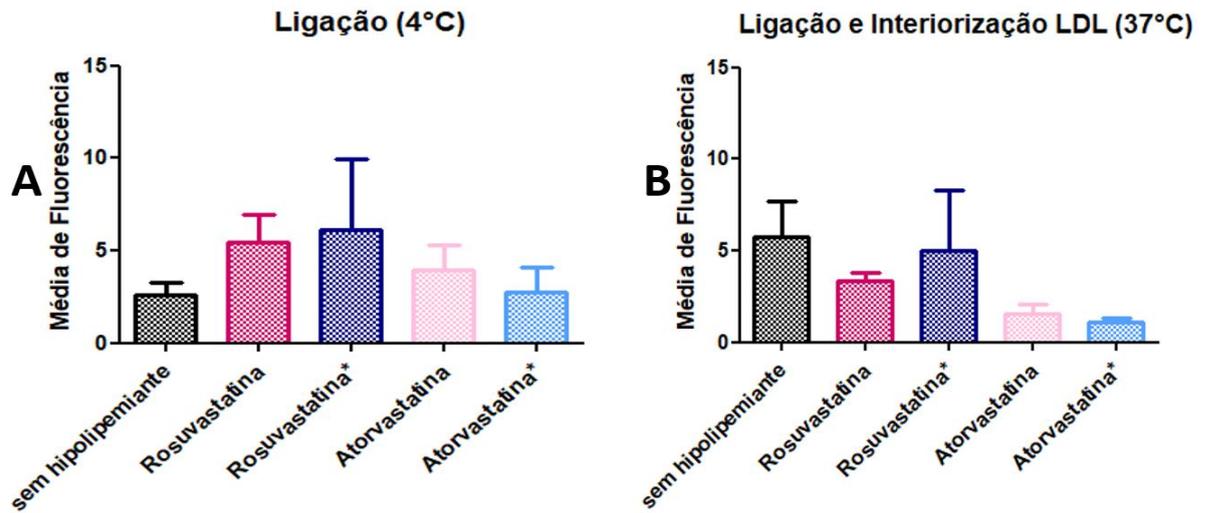


Figura 9 Média de fluorescência adquirida por citometria de fluxo, em A gráfico representativo da relação entre a média de fluorescência na ligação (A) e ligação interiorização (B) da LDL comercial. Legenda: preto – pacientes sem uso de hipolipemiantes, rosa - em uso de rosuvastatina, azul escuro - em uso de rosuvastatina em associação com ezetimibe, rosa claro - em uso de atorvastatina, azul claro - em uso de atorvastatina em associação com ezetimibe.

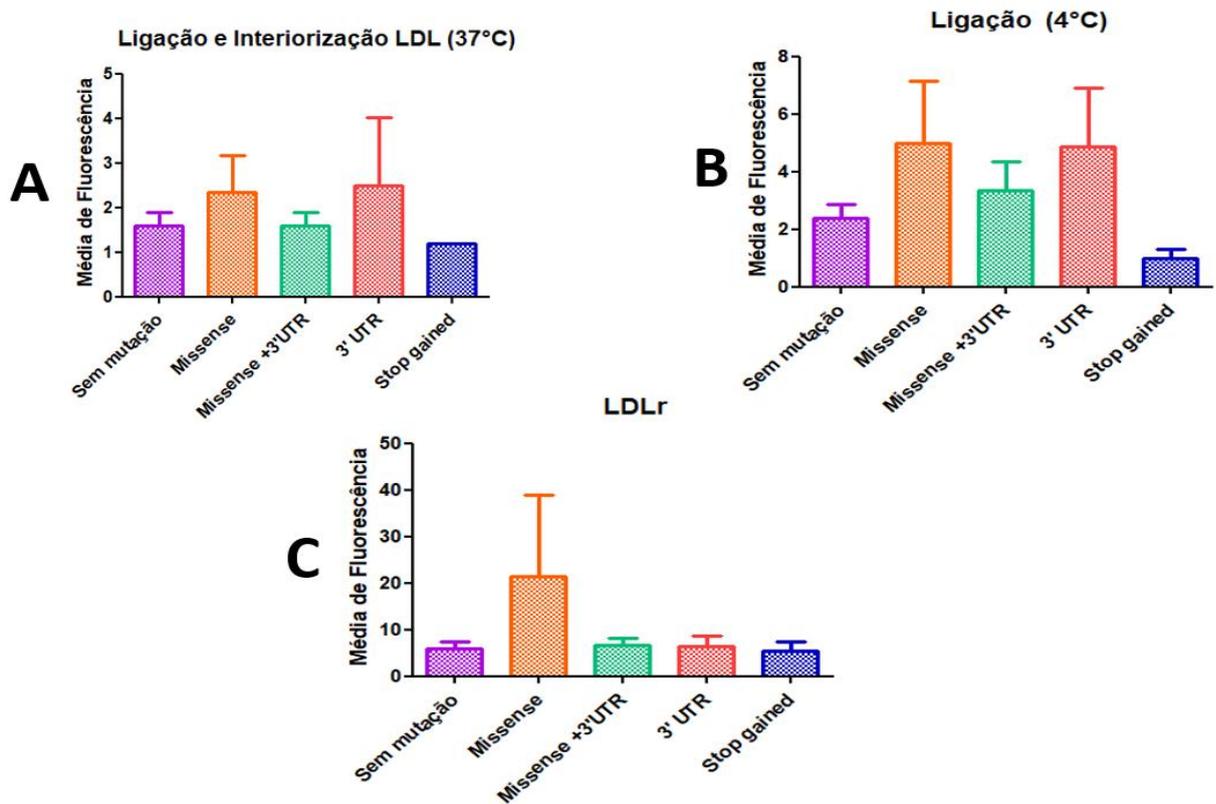


Figura 10 Média de fluorescência de acordo com a presença e tipo de mutação, de acordo com a ligação e interiorização (A), ligação (B) e LDLr (C). Legenda: roxo – pacientes sem mutação no gene de estudo, laranja – com mutações do tipo *missense*, verde – mutações do tipo *missense* e em 3'UTR, vermelho – mutações em 3' UTR, azul – mutação do tipo *stop gained*.

Quando observada a média de fluorescência (**figura 10**) em relação à quantidade de LDLr na superfície celular dos linfócitos CD3+ é possível notar valores superiores e com maior variação em relação aos outros tipos de mutação. Assim como na ligação e ligação e interiorização, esse fato pode estar relacionado ao fato que algumas mutações do tipo *missense* podem aumentar a proximidade e afinidade entre as proteínas.

Os 11 pacientes incluídos no estudo que não apresentaram mutações no gene de estudo possuem diagnóstico de acordo com o MEDPED, como provável, possível e certeza, de acordo com o perfil lipídico, histórico familiar e sinais clínicos, podendo então, possuir alguma mutação em quaisquer outros genes responsável pela regulação na homeostase do colesterol, como *APOB*, *PCSK9* ou raramente *LDLRAP1* (SANTOS, 2018).

A análise de correlação revelou de forma significativa que a quantidade de receptor aumenta a quantidade de ligação e da ligação e interiorização da LDL comercial. Assim como o esperado *in vivo*, onde a quantidade de receptor esta fortemente relacionada à captação de LDL-c e remoção da circulação e diminuição dos eventos cardiovasculares. Outra correlação observada, foi entre a LDL-c e LDLr, embora fraca, é possível notar que quanto maior a quantidade de LDL-c menor é a média de fluorescência do LDLr. Em fenótipos mais graves resultantes de mutações homozigóticas o receptor é considerado nulo ou com < 2% de sua atividade, a concentração de LDL-c é de cinco a sete vezes acima do valor de referência (600-1.200mg/dL), em mutações heterozigóticas, forma com menor severidade, os alelos defeituosos codificam uma proteína com 2% a 25% de sua atividade, apresentando a concentração plasmática duas vezes acima da faixa de referência (300 – 440 mg/dL) (SANTOS, 2018).

Tabela 4 Correlação entre a LDL-c e a ligação e interiorização, ligação e LDLr.

	LDL-c (mg/dL)	LDLr	Ligação e Interiorização	Ligação
LDL-c (mg/dL)	1			
LDLr	-,202	1		
Ligação e Interiorização	,003	,671**	1	
Ligação	,173	,605**	,671**	1

Correlação de Spearman, legenda: negrito = $p \leq 0,01$

5.1 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS DADOS CLÍNICOS, *IN VITRO*, *IN SILICO* E ESTRUTURAL

Paciente do gênero feminino, negra, 59 anos, tabagista e hipertensa, com presença de sinais clínicos como: arco córneo, espessamento de tendões e prega lobular diagonal. Perfil lipídico alterado, CT (209mg/dL) e LDL (144mg/dL), em terapia medicamentosa com atorvastatina 80mg e ezetimibe 10mg, classificada como provável. Já a segunda paciente classificada como certa, é caucasiana, 48 anos, com histórico de obesidade, infarto agudo do miocárdio, doença arterial coronariana, doença arterial periférica e angina, com perfil lipídico com concentrações mais elevadas em relação a primeira, CT (293mg/dL) e LDL (225mg/dL), em terapia medicamentosa de atorvastatina 80mg. Foi identificada nas duas as mesmas mutações no gene *LDLr*, ambas em heterozigose. A primeira mutação identificada ocorre em região *3'UTR*, c.*1419C>A, rs55971831 e outra *missense*, c.1118G>A p. Gly373Asp (G352D), rs879254797, é localizada no exon 8. Na variante G352D ocorre uma alteração da base nitrogenada guanina por adenina na posição 1118 resultando na troca do aminoácido glicina por aspartato na posição 373 da proteína. Segundo as ferramentas de predição essa modificação é provavelmente danosa e deletéria para a proteína. O aspartato, além de possuir um maior peso molecular contém radical alifático, modificando a proteína no domínio responsável pelo posicionamento na superfície celular, dissociação e reciclagem (**figura 11**). Essa mutação já havia sido relacionada com HF (SALAZAR *et al.*, 2012).

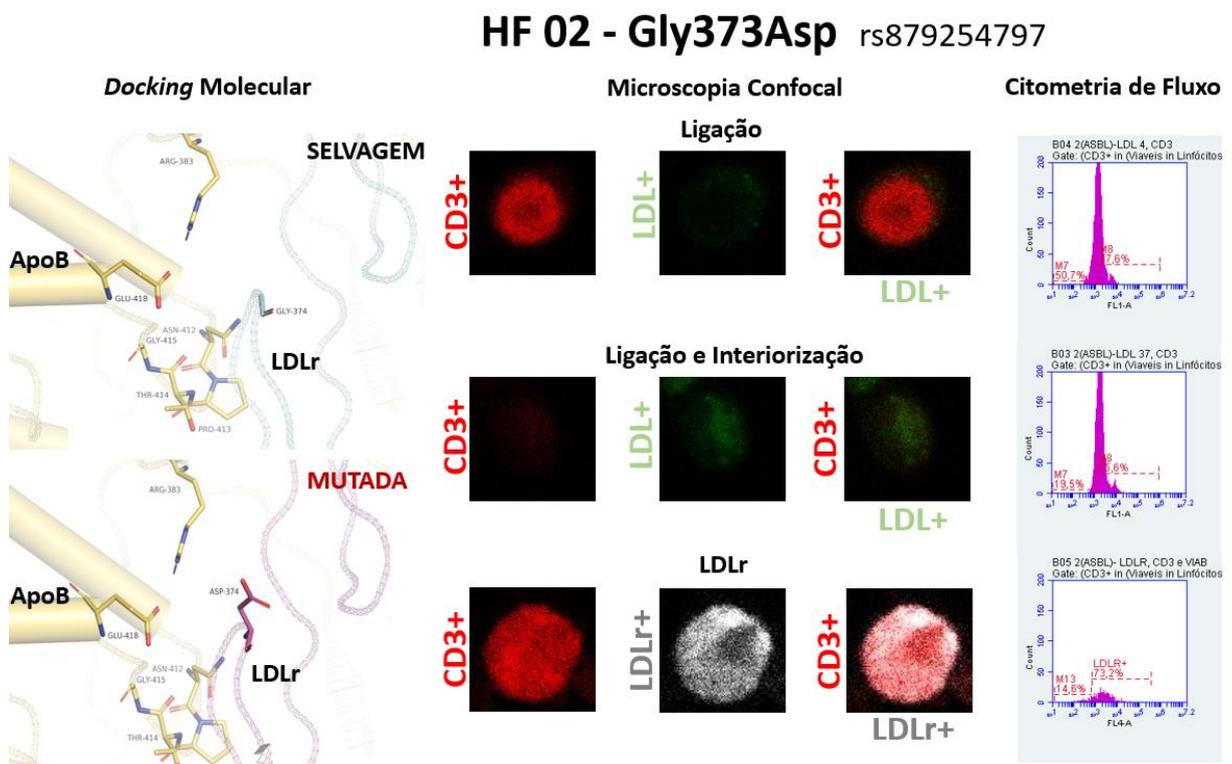


Figura 11 Demonstração dos resultados do docking molecular, microscopia confocal e citometria de fluxo. À esquerda esta a demonstração do docking molecular entre as proteínas LDLr e ApoB, acima está a representação

entre a interação das proteínas selvagens e abaixo, a interação entre as proteínas com a presença da variante no LDLr. Na parte central, estão as imagens da microscopia confocal do paciente (HF 02) portador dessa variante, mostrando a ligação, ligação e interiorização e receptores à superfície, as marcações em vermelho representam as células CD3+ (PE), em verde o LDL comercial (BODIPY FL) e em cinza LDLr (Alexa 647). À direita são os histogramas obtidos através da citometria de fluxo, sendo que as porcentagens sinalizadas à direita, são as células positivas.

Paciente do gênero feminino, negra, 49 anos com histórico de hipertensão e obesidade. Perfil lipídico alterado, CT (261mg/dL) e LDL (184mg/dL), em terapia medicamentosa de atorvastatina 80mg, classificada como possível. A segunda paciente, também classificada como possível, do gênero feminino, é uma criança de 9 anos, negra. Perfil lipídico alterado, CT (209mg/dL), LDL (156mg/dL), em terapia medicamentosa de sinvastatina 20mg. A variante encontrada em heterozigose nas duas pacientes é localizada no éxon 10, do tipo *missense* c.1463T>C p.Ile488Thr (I467T), onde ocorre a alteração da base nitrogenada timina por citosina na posição 1463 causa uma troca do aminoácido isoleucina pela treonina na posição 488. As ferramentas predição apontam a mutação como deletéria, contudo o *docking* molecular mostra que essa alteração não causa nenhuma alteração no posicionamento da proteína na superfície ou até mesmo na reciclagem (**figura 12**).

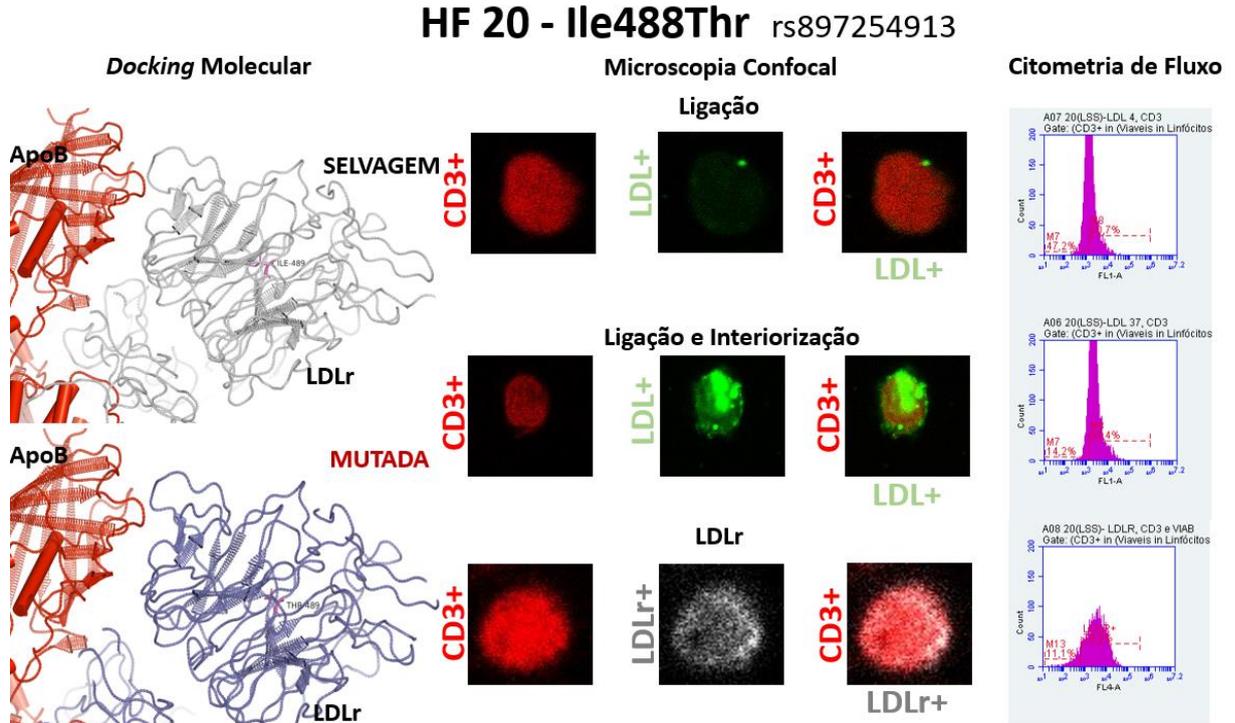


Figura 12 Demonstração dos resultados do docking molecular, microscopia confocal e citometria de fluxo. À esquerda esta a demonstração do docking molecular entre as proteínas LDLr e ApoB, acima está a representação entre a interação das proteínas selvagens e abaixo, a interação entre as proteínas com a presença da variante no LDLr. Na parte central, estão as imagens da microscopia confocal do paciente (HF 20) portador dessa variante, mostrando a ligação, ligação e interiorização e receptores à superfície, as marcações em vermelho representam as

células CD3+ (PE), em verde o LDL comercial (BODIPY FL) e em cinza LDLr (Alexa 647). À direita são os histogramas obtidos através da citometria de fluxo, sendo que as porcentagens sinalizadas à direita, são as células positivas.

Paciente do gênero feminino, caucasiana, 76 anos, com histórico de hipertensão, doença arterial coronariana, doença arterial periférica. Perfil lipídico alterado, CT (231mg/dL), LDL (160mg/dL) e ApoB (136mg/dL), em terapia medicamentosa de rosuvastatina 20mg, classificada como provável. A segunda paciente, com fenótipo mais grave, também do gênero feminino, caucasiana, 55 anos, com histórico de hipertensão, diabetes, infarto agudo do miocárdio, doença arterial coronariana, doença arterial periférica, angina e arco córneo. Perfil lipídico alterado, CT (368mg/dL) e LDL (281mg/dL), em terapia medicamentosa com atorvastatina 80mg e ezetimibe 10mg, classificada como certa. A primeira paciente apresentava cinco variantes em região 3'UTR c.*1419C>A (rs55971831), c.*2016G>A (rs72658879), c.*1550A>T (rs143587805), c.*2212C>T (rs200039283) e uma do tipo *missense* c.1775G>A Gly592Glu (G571E), rs137929307. Já a segunda paciente possuía uma em região 3'UTR c.*2016G>A (rs72658879) e a mesma alteração *missense*. Esta alteração consiste em uma substituição da base nitrogenada guanina por adenina na posição 1775 resultando na alteração do aminoácido glicina pelo glutamato na posição 592. De acordo com as ferramentas de predição alteração é deletéria para a proteína. Em relação ao *docking* molecular, a substituição pelo glutamato pode ocasionar em um aumento na interação, e sabendo-se que o domínio onde está presente essa alteração é o responsável pelo posicionamento e dissociação da ApoB e posterior reciclagem, essa alteração pode contribuir para a diminuição da reciclagem dos receptores e disponibilidade para um novo ciclo de ligação e interiorização da LDL. No estudo *in vitro* é possível notar um aumento na média de fluorescência na ligação e interiorização em relação à LDLr, corroborando com os resultados de *docking* molecular (**figura 13**). A variante rs137929307 no LDLr, presente em heterozigose nas duas pacientes, foi identificada nas populações polonesas, espanhola e brasileira com fenótipo de Hipercolesterolemia Familiar, tendo co-segregação familiar.

HF 40 - Gly592Glu rs137929307

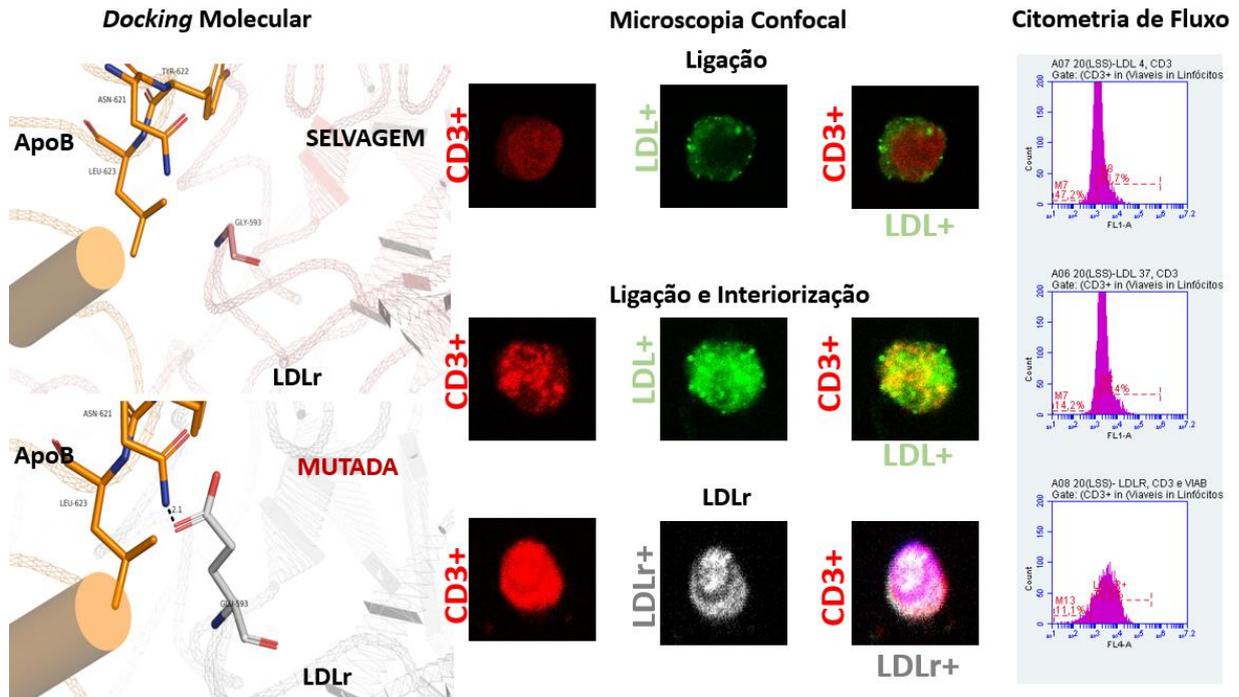


Figura 13 Demonstração dos resultados do docking molecular, microscopia confocal e citometria de fluxo. À esquerda esta a demonstração do docking molecular entre as proteínas LDLr e ApoB, acima está a representação entre a interação das proteínas selvagens e abaixo, a interação entre as proteínas com a presença da variante no LDLr. Na parte central, estão as imagens da microscopia confocal do paciente (HF 40) portador dessa variante, mostrando a ligação, ligação e interiorização e receptores à superfície, as marcações em vermelho representam as células CD3+ (PE), em verde o LDL comercial (BODIPY FL) e em cinza LDLr (Alexa 647). À direita são os histogramas obtidos através da citometria de fluxo, sendo que as porcentagens sinalizadas à direita, são as células positivas.

Paciente do gênero feminino, caucasiana, 54 anos, com histórico de hipertensão, doença arterial coronariana, angina, ataque transitório isquêmico, xantomas e xantelasmas. Perfil lipídico alterado, CT (369mg/dL), LDL (288mg/dL), triglicérides (191mg/dL) e ApoB (197mg/dL), com terapia medicamentosa de rosuvastatina 40mg, classificada como certa. A paciente possuía dois tipos de variante, uma em região 3'UTR, c.*1419C>A, rs55971831, e outra *missense* c.1646G>A p.Gly549Asp (G528V), rs897254913, localizada no éxon 11. A alteração da base nitrogenada guanina por adenina na posição 1664 resulta na substituição do aminoácido glicina por aspartato na posição 549. As ferramentas de predição apontam como uma alteração deletéria, embora as características dos aminoácidos sejam diferentes e no *docking* molecular não foi verificada nenhuma alteração na interação do receptor com a ApoB, porém de acordo com o domínio de ligação essa alteração pode comprometer o correto posicionamento do receptor, dissociação e reciclagem, o que responderia o fenótipo grave da paciente (**figura 14**). No estudo *in vitro* é observado uma aumento na média de fluorescência na ligação e interiorização e na ligação em relação à LDLr, corroborando com os resultados de *docking* molecular. A variante rs28941776 no *LDLr*, presente em heterozigose no paciente,

também conhecida como HF Genoa está associada com o fenótipo de Hipercolesterolemia Familiar, em Gregos, Albaneses e Espanhóis. Esta mutação também é conhecida como mutação HFGenoa.

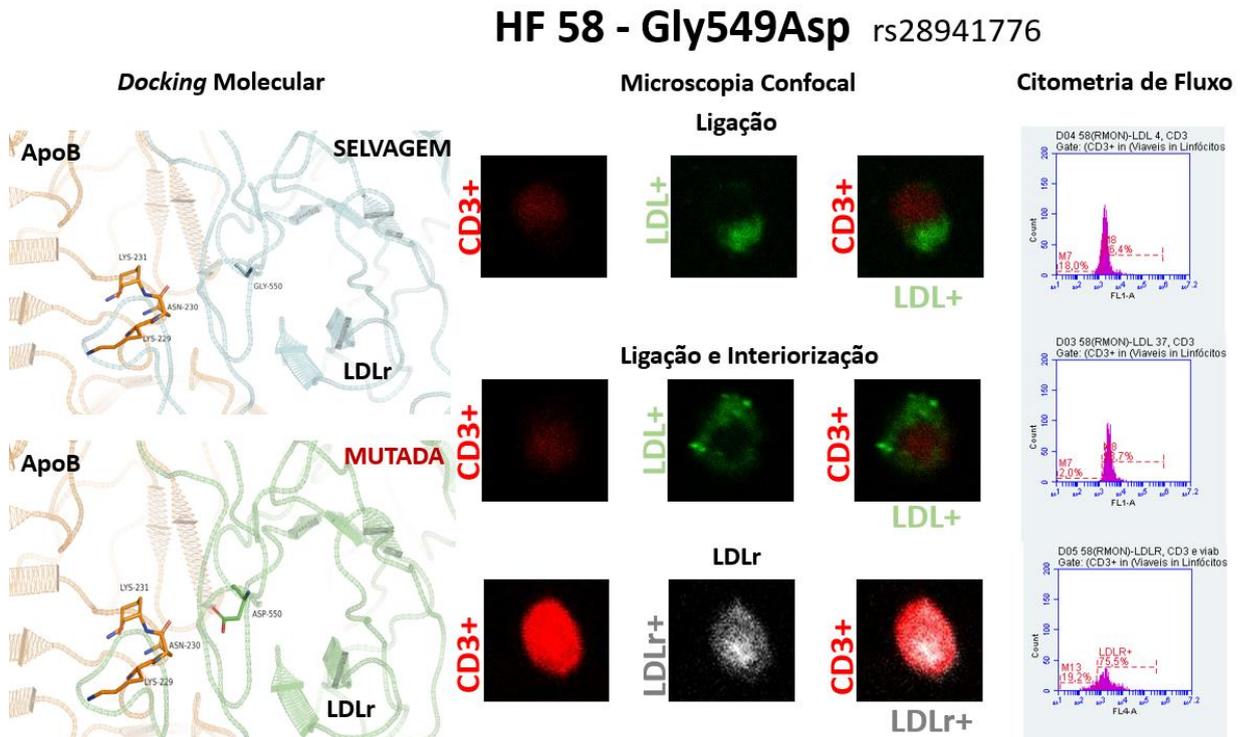


Figura 14 Demonstração dos resultados do docking molecular, microscopia confocal e citometria de fluxo. À esquerda esta a demonstração do docking molecular entre as proteínas LDLr e ApoB, acima está a representação entre a interação das proteínas selvagens e abaixo, a interação entre as proteínas com a presença da variante no LDLr. Na parte central, estão as imagens da microscopia confocal do paciente (HF 58) portador dessa variante, mostrando a ligação, ligação e interiorização e receptores à superfície, as marcações em vermelho representam as células CD3+ (PE), em verde o LDL comercial (BODIPY FL) e em cinza LDLr (Alexa 647). À direita são os histogramas obtidos através da citometria de fluxo, sendo que as porcentagens sinalizadas à direita, são as células positivas.

Paciente do gênero masculino, caucasiano, 57 anos, com histórico de hipertensão, infarto agudo do miocárdio, obeso, síndrome metabólica, doença arterial coronariana, angina e xantelasmas. Perfil lipídico alterado, HDL (38mg/dL), LDL (119mg/dL), triglicérides (162mg/dL), ApoB (117mg/dL), em terapia medicamentosa com rosuvastatina 40mg, ezetimibe 10mg e clopidogrel 75mg, classificado como certeza. Neste paciente foi encontrada duas variantes no gene *LDLr*, ambas em heterozigose, uma em região 3'UTR, c.*1419C>A e outra *missense*, c.551G>A p.Cys184Tyr (C163Y), rs121908039, localizada no éxon 4, onde a alteração da base nitrogenada guanina por adenina na posição 551 resulta na troca da cisteína por tirosina na posição 184. O *docking* essa alteração mostra que afinidade entre as proteínas é aumentada, isso ocorre pois o grupamento alifático da tirosina aproxima ainda mais o receptor com a ApoB, entretanto o aumento da interação, pode ocasionar uma maior dificuldade em ocorrer uma dissociação e o receptor voltar a superfície para um novo ciclo,

sendo degradado juntamente com a LDL (**figura 15**). Em relação às ferramentas de predição *in silico* esta alteração é caracterizada como provavelmente danificada e deletéria e de acordo com estudo de MEDEIROS *et al.* (2010) a variante está relacionada com HF.

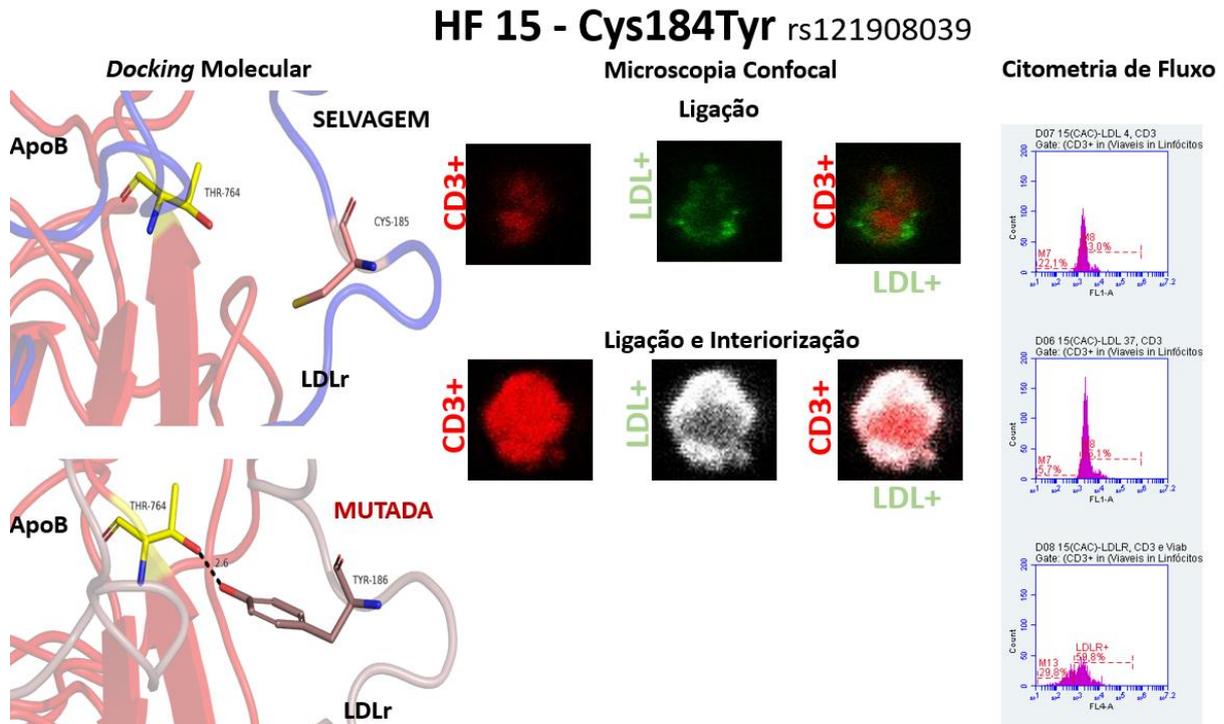


Figura 15 Demonstração dos resultados do docking molecular, microscopia confocal e citometria de fluxo. À esquerda esta a demonstração do docking molecular entre as proteínas LDLr e ApoB, acima está a representação entre a interação das proteínas selvagens e abaixo, a interação entre as proteínas com a presença da variante no LDLr. Na parte central, estão as imagens da microscopia confocal do paciente (HF 15) portador dessa variante, mostrando a ligação, ligação e interiorização e receptores à superfície, as marcações em vermelho representam as células CD3+ (PE), em verde o LDL comercial (BODIPY FL) e em cinza LDLr (Alexa 647). À direita são os histogramas obtidos através da citometria de fluxo, sendo que as porcentagens sinalizadas à direita, são as células positivas.

Paciente do gênero feminino, caucasiana, 42 anos, com histórico de hipertensão, diabetes, obesidade, síndrome metabólica, doença arterial periférica, angina presença de xantelasmas. Perfil lipídico alterado, CT (348mg/dL), LDL (243mg/dL), Triglicérides (253mg/dL) e ApoB (181mg/dL), em terapia medicamentosa com atorvastatina 80mg ezetimibe 10mg, classificada como provável. Foram identificadas três variantes em heterozigose no gene *LDLr* sendo duas em 3'UTR, c.*1419C>A, rs55971831 e *2016G>A, rs72658879 e uma do tipo *missense* c.1801G>C p.Asp601His (I467N), rs753707206, localizada no éxon 10, onde ocorre a alteração da base nitrogenada guanina por citosina na posição 1801, causando a troca do aminoácido aspartato por histidina na posição 601 da proteína. De acordo com as ferramentas de predição *Polyphen* a mutação é benigna para a proteína, contudo, o *SIFT* e

Condel relacionam como deletéria. Segundo o *docking* a alteração do aminoácido resulta em repulsão eletrostática por cargas semelhantes, diminuir a interação entre as proteínas devido ao maior distanciamento entre as proteínas, nos ensaios *in vitro* é possível notar um aumento da métrica de fluorescência tanto na ligação e interiorização como na quantidade LDLr, entretanto, deve existir outro mecanismo interferindo a remoção do LDL-c, visto a concentração do paciente (**figura 16**). Essa variante foi identificada na população brasileira com fenótipo de HF tendo co-segregação familiar.

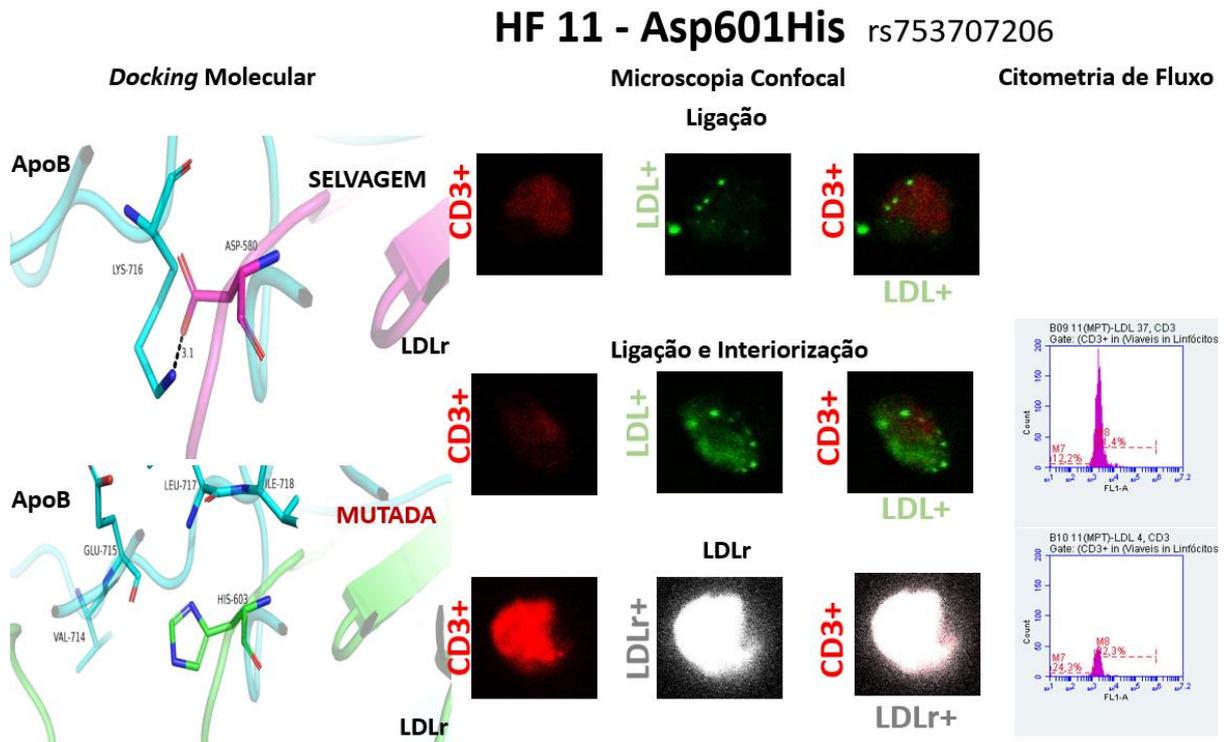


Figura 16 Demonstração dos resultados do docking molecular, microscopia confocal e citometria de fluxo. À esquerda esta a demonstração do docking molecular entre as proteínas LDLr e ApoB, acima está a representação entre a interação das proteínas selvagens e abaixo, a interação entre as proteínas com a presença da variante no LDLr. Na parte central, estão as imagens da microscopia confocal do paciente (HF 11) portador dessa variante, mostrando a ligação, ligação e interiorização e receptores à superfície, as marcações em vermelho representam as células CD3+ (PE), em verde o LDL comercial (BODIPY FL) e em cinza LDLr (Alexa 647). À direita são os histogramas obtidos através da citometria de fluxo, sendo que as porcentagens sinalizadas à direita, são as células positivas

6 CONCLUSÕES

A utilização de linfócitos ativados dos pacientes portadores de variantes sugestivas como patogênicas foram eficaz na validação genotípica. Em pacientes com maior LDL-c foi verificada uma menor captação da LDL comercial. A variante p.Gly592Glu (rs137929307) foi caracterizada com maior afinidade pela ApoB , com aumento de endocitose celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIFADEL, M. *et al.* Mutations in pcsk9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. **Nature Genetics**, v. 34, n. 2, p. 154–6, 2003.

ABIFADEL, M.; ELBITAR, S.; KHOURY, P.E.; *et al.* Living the PCSK9 Adventure: from the Identification of a New Gene in Familial Hypercholesterolemia Towards a Potential New Class of Anticholesterol Drugs. **Curr Atheroscler Rep**, v.16, p. 439-62, 2012.

ALENCAR, D. A. **Utilização de ferramentas computacionais para o estudo do impacto funcional e estrutural de nsSNPs em genes codificadores de proteínas.** Universidade Federal de Minas Gerais; Doutorado em Bioinformática [Tese] p. 110, 2010.

ALONSO, R. *et al.* Lipoprotein(a) levels in familial hypercholesterolemia: an important predictor of cardiovascular disease independent of the type of ldl receptor mutation. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 19, p. 1982–9, 2014.

ALVES, A. C. *et al.* Novel functional apob mutations outside ldl-binding region causing familial hypercholesterolaemia. **Human molecular genetics**, v. 23, n. 7, 2014.

ANDERSON, J. M. *et al.* Influence of pcsk9 polymorphisms on plasma lipids and response to atorvastatin treatment in brazilian subjects. **Journal of Clinical Lipidology**. v. 8, n. 3, p. 256–264, 2014.

BARBOSA, C. H. S. **Evolução diferencial para o problema de docking proteína-ligante** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2013.

BOURBON M., ALVES A.C., ALONSO R., *et al.* Mutational analysis and genotype-phenotype relation in familial hypercholesterolemia: The SAFEHEART registry. **Atherosclerosis**, v.262, p. 8-13, 2017.

BRAUTBAR, A. *et al.* Genetics of familial hypercholesterolemia. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 17, n. 4, p. 20, 2015.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Expression of the familial hypercholesterolemia gene in heterozygotes: mechanism for a dominant disorder in man. **Science**, v. 185, n. 4145, p. 61–3, 1974.

CAMERON J, HOLLA ØL, LAERDAHL JK, *et al.* Mutation S462P in the PCSK9 gene reduces secretion of mutant PCSK9 without affecting the autocatalytic cleavage. **Atherosclerosis**, v. 203, p. 161–5, 2009.

CARROLL, M. D.; LACHER, D. A.; SORLIE, P. D.; CLEEMAN, J. I.; GORDON, D. J.; WOLZ, M. *et al.* Trends in serum lipids and lipoproteins of adults, 1960-2002. **JAMA**, v. 294, p. 1773–81, 2005.

CARVALHO, M. C. DA C. G. DE; SILVA, D. C. G. DA. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 735– 744, 2010.

CHOUMERIANOU, D. M.; DEDOUSSIS, G. V. Z. Familial hypercholesterolemia and response to statin therapy according to LDLr genetic background. **Clinical Chemical**

Laboratory Medicine, v. 43, n. 8, p. 793–801, 2005.

COELHO, S. A. P. B. **Estudo Molecular de Dislipidemias Familiares**. Lisboa: Mestrado em Biologia Humana e Ambiente [Dissertação] p.123, 2012. COHEN, J. C. *et al.* Sequence variations in *PCSK9*, low LDL, and protection against coronary heart disease. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 12, p. 1264–1272, 2006.

DA SILVA, S. C. P. **Estudos funcionais para determinação da patogenicidade de novas mutações no gene LDLR – diagnóstico e caracterização molecular da Hipercolesterolemia Familiar**. Lisboa : Mestrado em Biologia Molecular e Genética [Dissertação] p.45, 2007.

ETXEARRIA A, PALACIOS L, STEF M *et al.* Functional Characterization of Splicing and Ligand-Binding Domain Variants in the LDL **Receptor**. **Human Mutation**, v.33, p.1 p. 232-243, 2012.

FALUDI A. A. , IZAR M. C. O. , SARAIVA J. F. K. , *et al.* Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. **Arq Bras Cardiol**, v.109, p. 1-76, 2017.

FORTI, N.; SALAZAR, L. A.; DIAMENT, J.; *et al.* Alterações genéticas e colesterolemia: recentes estudos brasileiros **Arq. Bras. Cardiol.**, v.80 n.5, 2003.

FREDRICKSON, D. S. Mutants, hyperlipoproteinaemia, and coronary artery disease. **British Medical Journal**, v. 2, n. 5755, p. 187–192, 1971.

FREITAS, A. **Caracterização bioquímica e molecular da hipercolesterolemia familiar na região norte e centro de Portugal**. Universidade do Minho - Portugal, 2010.

GOLDSTEIN J. L. , BROWN M. S. The LDL receptor. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 29, n.4, p.431-8, 2009.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. **The journal of biological chemistry**, v. 249, n. 16, p. 5153–62, 1974.

HORTON, J.; COHEN, J.; HOBBS, H. Molecular biology of *pcsk9*: its role in ldl metabolism. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 2, p. 71–77, 2007.

IACocca, M. A., CHORA, J. R., CARRIÉ, A., *et al.* ClinVar database of global familial hypercholesterolemia-associated DNA variants. **Human Mutation**, v.39, n.11, p.1631–1640, 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Brasil: 500 anos de povoamento. Rio de Janeiro, 2000. Apêndice: Estatísticas de 500 anos de povoamento. P. 226.

KHAMIS, A. *et al.* Functional analysis of four LDLr 5'utr and promoter variants in patients with familial hypercholesterolaemia. **European Journal of Human Genetics**, v. 23, n. 6, p. 790–5, 2015.

LAMBERT, G. *et al.* Molecular basis of *pcsk9* function. **Atherosclerosis**, v. 203, n. 1, p. 1–7, 2009.

LIBBY, P.; BORNFELDT, K. E.; TALL, A. R. Atherosclerosis: successes, surprises, and future challenges. **Circulation Research**, v. 118, n. 4, p. 531–534, 2016.

- LIU, J. *et al.* Identification of a novel sterol-independent regulatory element in the human low density lipoprotein receptor promoter. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 7, p. 5214–21, 2000.
- MARANHÃO, R. T.; CARVALHO, P. O.; STRUNZ, C. C. Lipoprotein (a): Structure, Pathophysiology and Clinical Implications. **Arq. Bras. Cardiol**, v.103, n.1, 2014.
- MARDIS, E. R. Next-generation sequencing platforms. **Annual review of analytical chemistry**, 12 jun. 2013. v. 6, n. 1, p. 287–303 MESH. Dyslipidemia. [S.l.], 2006.
- MOTAZACKER, M. M. *et al.* Advances in genetics show the need for extending screening strategies for autosomal dominant hypercholesterolaemia. **European Heart Journal**, v. 33, n. 11, p. 1360–1366, 2012.
- MOUSAVI, S. A.; BERGE, K. E.; LEREN, T. P. The unique role of proprotein convertase subtilisin/kexin 9 in cholesterol homeostasis. **Journal of Internal Medicine**, v. 266, n. 6, p. 507–519, 2009.
- NAJAM, O.; RAY, K. K. Familial hypercholesterolemia: a review of the natural history, diagnosis, and management. **Cardiology and Therapy**, v. 4, n. 1, p. 25–38, 2015.
- NATESAMPILLAI, S. *et al.* A novel functional interaction between the sp1-like protein klf13 and srebp-sp1 activation complex underlies regulation of low density lipoprotein receptor promoter function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 6, p. 3040–3047, 2006. p. 1817–1828, 2014.
- PAIVA FCR, FERREIRA GM, TROSSINI GHG, PINTO E. Identification, In Vitro Testing and Molecular Docking Studies of Microginins' Mechanism of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition. **Molecules**. v.5, n.22, p.12, 2017.
- QUINTÃO, E.; NAKANDAKARE, E.; PASSARELLI, M. **Lipídeos: do metabolismo à aterosclerose**. São Paulo: [s.n.], 2011.
- ROMANO M. , DI TARANTO M. D. , MIRABELLI P, *et al.* An improved method on stimulated T-lymphocytes to functionally characterize novel and known LDLR mutations. **Journal Lipid Res**, v.52, n.11, p.2095-100, 2011.
- SANTOS, R. D.; MARANHÃO, R. C. What is new in familial hypercholesterolemia? **Current Opinion in Lipidology**, v. 25, n. 3, p. 183–188, 2014.
- SANTOS, R. *et al.* Sociedade brasileira de cardiologia. i diretriz brasileira de hipercolesterolemia familiar. **Arq Bras Cardiol**, v. 99, n. 2 Supl. 2, p. 1–28, 2012.
- SCHAEFER, J. R. *et al.* Pharmacogenetic aspects in familial hypercholesterolemia with the special focus on fhmarburg (fh p.w556r). **Clinical research in cardiology supplements**, v. 7, n. S1, p. 26, 2012.
- SORIA, L. F. *et al.* Association between a specific apolipoprotein b mutation and familial defective apolipoprotein b-100. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 2, p. 587–91, 1989.
- SPOSITO, A. C. *et al.* IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.**; v.88, n.1, p. 2-19, 2007
- TADA H., KAWASHIRI M. A. , NOGUCHI T. , *et al.* A novel method for determining functional LDL receptor activity in familial hypercholesterolemia: application of the CD3/CD28 assay in lymphocytes. **Clin Chim Acta**. v.400, p. 42-7, 2009.
- USIFO, E. *et al.* Low-density lipoprotein receptor gene familial hypercholesterolemia variant database: update and pathological assessment. **Annals of Human Genetics**, v. 76, n. 5, p.

387–401, 2012.

VALLEJO-VAZ, A. J. *et al.* Familial hypercholesterolaemia: a global call to arms. **Atherosclerosis**, v. 243, n. 1, p. 257–259, 2015.

VASCONCELOS, K. A. S. **Identificação de mutações no gene do receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDLR) em pacientes com hipercolesterolemia familiar.** Ribeirão Preto: Doutorado em Investigação Biomédica [Tese] p. 81, 2015.

WERUTSKY, C. A. **As bases moleculares das Hipercolesterolemias Familiares no Brasil: O Rio Grande do Sul.** Ribeirão Preto: Doutorado em Investigação Clínica [Tese] p.88, 2006.

WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2014 “attaining the nine global noncommunicable diseases targets; a shared responsibility”. **Who library cataloguing-in-publication data**, p. VII-280, 2014.

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

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**,.v. 26, n. 2, p. 82-87, 2015.

WU Z, YAO C, ZHAO D, et al. Cardiovascular disease risk factor levels and their relations to CVD rates in China – Results of Sino-MONICA project. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil**, v.11, p. 275–83, 2004.

XAVIER, H. T. *et al.* Sociedade brasileira de cardiologia. v diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arq Bras Cardiol**, v. 101, n. 1, 2013.

ANEXO 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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: 2

CAAE: 24618713.0.3001.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

CNPQ

FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.708.638

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto destinado à avaliação de genes relacionados à hipercolesterolemia familiar. Serão recrutados 150 indivíduos adultos acompanhados no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, em São Paulo, sendo 100 indivíduos com dosagem elevada de colesterol e 50 indivíduos controle. Serão coletados 20 ml de sangue dos participantes e amostra de sangue poderá ser armazenada por um período de 5 anos.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo principal é avaliar a presença de genes relacionados com a hipercolesterolemia familiar em pacientes que já receberam o diagnóstico clínico da doença e determinar o perfil genético nesta população.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há benefícios diretos aos participantes e os riscos são os inerentes à coleta de sangue e à punção venosa. Como os pacientes são indivíduos adultos, o volume de sangue a ser coletado é considerado adequado.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-3622

Fax: (11)3031-8986

E-mail: cepfcf@usp.br



Continuação do Parecer: 2.708.638

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é importante, pois busca trazer mais conhecimentos sobre as causas da hipercolesterolemia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Trata-se de emenda de projeto de pesquisa já aprovado pelo CEP da Instituição Proponente (Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia-SP) e do Centro Colaborador (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP). A pesquisadora principal solicita a inclusão de 4 outros centros colaboradores:

- Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP,
- Hospital de Clínicas de Porto Alegre,
- Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP,
- Cruzeiro do Sul Educacional SA.

Recomendações:

As cartas de anuência das Instituições co-participadoras foram anexadas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1109917.pdf	04/06/2018 15:03:35		Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_UNICSUL.pdf	04/06/2018 14:59:34	Jéssica Bassani Borges	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_UNICAMP.pdf	04/06/2018 14:58:59	Jéssica Bassani Borges	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_UFRGS.pdf	04/06/2018 14:58:28	Jéssica Bassani Borges	Aceito
Outros	Carta_de_anuencia_INCOR.pdf	04/06/2018 14:58:01	Jéssica Bassani Borges	Aceito
Outros	Carta_resposta_Pendencia_CEP_FCF_USP.pdf	04/06/2018 14:57:23	Jéssica Bassani Borges	Aceito
Outros	emenda_inclusaoacentors.pdf	20/03/2018 09:50:50	Pedro Silvio Farsky	Aceito

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-3622

Fax: (11)3031-8986

E-mail: cepfcf@usp.br



USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 2.708.638

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
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

SAO PAULO, 12 de Junho de 2018

Assinado por:

**Elvira Maria Guerra Shinohara
(Coordenador)**

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-3622

Fax: (11)3031-8986

E-mail: cepfcf@usp.br

ANEXO 2



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 mutagênese 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



Continuação do Parecer: 2.587.235

pirosequenciamento; (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



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

Continuação do Parecer: 2.587.235

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

ANEXO 3



Thais Kristini Almendros Afonso

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/6198820517507443>

Última atualização do currículo em 30/10/2016

Resumo informado pelo autor

Mestranda em Biologia Molecular na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP) no Departamento de Análises Clínicas. Possui graduação em Farmácia pela Universidade de Mogi das Cruzes (2014). Foi aluna de Iniciação Científica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Atualmente é estudante no grupo de pesquisa Laboratório de Pesquisa em Diagnostico por Biologia Molecular.

(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome Thais Kristini Almendros Afonso
Nascimento 16/01/1992 - Brasil
CPF 418.394.268-37

Formação acadêmica/titulação

- 2016** Mestrado em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).
 Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
 Título: Estudos funcionais de mutações no receptor da LDL em pacientes diagnosticados com Hipercolesterolemia Familiar
 Orientador: Mario Hiroyuki Hirata
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2011 - 2014** Graduação em Farmácia.
 Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, Mogi Das Cruzes, Brasil
- 2008 - 2009** Ensino Médio (2o grau) .
 Escola Estadual Jornalista Paulo Eduardo Olintho Rehder, REHDER, Brasil, Ano de obtenção: 2009

Formação complementar

- 2016 - 2016** Curso de curta duração em Scientist to Scientist - Citometria de Fluxo. (Carga horária: 8h).
 Thermo Fisher Scientific, TFS, Brasil
- 2016 - 2016** Técnicas de Cultura Celular. . (Carga horária: 8h).
 Núcleo de Aprimoramento Científico, NAC, Brasil
- 2012 - 2012** Extensão universitária em Farmacogenética. (Carga horária: 180h).
 Portal Educação, PORTAL, Brasil

Atuação profissional

1. Centro de Estudos Laboratoriais Farmacêuticos - CELFARM

Vínculo institucional

2014 - 2014 Vínculo: Estágio Supervisionado , Enquadramento funcional: Estágio , Carga horária: 20, Regime: Parcial

2. Hospital das Clínicas - HC

Vínculo institucional

2012 - 2013 Vínculo: Estágio Supervisionado , Enquadramento funcional: Estágio , Carga horária: 30, Regime: Parcial

3. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2014 - 2015 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Aluna de Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva

Produção

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. BORGES, J. B.; **AFONSO, T. K. A.**; BASTOS, G. M.; RODRIGUES, E. S.; THUROW, H. S.; HIRATA, T. D. C.; FALUD, A. A.; GONCALVES, R. M.; SOUSA, A. G. M. R.; HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H. PCSK9 rs562556 e uma possível contribuição para o fenótipo de Hipercolesterolemia familiar em uma população brasileira – Projeto Piloto In: 71º Congresso Brasileiro de Cardiologia, 2016, FORTALEZA/CEARÁ.
Anais do Congresso Brasileiro de Cardiologia. , 2016. v.107.
2. BORGES, J. B.; BASTOS, G. M.; **AFONSO, T. K. A.**; RODRIGUES, E. S.; THUROW, H. S.; HIRATA, T. D. C.; FALUD, A. A.; GONCALVES, R. M.; HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H. Study of APOB mutations and Familial Hypercholesterolemia phenotypes In: 84º EAS Congress, 2016, Innsbruck.
Anais do Congresso da Sociedade Europeia de Aterosclerose. , 2016.
3. BORGES, J. B.; **AFONSO, T. K. A.**; BASTOS, G. M.; RODRIGUES, E. S.; THUROW, H. S.; SAMPAIO, M. F.; FALUDI, A. A.; GONCALVES, R. M.; HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H. Ultrassequenciamento exômico dos genes LDLR, APOB, PCSK9 e APOE em pacientes com Hipercolesterolemia Familiar In: XXXVII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2016, São Paulo.
Anais do XXXVII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. , 2016.

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 27/03/2017 às 07:38:14.



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 9115602/1 - Thais Kristini Almendros Afonso

Email: thaisalmendros@usp.br
Data de Nascimento: 16/01/1992
Cédula de Identidade: RG - 48.115.934-4 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutica - Universidade de Mogi das Cruzes - São Paulo - Brasil - 2015

Curso: Mestrado
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 12/02/2016
Início da Contagem de Prazo: 12/02/2016
Data Limite para o Depósito: 13/08/2018
Orientador: Prof(a). Dr(a). Mario Hiroyuki Hirata - 12/02/2016 até o presente. Email: mhirata@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 12/02/2016
Prazo Máximo para Realização do Exame de Qualificação: 17/04/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 12/02/2016

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 06/02/2017

Impresso em: 27/03/2017 07:35:38



Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
MCP5845-3/1	Tópicos Avançados em Genética e Cardiologia Molecular (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	01/03/2016	14/03/2016	30	2	100	B	N	Concluída
FBC5793-12/3	Tópicos em Análises Clínicas I	08/03/2016	20/06/2016	15	1	100	A	N	Concluída
ICB5751-1/1	Biologia Molecular: da Origem até os Dias Atuais (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	28/03/2016	29/05/2016	90	6	100	C	N	Concluída
BTC5734-6/1	Organização e Fluxo da Informação Genética em Sistemas Complexos (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	09/05/2016	12/06/2016	75	5	80	B	N	Concluída
MIP5737-2/4	Fundamentos da Citometria de Fluxo - Aplicações na Investigação da Relação Hospedeiro-Parasita (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	13/06/2016	19/06/2016	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBC5757-7/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	02/08/2016	14/11/2016	15	1	100	A	N	Concluída
BMF5866-4/2	Tópicos Avançados em Farmacologia (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	03/08/2016	15/11/2016	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
ICB5753-1/1	Citometria de Fluxo: Uma Abordagem Teórico-prática (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	09/09/2016	21/10/2016	75	5	85	A	N	Concluída
FBC5709-6/1	Biologia Molecular em Análises Clínicas	03/10/2016	30/10/2016	60	4	90	A	N	Concluída
MCM5725-6/3	Aspectos Atuais do Metabolismo de Lípidos (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	31/10/2016	04/12/2016	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	28
Estágios:			
Total:	0	25	28

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 06/02/2017

Impresso em: 27/03/2017 07:35:38