## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

## FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Fisiopatologia e Toxicologia

Caracterização funcional *in vitro* de variantes no gene *PCSK9* identificadas em pacientes com Hipercolesterolemia Familial

Bruna Los

Dissertação para a obtenção do Título de MESTRE

Orientador: Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo

2019

## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

## FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Fisiopatologia e Toxicologia

# Caracterização funcional *in vitro* de variantes no gene *PCSK9* identificadas em pacientes com Hipercolesterolemia Familial

Bruna Los

Versão original

Dissertação para a obtenção do Título de

**MESTRE** 

Orientador: Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, 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

```
Los, Bruna
Caracterização funcional in vitro de variantes no gene PCSK9 identificadas em pacientes com Hipercolesterolemia Familial / Bruna Los. - São Paulo, 2019.
140 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Hirata, Mario Hiroyuki

1. Hipercolesterolemia familial. 2. PCSK9. 3.
LDLR. 4. estudos funcionais. I. T. II. Hirata,
Mario Hiroyuki , orientador.
```

## Bruna Los

# Caracterização funcional *in vitro* de variantes no gene *PCSK9* identificadas em pacientes com Hipercolesterolemia Familial

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do grau de Mestre

> Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata Orientador/Presidente

1° Examinador
1 Examinador
2° Examinador
3° Examinador

São Paulo,\_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_\_ de 2019.

Doding agan tugh allog
Dedico esse trabalho,
À minha mãe, Janete Los, pelo suporte e incentivo irrestritos durante todos os momentos da minha vida!
Aos meus irmãos, Viviane e Fernando, aos meus sobrinhos Larissa, Helena e Pedro, e aos meus cunhados Tatiane e Pedro, pela torcida e apoio constante durante todos esses anos!
Ao meu companheiro, Victor Ferreira Santos, "trem", por sempre acreditar em mim, principalmente quando eu mesma não acreditava mais.
A todos meus amigos e familiares pela confiança. Vocês foram fundamentais nesse processo! Muito obrigada!

"How much passion and joy we shared; how often we turned back time"

(Towards the blue horizon – Riverside)

### **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata, por ter acreditado no meu potencial e ter aberto as portas do seu laboratório para mim. Por todos os ensinamentos e conselhos durante esses anos, e por sempre me incentivar a ser uma pesquisadora melhor.

À profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata, por todos os conhecimentos transmitidos, os quais contribuíram muito para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho, pela ponte inicial com o laboratório do Prof. Dr. Mario.

À Profa. Dra. Alice Cristina Rodrigues do Departamento de Farmacologia ICB-USP, que se colocou à disposição para me ajudar com os ensaios da luciferase e com a análise dos dados obtidos.

À Profa. Dra. Mariz Vainzof, e a técnica Leticia Nogueira Feitosa Pellaes, por terem disponibilizado o microscópio confocal que foi utilizado neste projeto.

À Profa. Dra. Luciana Haddad do IB-USP e ao Prof. Dr. Augusto Ducati Luchessi da UNICAMP, por terem me cedido um plasmídeo que foi utilizado nesta dissertação.

À Profa. Dra. Maria Rita Passos-Bueno e ao Dr. Luciano, por terem me ajudado com dúvidas sobre análises de dados de sequenciamento.

À Profa. Dra. Andrea Balan Fernandes e ao doutorando Marcelo, por terem me ajudado com dúvidas sobre clonagem e mutagênese sítio-dirigida.

À melhor técnica do nosso laboratório, Cristina Moreno Fajardo, pela paciência, amizade e companheirismo.

Ao grupo HF, Akira, Carol, Eli, Gláucio, Jéssica, Raul, Renata, Thaís e Victor, pelo companheirismo e ajuda em todos os momentos. Cada parte desse trabalho tem um pouco de vocês também!

Aos antigos integrantes do LBMAD, Brayan, Elizabeth e Vivian, pela amizade e confiança.

As funcionárias do LIMC-IDPC, Adriana, Ana, Gisele e Lin, por todo o apoio técnico.

Aos alunos e técnicos dos demais laboratórios do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Gustavo, Jaqueline, Walter, Carmen, Silene, Larissa, Erika, Débora, Silvia, Edson, Kátia, Fabi, Renata e Maurício, por todo o apoio técnico, disposição em ajudar, ensinamentos transmitidos, os quais foram essenciais para a finalização desta dissertação!

Aos alunos do Semi Industrial, João Vitor, Viviane e Lívia, por sempre estarem dispostos a ajudar e a compartilhar seus conhecimentos comigo.

Ao meu orientador de IC, Prof. Dr. Marcelo Távora Mira, por ter despertado em mim a vontade de ser pesquisadora!

A todos os pacientes que aceitaram participar do projeto temático HF.

Aos médicos da Seção Médica de Dislipidemia do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desse projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de mestrado II (processo nº 2017/17016-8) e pelo apoio financeiro para a realização desse projeto (processo nº 2016/12899-6).



### **RESUMO**

LOS, B. Caracterização funcional *in vitro* de variantes no gene *PCSK9* identificadas em pacientes com Hipercolesterolemia Familial. 2019. 140p. Dissertação (Mestre) — Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A Hipercolesterolemia Familial (HF) é uma doença genética do metabolismo das lipoproteínas, caracterizada pelo aumento do colesterol plasmático, transportado principalmente pela lipoproteína de baixa densidade (LDL). A HF é causada principalmente por mutações nos genes LDLR, APOB e PCSK9. As mutações conhecidas na PCSK9 podem levar ao aumento ou diminuição da função proteolítica da proteína, as quais são associadas ao aumento ou diminuição da LDL-c plasmática, respectivamente. Com o projeto genoma humano surgiram novos métodos de sequenciamento, o que resultou em um grande número de novas variantes genéticas relacionadas à HF. Entretanto, os mecanismos pelos quais essas variantes influenciam na concentração do colesterol e sua interferência na resposta terapêutica não estão totalmente elucidados. O objetivo do presente trabalho foi avaliar in vitro o efeito de variantes na região codificadora e reguladora do gene PCSK9 identificadas em pacientes HF utilizando sequenciamento de nova geração. Para a caracterização funcional das variantes na região codificadora da PCSK9, primeiramente foi avaliado o impacto dessas variantes na interação PCSK9-LDLR via Docking molecular. Células HEK293FT foram transfectadas com as diferentes construções da PCSK9, e posteriormente, foram utilizadas em ensaios para avaliar a atividade do LDLR e a internalização de LDL por citometria de fluxo. Para as variantes na região reguladora da PCSK9, foi realizado uma predição in silico do possível efeito de variantes na região 3'UTR na ligação de miRNAs. A avalição da interação entre os miRNAs preditos, e a região 3'UTR da PCSK9, e o possível impacto nessa interação na presença de variantes na região 3'UTR, foi realizada em células HEK293FT transfectadas com um plasmídeo contendo a 3'UTR da PCSK9 e um gene repórter da Gaussia luciferase, juntamente com um plasmídeo de expressão contendo os miRNAs de interesse. Foi também estudado o efeito dos miRNAs preditos sobre a expressão, RNAm e proteína, da PCSK9 via RT-qPCR e Western blot, em células HepG2. Foram identificadas 9 variantes na região codificadora da PCSK9, e duas, E32K e R469W, foram selecionadas para os ensaios posteriores. Para a R469W foi observada uma possível alteração conformacional a qual poderia aumentar a afinidade da PCSK9 pelo LDLR. Para a E32K, uma possível associação com HF foi observada em uma família brasileira com ascendência japonesa. As variantes E32K e R469W apresentaram uma redução na atividade do LDLR de 5 e 11%, respectivamente em comparação a PCSK9-WT. Entretanto, não foram observadas reduções estaticamente significativas na atividade do LDLR e na internalização da LDL em células transfectadas com ambas as variantes. Dez variantes foram encontradas na região 3'UTR da PCSK9, entre elas três foram selecionadas por impactar a ligação de quatro miRNAs. Nossos dados demonstraram uma redução significativa na expressão da PCSK9 em células HepG2 transfectadas com os miR-4721 e miR-564 (p=0,036 e p=0,010, respectivamente). Porém, não foi observada diferenças na expressão da luciferase em células transfectadas com esses miRNAs, não sendo possível validar a interação miRNA-RNAm. As variantes no gene *PCSK9* identificadas no nosso estudo podem não explicar individualmente o fenótipo HF, mas podem contribuir para a severidade da doença juntamente com outras variantes em outros genes.

Palavras-chave: Hipercolesterolemia familial, PCSK9, LDLR, estudos funcionais.

### **ABSTRACT**

LOS, B. *In vitro* functional characterization of *PCSK9* variants identified in patients with Familial Hypercholesterolemia. 2019. 140p. Dissertation (Master's Degree) – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

Familial Hypercholesterolemia (FH) is a genetic disorder of lipoprotein metabolism, characterized by elevated plasma cholesterol levels, mostly carried by low-density lipoprotein (LDL). FH is mainly caused by mutations in three genes, LDLR, APOB, and PCSK9. Gain-of-function mutations in PCSK9 reduce LDL receptor levels, resulting in high levels of LDL cholesterol in the plasma. Loss-of-function mutations lead to higher levels of the LDL receptor, resulting in lower LDL cholesterol levels. The Human Genome Project led to a faster technological development related to sequencing methods, which allowed identifying many novel variants associated with FH. However, the mechanisms by which these variants influence cholesterol levels and their interference in therapeutic response are not fully understood. The aim of the present study was to perform an in vitro characterization of the effect of PCSK9 variants identified in FH patients using Next-Generation Sequencing. For the functional characterization of variants in the coding region of PCSK9, the impact of these variants on PCSK9-LDLR interaction was evaluated by molecular docking. HEK293FT cells were transiently transfected with different PCSK9 constructs, and the amount of cell surface LDLR and LDL internalization were determined by flow cytometry. For the variants in PCSK9 3'UTR region, an in silico prediction of PCSK9 3'UTR variants in miRNA seed regions and target sites was performed. To determine whether the predicted miRNAs directly interact with PCSK9 3'UTR region, HEK293FT cells were co-transfected with a vector containing a PCSK9 3'UTR region and a Gaussia luciferase reporter gene, together with an expression plasmid containing the miRNAs of interest. The effect of the predicted miRNAs on the expression of PCSK9 was evaluated using RT-qPCR and Western blot in HepG2 cells transiently transfected with miRNA mimics. Nine missense variants were identified in PCSK9 gene. E32K e R469W were chosen for further analysis. For R469W, a possible conformational change was observed that could increase the affinity of PCSK9 for LDLR, when compared to the wild-type. For E32K, a possible association with FH in a Brazilian family with Japanese ancestry was observed. E32K and R469W had a 5% and 11% decreased level of cell surface LDLR, respectively, as compared with WT-PCSK9. However, no significant reduction in the number of cell surface LDLR and LDL internalization was observed in transfected cells for both variants. Ten variants were found in PCSK9 3'UTR region, of which three were selected for affecting the binding of four miRNAs. Our data demonstrated a significant downregulation of PCSK9 in cells transfected with miR-4721 and miR-564 miRNA mimics, compared to cells transfected with a scramble control (p=0.036and p=0.010, respectively). However, no differences in luciferase expression were observed in cells transfected with these miRNAs, therefore, it was not possible to experimentally validate miRNA-mRNA interaction. *PCSK9* variants found in our study may not fully explain FH phenotype but may contribute to the severity of the disease together with other variants in other genes.

**Keywords:** Familial Hypercholesterolemia; *PCSK9*; *LDLR*; functional studies.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Desenho esquemático dos domínios da PCSK9. Adaptado de SEIDAH <i>et al.</i> , 2009
<b>Figura 2</b> – Degradação do LDLR mediada pela PCSK9.
Figura 3 - Mapa do plasmídeo pcDNA3.1. vazio e contendo o inserto (cDNA da PCSK9), respectivamente.
Fonte: Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA
Figura 4 - Mapa dos plasmídeos pEZX-MT05 e pEZX-MR04, respectivamente. Fonte: GeneCopoeia Inc.,
Rockville, EUA
Figura 5 – Docking molecular do complexo PCSK9-LDLR selvagem (5A, 5C, 5E e 5G) e do complexo com
a PCSK9 mutada (5B, 5D, 5F e 5H) nas posições 237, 443, 469 e 619
Figura 6 – Eletroferograma do sequenciamento por Sanger de um indivíduo portador da variante c.94G>A
(p.E32K) e seus progenitores.
Figura 7 – Análise do produto da digestão do plasmídeo pcDNA3.1 vazio, com o inserto (PCSK9), e com as
variantes E32K e R469W, utilizando a enzima de restrição EcoRI. Gel de agarose 1% (corado com
GelRed <sup>TM</sup> )65
Figura 8 – Análise do produto da digestão do plasmídeo pcDNA3.1 vazio, com o inserto da PCSK9, e com as
variantes E32K e R469W, utilizando a enzima de restrição EcoRI. Gel de agarose 1% (corado com
GelRed <sup>TM</sup> )65
Figura 9 - Eletroferograma do sequenciamento por Sanger dos plasmídeos pcDNA3.1 + PCSK9 e do
pcDNA3.1 + PCSK9*E32K, respectivamente. 66
Figura 10 - Eletroferograma do sequenciamento por Sanger dos plasmídeos pcDNA3.1 + PCSK9 e
pcDNA3.1 + PCSK9*R469W, respectivamente
Figura 11 – Fotomicrografia de células HEK293FT co-transfectadas com o plasmídeo plv-eGFP
Figura 12 – Quantificação do GFP e avaliação da viabilidade de células HEK293FT co-transfectadas com o
plasmídeo plv-eGFP, marcadas com iodeto de propídeo (PI).
<b>Figura 13</b> – Expressão da PCSK9 em células HEK293FT transfectadas
<b>Figura 14</b> – Porcentagem de LDLR em células HEK293FT transfectadas
<b>Figura 15</b> – Porcentagem de internalização de LDL em células HEK293FT transfectadas
Figura 16 – Fotomicrografia da LDLR na superfície celular e internalização de LDL em células HEK293FT
transfectadas
Figura 17 – Rede integrativa entre o RNAm da PCSK9 e seus potenciais miRNAs reguladores76
Figura 18 – Bloco de desequilíbrio de ligação entre as três variantes do gene PCSK977
Figura 19 - Expressão relativa dos miRNAs 48h após a transfecção dos miRNAs miméticos (miR-6875,
miR-4721, miR-564 e miR-4313) e do controle negativo em células HepG2
Figura 20 - Expressão relativa do RNAm da PCSK9 em células HepG2 transfectadas com miRNAs
miméticos (miR-6875, miR-4721 e miR-564) e com o controle negativo.

Figura 21 – Expressão da PCSK9 em células HepG2 transfectadas com os miRNAs miméticos	. 81
Figura 22 – Atividade relativa da luciferase em células HEK293FT.	. 82
Figura 23 – Impacto das variantes na região 3'UTR da PCSK9 na expressão da luciferase	. 83
Figura 24 – Associação entre concentrações de LDL-c e PCSK9 plasmática em pacientes HF	. 86

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência 5'-3' dos iniciadores que foram utilizados na PCR.	41
Tabela 2 – Sequência 5'-3' dos iniciadores que foram utilizados na mutagênese sítio-dirigida	46
Tabela 3 – Variantes da região codificadora do gene PCSK9 selecionadas para análises posteriores	58
Tabela 4 – Predição in silico do risco funcional das variantes na região codificadora	59
Tabela 5 - Dados clínicos e biodemográficos dos pacientes diagnosticados geneticamente por variante	s no
gene da PCSK9.	62
Tabela 6 – Dados clínicos e biodemográficos dos pais do caso index 1.	63
Tabela 7 - Variantes da região 3'UTR do gene PCSK9 selecionadas para análises posteriores	74
Tabela 8 - Predição in silico das variantes na 3'UTR da PCSK9 que impedem ou diminuem a ligação	o de
miRNAs	75
Tabela 9 - Predição in silico do impacto das variantes na região 3'UTR no sítio de ligação dos miR	NAs
selecionados	76
Tabela 10 - Dados clínicos e biodemográficos dos pacientes que apresentaram as três variantes na re	egião
3'UTR da PCSK9	78
Tabela 11 – Características dos 40 pacientes HF	84
Tabela 12 – Perfil lipídico e concentração de PCSK9 nos 40 pacientes HF	85
Tabela 13 - Associação entre a concentração de PCSK9 plasmática e características clínicas em pacie	entes
HF	85

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Vetores de expressão utilizados na etapa de transfecção.	44
Quadro 2 – Vetores de expressão utilizados no ensaio da luciferase	50
Quadro 3 – Vetores co-transfectados em células HEK293FT no ensaio da luciferase.	51
Quadro 4 – Dados dos miRNAs miméticos utilizados para transfectar as células HepG2	
Quadro 5 – Dados dos ensaios da qPCR para análise de expressão de miRNAs.	53
Quadro 6 – Dados dos ensaios da RT-qPCR dos genes de referência.	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'UTR Região 3' não traduzida Região 5' não traduzida 5'UTR

Aminoácidos

**ABraOM** Arquivo Brasileiro Online de Mutações

ALT Alanina aminotransferase APOBApolipoproteína B ApoB-100 Apolipoproteína B-100 Aspartato aminotransferase **AST** Acidente vascular cerebral **AVC** Albumina de soro bovino BSA cDNA DNA complementar CK Creatinoquinase ClinVar Clinical variants CTColesterol total

DAC Doença arterial coronariana DAP Doença arterial periférica **DAPI** 4',6-diamidino-2-phenylindole Dulbecco's Modified Eagle Medium **DMEM** 

Ácido desoxirribonucleico DNA

Ácido etilenodiamino tetra-acético **EDTA EGF** Fator de crescimento epidérmico Exome Aggregation Consortium **ExAC** Fluorescence-activated cell sorting FACS

**FOURIER** Further Cardiovascular Outcomes Research With PCSK9i in Subjects With Elevated Risk

Proteína verde fluorescente **GFP** 

**HAD** Hipercolesterolemia Autossômica Dominante

Hemoglobina glicada HbA1c Vírus da hepatite C **HCV** 

**HDL** Lipoproteína de alta densidade

HDL-c Colesterol da lipoproteína de alta densidade

Hipercolesterolemia Familial HF

HEK293FT Células embrionárias de rim humano 293 HepG2 Células humanas de carcinoma hepático

IAM Infarto agudo do miocárdio **IPA** Ingenuity Pathway Analysis

Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida **IPTG** 

LB Luria-Bertani

LDL Lipoproteína de baixa densidade

Colesterol da lipoproteína de baixa densidade LDL-c

Receptor de LDL **LDLR** 

Soro deficiente de lipoproteínas **LPDS** Proteína adaptadora do LDLR 1 LDLRAP1 mAb Anticorpos monoclonais

MAF Frequência do alelo menos comum

miRNA, microRNA miR

National Center for Biotechnology Information **NCBI** 

NCI National Cancer Institute ncRNA RNAs não codificadores NIH National Institutes of Health **OMS** Organização Mundial da Saúde

Pares de bases pb

**PBS** Tampão Fosfato Salino PCR Reação em Cadeia pela Polimerase

PCSK9 Pró-proteína convertase subtilisina/kexina 9

PDB Protein Data Bank

PolymiRTS Polymorphism in microRNAs and their TargetSites

Polyphen-2 Polymorphism Phenotyping v2 **PROVEAN** Protein Variation Effect Analyzer **RBPs** Proteínas de ligação a RNA Retículo Endoplasmático RE Ácido ribonucleico **RNA RNAm** RNA mensageiro RNAi RNA de interferência SFB Soro fetal bovino

SIFT Sorting Intolerant From Tolerant

SNC Sistema nervoso central

SNP Polimorfismo de nucleotídeo único

SREBP2 Proteínas de ligação ao elemento regulador de esterol 2

T4 livre Tetraiodotironina livre TBE Tris-Borato-EDTA

TSH Hormônio estimulante da tireoide

X-gal Bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo

## SUMÁRIO

1.	INT	ro	DUÇÃO	23
	1.1.	Hip	ercolesterolemia familial	23
	1.1.1.		Epidemiologia e Fisiopatologia	23
	1.1.	2.	Genética da Hipercolesterolemia familial	24
	1.2. Pró		-proteína Convertase Subtilisina/Kexina 9	25
	1.2.	1.	Inibidores de PCSK9	29
	1.2.	2.	Associação de variantes do gene PCSK9 com HF	30
	1.2.	2.1.	Variantes na região codificadora	30
	1.2.	2.2.	Variantes nas regiões reguladoras da PCSK9	32
	1.3. Л	J <b>ST</b> ]	FICATIVA	34
2.	OB	JET	IVOS	34
	2.1.	Obj	etivo geral	34
	2.2.	Obj	etivos específicos:	34
3.	CA	SUÍ	STICA E METODOLOGIA	37
	3.1.	Cas	uística	37
	3.1.	1.	Aspectos éticos	37
	3.1.	2.	Determinações laboratoriais	38
	3.2.	Ext	ração de DNA Genômico	38
	3.3.	Seq	uenciamento de Nova Geração	39
	3.4.	Sele	eção das variantes no gene <i>PCSK9</i>	39
3.4.1. 3.4.2. 3.4.3. 3.4.4.		1.	Análise in silico das variantes na região codificadora	40
		2.	Docking molecular	40
		3.	Sequenciamento de DNA por Sanger	40
		4.	Análise in silico das variantes na região 3' não traduzida	41
	3.5.	Cul	tivo Celular	42
	3.6.	Pre	paro das células Escherichia coli quimiocompetente	43
	3.7.	Tra	nsformação das células Escherichia coli quimiocompetente	43
	3.8.	Mu	tagênese sítio-dirigida das variantes da região codificadora da <i>PCSK9</i>	45

	3.9.	Transfecção nas células HEK293FT	. 46
	3.10.	Viabilidade celular	. 47
	3.11.	Expressão da PCSK9 por Western Blotting	. 47
	3.12. fluxo	Quantificação da atividade do LDLR e internalização do LDL por citometria 49	. de
	3.13.	Microscopia Confocal de Varredura a Laser	. 49
	3.14. utiliza	Transformação das células <i>Escherichia coli</i> quimiocompetente com os vetoro dos no ensaio da luciferase	
	3.15.	Ensaio da luciferase em células HEK293FT	51
	3.16.	Transfecção de miRNA miméticos em células HepG2	52
	3.17.	Extração de RNA total de células HepG2	. 52
	3.18.	Análise de miRNAs pela PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)	. 53
	3.19.	Análise de RNAm pela PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)	. 54
	3.19	0.1. Seleção do gene de referência	. 54
	3.20.	Expressão da PCSK9 por Western Blotting	55
	3.21.	Quantificação da PCSK9 no plasma de pacientes HF	55
	3.22.	Análise Estatística	. 55
4	. RES	SULTADOS	. 58
	4.1.	Seleção das variantes do gene <i>PCSK9</i>	. 58
	4.1.	1. Variantes na região codificadora	. 58
	4.1.	2. Docking molecular	. 59
	4.1.	3. Diagnóstico genético: gene <i>PCSK9</i>	. 62
	4.2.	Transformação	. 64
	4.2.	1. Confirmação da inserção da mutação por Sequenciamento	. 65
	4.3.	Transfecção das células HEK293FT	. 67
	4.4.	Análise da PCSK9 por Western Blotting em células HEK293FT transfectadas	. 70
4.5. Quantificação da atividade do receptor de LDL em células HEK29 transfectadas			71
	4.6.	Microscopia confocal	73
	4.7.	Seleção das variantes na região 3'UTR da <i>PCSK9</i>	
	4.8.	Expressão dos miRNAs miméticos transfectados em células HepG2	. 78

	Expressão do RNAm da <i>PCSK9</i> em células HepG2 transfectadas com miRN ticos	
4.10.	Expressão da PCSK9 em células HepG2 transfectadas com os miRNAs ticos	
4.11.	Ensaio da Luciferase em células HEK293FT	81
4.12.	Quantificação da PCSK9 no plasma de pacientes HF	83
5. DIS	CUSSÃO	88
6. CON	CLUSÕES	101
REFER	ÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
ANEXO	OS	112

## 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Hipercolesterolemia familial

## 1.1.1. Epidemiologia e Fisiopatologia

A Hipercolesterolemia Familial (HF) é uma doença genética que afeta o metabolismo das lipoproteínas, caracterizada pelo aumento do colesterol plasmático, transportado principalmente pela lipoproteína de baixa densidade (LDL) (LDL-c >160 mg/dL), e pela presença de sinais clínicos característicos, como xantomas tendíneos, arco córneo e aumento do desenvolvimento da doença arterial coronariana (DAC) prematura (KHACHADURIAN, 1964; SANTOS et al., 2012).

A HF foi primeiramente descrita por Carl Müller em 1938 como um "erro inato do metabolismo" de origem monogênica, que propiciava um aumento nas concentrações de colesterol no sangue e infarto do miocárdio em jovens (MÜLLER, 1938).

Em 1964, Khachadurian definiu o modo de herança da HF em *pedigrees* libaneses. Nesse estudo, o autor mostrou que indivíduos de famílias afetadas poderiam segregar em três grupo diferentes com base em suas concentrações plasmáticas de colesterol total: (i) homozigotos com concentrações de colesterol quatro vezes mais altas do que a normal; (ii) heterozigotos com concentrações duas vezes mais altas do que a normal e; (iii) indivíduos não afetados. Desse modo, ele concluiu que o modo de herança da HF era do tipo autossômico codominante (KHACHADURIAN, 1964).

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), a HF ocorre em cerca de 10 milhões de indivíduos no mundo (WHO, 1997). Tradicionalmente a prevalência da forma homozigota da doença tem sido descrita como 1:1.000.000, enquanto a heterozigota afetaria aproximadamente 1:500 indivíduos (GOLDSTEIN; HOBBS; BROWN, 2001). Entretanto, dados recentes indicam frequências maiores, 1:160.000-300.000 da forma homozigota, e 1:200-300 da heterozigota, implicando em mais de 30 milhões de indivíduos afetados pelo mundo, dos quais menos de 5% tem seu diagnóstico estabelecido (VALLEJO-VAZ *et al.*, 2015). Sendo que no Brasil, menos de 1% tem seu tem seu diagnóstico estabelecido (NORDESTGAARD *et al.*, 2013).

Estima-se que os portadores da forma heterozigota de HF terão um evento cardiovascular antes dos 65 anos de idade com chance de 85% para os homens e 50% para as mulheres. Na ausência do tratamento, cerca de 50% dos homens e 12% das mulheres desenvolvem DAC antes dos 50 anos (FALUDI *et al.*, 2017). Estudos mostram que a principal causa de morte entre os portadores de HF é a DAC, fato que poderia ser evitado se um tratamento adequado fosse aplicado (WHO, 1997; SSC, 1991). Tendo isso em vista, pesquisas conduzidas utilizando o uso de hipolipemiantes, principalmente estatinas, em pacientes com HF mostraram que o início precoce do tratamento com hipolipemiante reduz em 80% o risco de DAC, e que indivíduos acima de 55 anos tiveram as mesmas taxas de infarto do miocárdio que seus pares da população geral sem HF (VERSMISSEN *et al.*, 2008).

Crianças com HF geralmente possuem disfunção endotelial e aumento da espessura da camada média íntima das artérias carótidas, fator preditor de aterosclerose prematura na vida adulta. Quando tratadas com hipolipemiante por dois anos, as crianças apresentam uma regressão significativa na aterosclerose carotídea, sem afetar o crescimento, maturação sexual, concentração hormonal, enzimas hepáticas ou musculares (RAAL *et al.*, 2011). Devido a esses fatores, a identificação de indivíduos portadores de HF e seus familiares, assim como a administração precoce de terapia hipolipemiante e sua manutenção ao longo da vida contribui na prevenção da doença cardiovascular prematura e diminui o risco de morte nesses indivíduos (FALUDI *et al.*, 2017).

### 1.1.2. Genética da Hipercolesterolemia familial

O fenótipo clínico da HF é geralmente causado por variantes encontradas principalmente em três genes, o gene do receptor de LDL (*LDLR*) (BROWN & GOLDSTEIN, 1976; HOBBS *et al.*, 1986), da Apolipoproteína B (*APOB*) (SORIA *et al.*, 1989) e da Pró-proteína convertase subtilisina/kexina 9 (*PCSK9*) (ABIFADEL *et al.* 2003).

Mutações no *LDLR* são responsáveis por cerca de 80% dos casos de HF, e prejudicam a sua síntese, montagem, transporte, reciclagem ou formação de vesículas (HENDERSON *et al.*, 2016). Em indivíduos heterozigotos, a ausência de um alelo normal já é suficiente para causar um aumento da LDL plasmática em cerca de duas vezes mais do

que o normal (GOLDSTEIN & BROWN, 1989). Já em indivíduos homozigotos, os receptores de LDL não têm funcionalidade, levando a uma hipercolesterolemia grave (650 a 1.000 mg/dL) (GOLDSTEIN & BROWN, 1989).

A hipercolesterolemia devida à mutação no gene da *APOB* é conhecida como Defeito Familial da apo B. A Apo B-100 defeituosa possui menor afinidade pelo LDLR, portanto as LDLs não são removidas da circulação para o interior das células. A variante mais comum no gene *APOB* é a substituição R35000Q, que corresponde a 5-10% dos casos de HF nas populações do norte da Europa, sendo rara em outras populações (VARRET *et al.*, 2008). Outra etiologia para o fenótipo HF é a Hipercolesterolemia Autossômica Dominante (HAD) atribuída ao aumento da atividade da PCSK9, que leva à maior degradação do LDLR devido às mutações do gene com ganho de função (VARRET *et al.*, 2008; HORTON; COHEN; HOBBS, 2007). Essas mutações são responsáveis por até 1% dos casos de HF (HENDERSON *et al.*, 2016).

Na maioria dos casos, inclusive nos citados acima, o modo de herança é autossômico dominante, porém há alguns casos raros de herança autossômica recessiva. A HF autossômica recessiva é associada principalmente com mutações no gene que codifica a proteína adaptadora do LDLR (*LDLRAP1*). Essas mutações comprometem principalmente a ligação da LDL ao receptor da LDL (LDLR), e, consequentemente, a internalização da LDL; a expressão do LDLR; e por fim, impedem que o LDLR atinja a membrana plasmática das células (GARCIA *et al.*, 2001).

O restante dos casos de HF são poligênicos (causados por mutações em mais de um gene) ou resultantes de mutações monogênicas cuja prevalência ainda não está determinada (HENDERSON *et al.*, 2016).

## 1.2. Pró-proteína Convertase Subtilisina/Kexina 9

Em humanos, o gene *PCSK9* está localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p32) e contém 12 exons e 11 introns (SEIDAH & PRAT, 2007; DAVIGNON, DUBOC, SEIDAH, 2009). Este gene codifica uma proteína madura a qual é produzida e secretada principalmente no fígado, em menor extensão nos rins e intestinos, e é transitoriamente expressa no sistema nervoso central (SNC) durante a embriogênese (SEIDAH *et al.*, 2003;

AWAN; BASS; GENEST, 2014). Estudos de hibridização *in situ* mostraram que o RNA mensageiro (RNAm) da *PCSK9* também é abundante na parede de artérias umbilicais embrionárias, incluindo células presuntivas do músculo liso e membranas embrionárias (SEIDAH *et al.*, 2014).

A PCSK9 pertence à família de pró-proteínas convertase subtilisina/kexina (PCSK), e foi primeiramente descrita por Seidah e colaboradores em 2003 (SEIDAH *et al.*, 2003). Esta pró-proteína abriga uma sequência de sinal (região N-terminal, 1-30 aminoácidos - aa), um pró-domínio (31-152 aa), um domínio catalítico (153-425 aa), seguido por uma longa região C-terminal (426-692 aa) (SEIDAH *et al.*, 2003) a qual possui três módulos, o módulo 1 (457-527 aa), módulo 2 (534-601 aa) e módulo 3 (608-692 aa) (**Figura 1**) (DU *et al.*, 2011).



**Figura 1** – Desenho esquemático dos domínios da PCSK9. Adaptado de SEIDAH *et al.*, 2009.

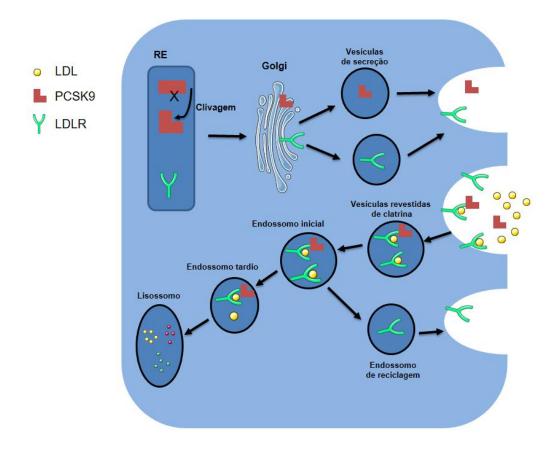
Nota: sp: sequência de sinal; Pro: pró-domínio (pró-segmento); catalítico: domínio catalítico; CHRD: região C-terminal; M1: módulo 1; M2: módulo 2; M3: módulo 3.

A proteína é sintetizada como um precursor, o qual guia a proteína para o retículo endoplasmático (RE). Uma vez no RE, a sequência sinal é clivada. Para sair dessa organela a pró-proteína (pró-PCSK9) (31-692 aa) deve sofrer uma clivagem auto-catalítica entre o pró-domínio e o domínio catalítico (sequência Val-Phe-Ala-Gln152\\$er-Ile-Pro) para liberar a proteína madura (153-692 aa) (SEIDAH *et al.*, 2003; NAURECKIENE *et al.*, 2003; SEIDAH *et al.*, 2014).

Esse processo auto-catalítico elimina a propriedade proteolítica da PCSK9 madura, pois o pró-domínio rapidamente ocupa o domínio catalítico. O pró-domínio permanece ligado à proteína madura, agindo como uma chaperona, auxiliando no transporte da PCSK9 através da via secretora. Esse processo é necessário para que haja a secreção apropriada da PCSK9 do RE para o Complexo de Golgi (**Figura 2**) (SEIDAH *et al.*, 2008; ZAID *et al.*, 2008). Para que isso aconteça, a proteína é revestida em vesículas do componente COPII

(CHEN *et al.*, 2013). A proteína madura secretada sofre uma série de modificações póstraducionais, incluindo fosforilação, glicosilação e sulfatação da tirosina (SEIDAH, 2009; HORTON; COHEN; HOBBS, 2009).

A atividade da PCSK9 está relacionada com sua ligação a proteínas-alvo específicas e com o direcionamento do complexo resultante para compartimentos de degradação intracelular (SEIDAH et al., 2014). O primeiro alvo da PCSK9 identificado foi o LDLR na superfície de hepatócitos (BENJANNET et al., 2004; MAXWELL et al., 2004; PARK et al., 2004). A PCSK9 madura interage com o domínio homólogo ao fator de crescimento epidérmico (EGF) do LDLR na superfície celular, através de interações proteína-proteína com o LDLR, numa região perto do domínio catalítico da PCSK9 (KWON et al., 2008). Este complexo PCSK9-LDLR é internalizado via vesículas revestidas de clatrina. Devido ao pH ácido dos endossomos, a afinidade da PCSK9 pelo LDLR aumenta, e esse complexo não é desassociado, o que resulta no direcionamento do LDLR ao lisossomo para degradação, impedindo a reciclagem do receptor e, consequentemente, a sua volta à superfície celular para posterior captação de LDL (**Figura 2**) (CUNNINGHAM et al., 2007).



**Figura 2** – Degradação do LDLR mediada pela PCSK9.

Nota: A PCSK9 sofre uma clivagem auto catalítica no Retículo Endoplasmático (RE). O pró-domínio clivado associado com o domínio catalítico permite que a proteína madura saia do RE em direção à via secretora. A PCSK9 secretada liga-se ao LDLR na superfície celular. O complexo LDLR-PCSK9 é internalizado e direcionado para o lisossomo, onde é degradado. Adaptado de HORTON; COHEN; HOBBS, 2009.

Estudos mostraram que a PCSK9 também direciona outros receptores de membrana da superfamília do LDLR, VLDLR e ApoER2, para a degradação nos endossomos/lisossomos (POIRIER *et al.*, 2008; SHAN *et al.*, 2008). Outro estudo mostrou que a PCSK9 pode aumentar a degradação da proteína relacionada ao LDLR (LRP1) *in vitro* (CANUEL *et al.*, 2013). Dados mostraram que a PCSK9 também tem como alvo dois receptores hepáticos do vírus da hepatite C (HCV) (LABONTÉ *et al.*, 2009).

Os genes *PCSK9* e *LDLR* são regulados pelas SREBP2. A concentração do colesterol intracelular é o principal regulador da transcrição do gene da *PCSK9* via SREBP2. A diminuição do colesterol intracelular aumenta a expressão da *PCSK9*, mecanismo compartilhado pela estatina (AWAN; BASS; GENEST, 2014; HORTON; COHEN; HOBBS, 2007). As estatinas reduzem o LDL-c por inibirem a via de biossíntese

do colesterol e também por induzirem a expressão de SREBP-2, o que leva a um aumento na expressão de LDLR (HUA, *et al.*, 1993; SHENG, *et al.*, 1995), porém também aumenta a expressão gênica da *PCSK9* (DUBOC *et al.*, 2004; RASHID *et al.*, 2005).

O aumento da expressão da *PCSK9* diminui o efeito de redução do colesterol das estatinas, consequentemente, a diminuição da expressão da *PCSK9* aumenta a indução da expressão do LDLR pelas estatinas e acelera a remoção da LDL, como observado quando estatinas foram administradas em ratos *knockout* para *PCSK9* (RASHID *et al.*, 2005). A diminuição das concentrações plasmáticas do LDL-c associadas com mutações de perda de função no *PCSK9* indicam que a inibição de *PCSK9* utilizando pequenas moléculas, como anticorpos ou RNAi, poderia ser uma alternativa efetiva para diminuir o colesterol independente das estatinas (HORTON; COHEN; HOBBS, 2007).

#### 1.2.1. Inibidores de PCSK9

Várias companhias farmacêuticas estão testando diferentes formas de inibir a PCSK9 (SEIDAH *et al.*, 2013; STEIN, 2013; POIRIER & MAYER, 2013). A melhor abordagem até o momento é o uso de anticorpos monoclonais (mAB) anti-PCSK9, os quais bloqueiam a ligação da PCSK9 ao LDLR. Estes anticorpos foram testados em camundongos e macacos e mostraram uma redução de aproximadamente 80% nas concentrações de LDL-c por mais de uma semana (CHAN *et al.*, 2009). Testes clínicos em humanos realizados pelas empresas Sanofi/Regeneron e Amgen mostraram uma redução do LDL-c entre 60-70% quando foram injetados via subcutânea 140 a 150 mg de mAb a cada duas semanas, sem alteração nas enzimas hepáticas (SEIDAH *et al.*, 2013; STEIN, 2013).

Em um estudo recente do "Further Cardiovascular Outcomes Research With PCSK9i in Subjects With Elevated Risk" (FOURIER), 27.564 pacientes com doença cardiovascular aterosclerótica, os quais já estavam em terapia com estatinas e apresentavam concentrações de LDL-c maiores ou iguais a 70 mg/dL, foram randomizados em dois grupos, um grupo composto por 13.784 pacientes que recebeu Evolocumabe (mAB anti-PCSK9 da empresa Amgen) e um grupo placebo (13.780 pacientes). Após um acompanhamento de 2,2 anos, o estudo mostrou que o Evolocumabe, quando administrado em associação com estatinas, reduz as concentrações de LDL-c em aproximadamente 59%,

e também o risco de eventos cardiovasculares em pacientes com doença cardiovascular aterosclerótica (SABATINE *et al.*, 2017). Apesar de esses dados sugerirem que a inibição do PCSK9 é benéfica para a redução das concentrações do LDL-c, isto pode aumentar a capacidade infecciosa de certos vírus, como o HCV; por isso, mais estudos devem ser realizados para verificar a segurança de essa estratégia terapêutica (SEIDAH *et al.*, 2014).

## 1.2.2. Associação de variantes do gene *PCSK9* com HF

## 1.2.2.1. Variantes na região codificadora

As variantes conhecidas na *PCSK9* podem levar ao aumento ou diminuição da função da proteína, as quais são associadas ao aumento ou diminuição da LDL-c, respectivamente. Quando há mutações de ganho de função na PCSK9, há um aumento da afinidade desta proteína pelo LDLR, especialmente na presença de um pH ácido (FISHER *et al.*, 2007; SOUTAR & NAOUMOVA, 2007). Entretanto, mutações de perda de função impedem a secreção da PCSK9 por interromper a sua síntese ou secreção (ZHAO *et al.*, 2006).

No estudo de Abifadel e colaboradores em 2003, quando este gene foi identificado como novo *locus* de associação para HAD foram encontradas duas mutações, F216L e S127R, em três famílias francesas (ABIFADEL *et al.*, 2003). Em uma pesquisa realizada em 51 pacientes noruegueses diagnosticados com hipercolesterolemia, onde variantes nos genes *LDLR* e *APOB* não foram observadas, identificou-se a presença de duas novas variantes do tipo *missense* (D374Y e N157K) na *PCSK9*. Dois pacientes heterozigotos para D374Y e um paciente heterozigoto para ambas. A variante D374Y foi encontrada segregando com HF em duas famílias (LEREN, 2004).

Em 2005, Cohen e colaboradores sequenciaram a região codificadora da *PCSK9* em indivíduos com concentrações baixas de LDL-c (<58 mg/dL) em uma população afroamericana. Neste estudo, um a cada 50 indivíduos tinham uma mutação *nonsense* no gene *PCSK9* (Y142X ou C679X) que promoveu a diminuição das concentrações do LDL-c em aproximadamente 40% (COHEN *et al.*, 2005). Em um estudo prospectivo de 15 anos em uma população birracial, mutações *nonsense* no gene da *PCSK9* foram associadas a uma

redução de 28% da concentração do LDL-c, e à diminuição na frequência de DAC em 88% (COHEN *et al.*, 2006).

Em um estudo de 2005, foram analisadas as regiões codificadoras e intrônicas da *PCSK9* em 130 pacientes com HAD, onde não foram encontradas variantes nos genes *LDLR* e *APOB*. Quatro novas mutações do tipo *missense* foram identificadas (c.654A>T, c.1070G>A, c.1405C>T e c.1327G>A). Com a exceção da variante c.1327G>A, todas modificam uma região altamente conservada. A variante c.654A>T foi encontrada em um paciente francês que tinha um colesterol total (CT) de 402 mg/dL, LDL-c de 293 mg/dL, e apresentava sinais clínicos como xantomas tendinosos e arco córneo. Essa variante estava ausente em 415 controles de diferentes etnias (França, Canadá, Espanha, Líbano e Grécia). A variante c.1070G>A foi encontrada em uma paciente da Normandia (França), e estava ausente em 370 controles. A variante c.1405C>T foi encontrada em uma paciente da República dos Camarões e estava ausente em 340 controles. Por fim, a variante c.1327G>A, foi encontrada em uma paciente com hipercolesterolemia moderada (CT ≤ 240 mg/dL), e estava ausente em 340 controles. Porém, esta variante se encontra em uma região não conservada, sendo possivelmente uma variante neutra (ALLARD *et al.* 2005).

Em 2006, Cameron e colaboradores estudaram o efeito de quatro mutações de perda de função (R46L, G106R, N157K e R237W) e duas mutações de ganho de função (S127R e D374Y) no gene *PCSK9* em células HepG2 transfectadas. As quatro mutações de perda de função aumentaram a concentração de LDLR na superfície celular em 16% e a internalização do LDL em 35%, quando comparadas com as células não transfectadas. Em contraposição, as duas mutações de ganho de função diminuíram em 23% as concentrações de LDLR na superfície celular e em 38% a internalização do LDL, quando comparadas com o controle (CAMERON *et al.*, 2006).

Cameron e colaboradores (2009) realizaram um estudo funcional *in vitro* com células de linhagem HepG2 transfectadas com variantes encontradas no gene *PCSK9*. As análises dos experimentos realizados utilizando citometria de fluxo mostraram que as células transfectadas com a variante S462P não foram capazes de degradar os LDLR, sendo provavelmente uma mutação que causa perda de função (CAMERON *et al.*, 2008).

Fasano e colaboradores (2009) avaliaram o efeito de quatro mutações de ganho de função, D374H, N425S, R496W e D129N. Neste estudo foi observado que nas células

HEK293T transfectadas com a variante D374H a proteína LDLR desapareceu quase completamente. Após essa etapa, os autores incubaram linfócitos imortalizados com meio de cultura proveniente das HEK293T transfectadas com cada uma das variantes, e avaliaram por citometria de fluxo a quantidade de LDLR na superfície celular. A variante D374H apresentou cerca de 77% de redução no LDLR em comparação aos controles, já as demais variantes D129N (~12.8% de redução), N425S (~6% redução) e R496W (~7.4% redução), apresentaram uma pequena, mas significativa, redução nas concentrações de LDLR na superfície celular, quando comparadas com os controles (FASANO *et al.*, 2009).

Abifadel e colaboradores, em 2012, realizaram uma caracterização funcional *in vitro* de duas novas mutações encontradas no gene *PCSK9* e observaram que a mutação L108R resulta em uma enzima com ganho de função, aumentando em cerca de duas vezes a degradação do LDLR, enquanto a mutação D35Y provavelmente cria um novo sítio de sulfatação de uma Tir, a qual pode aumentar a atividade intracelular da PCSK9 (ABIFADEL *et al.*, 2012).

Recentemente, DI TARANTO e colaboradores. (2017), mostraram que as variantes S636R e R357C aumentam em quase o dobro a afinidade da PCSK9 pelo LDLR quando comparadas com a PCSK9-WT (DI TARANTO *et al.*, 2017). Elbitar e colaboradores (2018) realizaram um estudo funcional da variante R96C. Nesse estudo eles demonstraram que células, HEK293 e HepG2, transfectadas com essa variante tiveram uma maior redução na porcentagem de LDLR na superfície celular e na internalização de LDL, quando comparadas com a PCSK9-WT (ELBITAR *et al.*, 2018).

## 1.2.2.2. Variantes nas regiões reguladoras da PCSK9

As variantes nas regiões não codificadoras, apesar de não alterarem a sequência proteica, podem afetar a regulação da expressão gênica, o que pode modificar vias moleculares e processos celulares, influenciando no fenótipo de uma doença (STERI *et al.*, 2017).

Blesa e colaboradores, em 2008, avaliaram 42 pacientes espanhóis com HAD, nos quais não foram encontradas mutações nos genes *LDLR* e *APOB*. Neste estudo foram identificadas duas novas variantes na região promotora do *PCSK9*, c.-288G>A e c.-

332C>A. Avaliando se a atividade da transcrição seria alterada pela presença dessas variantes, eles observaram que a variante c.-288G>A não alterou a transcrição do RNA mensageiro (RNAm) da *PCSK9*, enquanto a variante c.-288G>A aumentou em cerca de 2,5 vezes a transcrição do RNAm em comparação aos controles (BLESA *et al.*, 2008).

Em um estudo do nosso grupo foi identificado que a variante c.\*614C>T, apesar de não impactar as concentrações lipídicas em pacientes HF, foi associada com concentrações reduzidas de HDL-c em pacientes normolipidemicos (ZAMBRANO *et al.*, 2015). Nesse estudo foi também sugerido que a variante c.\*614C>T possivelmente cria novos sítios de ligação de microRNAs (miRNA), o que poderia contribuir para uma diminuição da expressão da *PCSK9* (ZAMBRANO *et al.*, 2015).

MiRNAs são pequenos RNAs não codificadores (ncRNA) que atuam na expressão gênica através do pareamento de bases entre o miRNA e os elementos de reconhecimento (*seeds*), localizados principalmente na região 3' não traduzida (3'UTR) dos RNAm alvo, o que inibe a tradução ou leva à degradação dos seus alvos (STERI *et al.*, 2017).

A região 3'UTR está envolvida em processos regulatórios, incluindo a estabilidade do RNA, tradução e localização do RNAm. Essa região é caracterizada por conter sítios de ligação de proteínas de ligação a RNA (RBPs) e miRNAs (STERI *et al.*, 2017). Variantes nessa região podem modificar a estrutura secundária do RNAm, afetando a acessibilidade aos elementos de reconhecimento (*seeds*) ou abolindo o sítio de ligação de miRNAs no RNAm maduro (HARIHARAN *et al.*, 2009), e também afetar os sítios de ligação de RBPs, levando a alterações na expressão gênica (STERI *et al.*, 2017).

Há evidências que mostram a importância dos miRNAs na regulação de genes envolvidos na homeostase do colesterol, incluindo a *PCSK9* (MOMTAZI *et al.* 2017). Apesar de poucos miRNAs que modulem a expressão da *PCSK9* terem sido validados até o momento, estudos *in vitro* recentes mostraram que o miR-191, miR-222 e o miR-224 têm como alvo o RNAm da *PCSK9* e diminuem significativamente sua expressão (NAELI *et al.*, 2017). A manipulação terapêutica de miRNAs validados, através de miRNAs miméticos ou inibidores, pode ser uma abordagem efetiva para reduzir as concentrações de LDL-c e o risco de doenças cardiovasculares em pacientes HF (MOMTAZI *et al.* 2017).

### 1.3. JUSTIFICATIVA

Avaliar a relação das diferentes variantes encontradas nos estudos de sequenciamento de nova geração com a presença da hipercolesterolemia em pacientes com diagnóstico clínico de HF é de grande importância para diferenciar mutações patogênicas de variantes raras silenciosas, consequentemente estabelecendo a relação genótipo-fenótipo e suas implicações clínicas no risco cardiovascular (SILVA et al., 2012). Em virtude disso, pesquisas vêm sendo conduzidas tentando avaliar funcionalmente as variantes encontradas no gene PCSK9 (CAMERON et al., 2006; CAMERON et al., 2008; FASANO et al., 2009; ABIFADEL et al., 2012, ELBITAR et al., 2018). No entanto, estudos ainda são necessários para caracterizar funcionalmente todas as variantes identificadas neste gene. A caracterização precisa dessas variantes irá contribuir para o estabelecimento do diagnóstico melhor genético-fenotípico e contribuir para um direcionamento Adicionalmente, avaliar o impacto de variantes em regiões reguladoras da PCSK9 podem contribuir para a descoberta de novos biomarcadores que auxiliem no diagnóstico ou tratamento desses indivíduos.

#### 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar *in vitro* o efeito de variantes no gene *PCSK9* identificadas em pacientes com Hipercolesterolemia Familial.

## 2.2. Objetivos específicos:

- Avaliar in silico o impacto de variantes missense no complexo PCSK9-LDLR;
- Avaliar a captação de LDL em células HEK293FT transfectadas com a PCSK9 com e sem as variantes do tipo *missense*;
- Avaliar a atividade do LDLR em células HEK293FT transfectadas com a PCSK9 com e sem as variantes do tipo missense;
- Estudar a influência de variantes na região 3'UTR da PCSK9 na ligação de miRNAs;

- Estudar o efeito de miRNAs sobre a expressão (RNAm e proteína) da PCSK9;
- Avaliar a expressão da PCSK9 no plasma de pacientes HF.

# CASUÍSTICA E MEDOLOGIA

"Se conhecêssemos um objeto apenas qualitativamente, nós o conhecemos apenas de maneira vaga. Se o conhecemos quantitativamente – entendendo alguma medida numérica que o distingue de um número infinito de outras possibilidades –, começamos a conhecê-lo profundamente. Percebemos parte da sua beleza e temos acesso ao seu poder e à compreensão que ele propicia. Ter medo da quantificação equivale a renunciar aos nossos direitos civis, abrindo mão de uma das esperanças mais potentes de compreender e transformar o mundo." (Bilhões e Bilhões – Carl Sagan)

## 3. CASUÍSTICA E METODOLOGIA

#### 3.1. Casuística

O presente estudo faz parte do projeto temático intitulado "Caracterização genética, epigenética e farmacogenética de pacientes portadores de hipercolesterolemia familial na população brasileira", sob a coordenação do Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata, que foi concedido pela FAPESP em 1º de março de 2018 (processo nº 2016/12899-6). Os dados do sequenciamento são provenientes de um estudo do nosso grupo intitulado "Ultrassequenciamento exômico dos principais genes relacionados com hipercolesterolemia familial". Nesse estudo foram selecionados e sequenciados 48 pacientes, conforme o diagnóstico fenotípico de HF, segundo o critério Dutch Lipid Clinic Network – US Make Early Diagnosis Prevent Early Death Program (Dutch-MEDPED) (Quadro supl. 1), provenientes da Seção Médica de Dislipidemias do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC), do Programa Hipercol Brasil do Instituto do Coração (INCOR) da Faculdade de Medicina da USP (FM-USP) e da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Não foram incluídos os indivíduos com insuficiência hepática, insuficiência renal 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.

## 3.1.1. Aspectos éticos

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF-USP), parecer 2.708.638 e do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC), parecer 2.587.235. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

## 3.1.2. Determinações laboratoriais

As amostras de sangue foram coletadas em tubo com anticoagulante Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) para a realização das determinações laboratoriais. A quantificação da concentração de glicose, colesterol total (CT), colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-c), colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), triglicérides, ureia e ácido úrico, foram realizados no equipamento Vitros 5600 (Johnsons & Johnsons, Nova Jersey, EUA), utilizando o método colorimétrico. Para determinar os valores do hormônio estimulante da tireoide (TSH), tetraiodotironina livre (T4 livre) e insulina foi utilizado o método de quimiluminescência automatizada no equipamento ARCHITECH2000 (Abbott, Illinois, EUA). A Apolipoproteína A1 e Apolipoproteína B-100 foram dosadas pelo método de nefelometria no equipamento ARCHITECH2000 (Abbott, Illinois, EUA). A determinação da creatinina sérica, creatinoquinase (CK), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foi realizada pelo método cinético no ultravioleta (UV), utilizando o ARCHITECH2000 (Abbott). O hemograma completo foi realizado pelo método citoquímico/isovolumétrico no equipamento Cell Dym - Ruby (Abbott, Illinois, EUA). O valor percentual da hemoglobina glicada (HbA1c), foi obtido pelo método de imunoturbidimetria no ARCHITECH2000 (Abbott, Illinois, EUA).

#### 3.2. Extração de DNA Genômico

A extração do DNA genômico, das amostras de sangue total colhidas em tubo de EDTA, foi realizada utilizando o *kit QIAamp® DNA Blood Maxi (QIAGEN*, GmbH, Alemanha), segundo as recomendações do fabricante. A quantificação do DNA genômico extraído foi realizada pelo método fluorimétrico utilizando o equipamento *QUBIT®* (*Life Technologies*, Forest City, EUA) e a pureza (relação A260/280) das amostras de DNA foram determinadas por espectrofotometria no UV, conforme implementada na plataforma *NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.)*. A integridade das amostras de DNA foi analisada por eletroforese utilizando-se o 2200 *TapeStation* (Agilent Technologies). As

alíquotas das amostras de DNA foram armazenadas a -20°C. O DNA genômico foi utilizado para o diagnóstico molecular de HF por sequenciamento de DNA.

## 3.3. Sequenciamento de Nova Geração

Para o sequenciamento foi montado um painel de 61 genes, incluindo a *PCSK9*, no *site* de *Design Studio* da Illumina (https://accounts.illumina.com/), sendo selecionados os exons e as regiões flanqueadoras destes genes, os quais foram previamente relacionados com HF, vias metabólicas do colesterol e farmacogenética de hipolipemiantes. Resumidamente, a preparação de biblioteca de DNA foi realizada utilizando um sistema customizado *Nextera® XT DNA Sample Preparation Kit* (Illumina). O sequenciamento foi realizado utilizando o *MiSeq Reagent kit* (300 ciclos) e o equipamento MiSeq (Illumina). As análises primária, secundária e terciária foram realizadas utilizando as seguintes ferramentas: *Real Time Analysis*, *MiSeq Reporter*, *BaseSpace*, *Sequence Hub* e *VariantStudio*, respectivamente.

### 3.4. Seleção das variantes no gene PCSK9

As variantes encontradas nos 48 pacientes sequenciados foram selecionadas com base na frequência alélica menor que 5%, obtidas utilizando os bancos de dados 1000 Genomes (http://www.internationalgenome.org/) e o Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM) (Tabela supl. 1). Aquelas que apresentaram frequência alélica maior do que 5% nas duas bases de dados foram consideradas benignas seguindo a classificação de Richards e colaboradores (2015). O cálculo da frequência alélica das variantes na amostra populacional desse estudo foi feito utilizando a seguinte fórmula ((2\*homozigoto + heterozigoto)/2n)\*100. Para verificar se as variantes encontravam-se em desequilíbrio de ligação foi utilizado a ferramenta LDLink (https://ldlink.nci.nih.gov/ - National Cancer Institute - NCI, National Institutes of Health – NIH, Bethesda, EUA).

## 3.4.1. Análise in silico das variantes na região codificadora

Para as variantes na região codificadora foram realizadas análises de predição *in silico* dos efeitos funcionais utilizando as ferramentas *Polymorphism Phenotyping v2* (*Polyphen-2*, http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/), *Sorting Intolerant From Tolerant* (SIFT, https://sift.bii.a-star.edu.sg/), *Clinical variants* (ClinVar, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/), *Protein Variation Effect Analyzer* (PROVEAN, http://provean.jcvi.org/index.php) e o *Mutation Taster* (http://www.mutationtaster.org/).

## 3.4.2. *Docking* molecular

A metodologia de modelagem por *Docking* molecular foi utilizada para verificar o possível impacto das variantes na região codificadora da *PCSK9* no complexo PCSK9-LDLR. As estruturas cristalográficas utilizadas no *docking* foram: PCSK9, código 2P4E e a LDLR, código 1N7D, ambas disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB). Para a PCSK9 foi utilizada tanto a estrutura selvagem como as modificadas nos resíduos R237W, A443T, R469W e Q619P. As estruturas modificadas foram geradas utilizando modelagem por homologia com o *MPI Bioinformatics toolkit* (ZIMMERMANN *et al.*, 2016). As moléculas de água foram removidas do bolso de ligação e os átomos de hidrogênio foram adicionados em uma geometria padronizada usando o *Biopolymer*, conforme implementado no SYBYL 2.0 (Sybyl x 2.1.). A análise por *Docking* molecular foi realizada utilizando a ferramenta *online Clus-Pro*, (<a href="https://cluspro.org">https://cluspro.org</a>) conforme descrito por Kosakov e colaboradores, 2017. Os resíduos nos locais de ligação foram manualmente verificados quanto a possíveis orientações invertidas, protonação e estados tautoméricos com o *PyMol* 1.8.6.2 (Delano Scientific, San Carlos, USA). Essa análise foi realizada juntamente com o Dr. Gláucio Monteiro Ferreira.

#### 3.4.3. Sequenciamento de DNA por Sanger

Para verificar o padrão de herança da variante c.94G>A (p.E32K) foi realizado o sequenciamento de Sanger de três amostras de DNA genômico provenientes de um paciente

e seus progenitores. Os iniciadores para o sequenciamento foram selecionados utilizando a ferramenta Primer3 (Tabela 1). A amplificação da região de interesse foi realizada através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), utilizando o termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), seguindo os parâmetros: desnaturação inicial 1x: 95°C por 1 min; amplificação (desnaturação, hibridização e extensão) 35x: 94°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 1 min; extensão final 1x: 72°C por 10 min. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2% utilizando tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5x nas seguintes condições: 100 V, 60 mA por 30 min. A purificação do produto da PCR foi feita utilizando o kit QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, GmbH, Alemanha ). A quantificação do produto da PCR foi realizada utilizando o equipamento QUBIT® (Life Technologies, Forest City, EUA). O sequenciamento por Sanger foi então realizado no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, Setor de Sequenciamento de DNA do Instituto de Biociências da USP (IB-USP), utilizando o equipamento ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies, Forest City, EUA). As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As sequências foram analisadas, primeiramente no IB-USP, utilizando a ferramenta (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), e Sequencing Analysis 5.3.1 posteriormente, pelo nosso laboratório, utilizando a ferramenta BioEdit Sequence Alignment Editor (http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html).

**Tabela 1** – Sequência 5'-3' dos iniciadores que foram utilizados na PCR.

Variante	Sequência 5'→3'	Sentido	Produto (pb)
c.94G>A	TTCAGCTCCTGCACAGTCCT	Senso	430
(p.E32K)	GACCTGCACTCCACTTCCTC	Anti-senso	430

#### 3.4.4. Análise in silico das variantes na região 3' não traduzida

Para as variantes na região 3' não traduzida (3'UTR) foram realizadas análises de predição *in silico* utilizando as ferramentas: *Polymorphism in microRNAs and their* 

TargetSites (PolymiRTS Database 3.0, <a href="http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/">http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/</a>), MirSNP (<a href="http://bioinfo.bjmu.edu.cn/mirsnp/search/">http://bioinfo.bjmu.edu.cn/mirsnp/search/</a>) e miRNASNP2 (<a href="http://bioinfo.life">http://bioinfo.life</a>. hust.edu.cn/miRNASNP2/). Essas ferramentas foram utilizadas com o objetivo de identificar variantes que interferem em possíveis sítios de ligação de miRNAs. Posteriormente, todos os miRNAs preditos como tendo sua ligação interferida pela presença das variantes foram selecionados e analisados no Ingenuity Pathway Analysis - IPA (QIAGEN Bioinformatics, GmbH, Alemanha) para a criação de uma rede de interação mRNA-miRNA. O IPA permitiu realizar uma análise integrativa entre o RNAm da PCSK9 e os miRNAs preditos. O IPA utiliza informações provenientes da base de dados TargetScan, a qual contém a predição de miRNAs e seus alvos, juntamente com dados da literatura.

#### 3.5. Cultivo Celular

As linhagens HEK293FT e HepG2 foram cultivada a 37°C em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, na estufa incubadora de CO<sub>2</sub> - Series 8000 WJ (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA), em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA) (pH 7,4), contendo 10 U/mL de penicilina e estreptomicina (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®, Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA). O meio foi trocado duas vezes por semana e as células foram tripsinizadas com Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA) e subcultivadas uma vez por semana. Para verificar se havia contaminação das células por Mycoplasma sp. foi realizado o teste de detecção de Mycoplasma pela PCR segundo Young e colaboradores (2010) (Figura supl. 1). A linhagem HEK293FT foi utilizada para a caracterização funcional das variantes missense e no ensaio da luciferase, pois é uma linhagem de fácil manutenção e transfecção (THOMAS & SMART, 2005), e também por não expressar a PCSK9, garantindo que a única expressão detectada nos experimentos de Western blot fosse proveniente da PCSK9 transfectada (dados conferidos utilizando o The Human Protein Atlas: <a href="https://www.proteinatlas.org">https://www.proteinatlas.org</a>). A linhagem HepG2 foi utilizada para estudar o efeito de miRNAs sobre a expressão (RNAm e proteína) da PCSK9, visto que

essa linhagem expressa a PCSK9 (dados conferidos utilizando o *The Human Protein Atlas*: <a href="https://www.proteinatlas.org">https://www.proteinatlas.org</a>).

## 3.6. Preparo das células Escherichia coli quimiocompetente

Primeiramente, células *Escherichia coli* (*E. coli*) foram semeadas, em placas de Petri contendo meio Luria-Bertani (LB), *overnight* a 37°C na estufa. Posteriormente, uma colônia de *E. coli* foi selecionada e transferida para 20 mL de meio LB líquido e incubada a 37°C com agitação a 170 r.p.m *overnight*. Após essa etapa, os 20 mL foram transferidos para 200 mL de meio LB líquido, o qual foi incubado novamente a 37°C com agitação a 170 r.p.m. até as células atingirem uma fase exponencial de crescimento, a qual foi determinada por Densidade Ótica (D.O.) por espectrometria (D.O. 595 = 0,4 a 0,6). As células foram então resfriadas em gelo por 15 min, e em seguida, centrifugadas a 6000 r.p.m. por 3 min a 4°C. O meio de cultura foi descartado e as células foram ressuspensas em 6 mL de TFB I, pH 5,8 (MnCl.4H<sub>2</sub>O a 50 mM, acetato de potássio a 30 mM, CaCl<sub>2</sub>.2H2O a 10 mM, glicerol a 15%, água destilada q.s.p.), resfriadas em gelo por 15 min, e centrifugadas a 6000 r.p.m. por 3 min a 4°C. As células foram ressuspensas em 0,6 mL de TFB II (acetato de potássio 10 mM, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O a 75 mM, glicerol a 15%, água destilada q.s.p.) e armazenadas a -80°C.

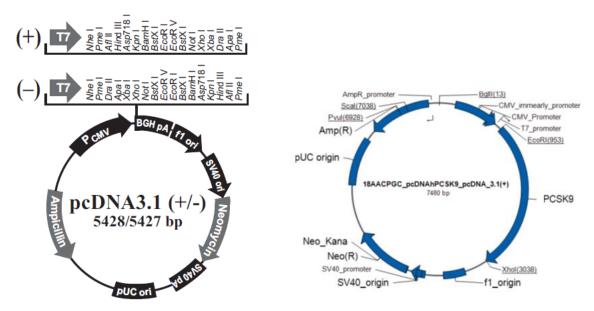
#### 3.7. Transformação das células Escherichia coli quimiocompetente

Foram transformadas aproximadamente 200 μL de células *E. coli* com 10 μL (100 ng) dos vetores presentes no **Quadro 1**. As células foram resfriadas em gelo por 10 min, e depois colocadas em banho de água a 42°C (choque térmico) por 90 s, e resfriadas novamente em gelo por 2 min. Foram acrescentados 800 μL de meio LB líquido, e as células foram incubadas por 1h a 37°C. Posteriormente, as células foram semeadas em meio sólido LB-Agar contendo 100 μg/mL de ampicilina, e incubadas a 37°C *overnight*. Após esse período, uma colônia foi selecionada e transferida para um tubo contendo 3 mL de meio LB líquido com ampicilina (100 μg/mL) e incubadas a 37°C com agitação a 170 r.p.m. *overnight*. Depois foi realizada a purificação dos plasmídeos utilizando o *QIAprep* 

Spin Miniprep Kit (QIAGEN, GmbH, Alemanha) ou o PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Os plasmídeos purificados foram quantificados e o grau de pureza do DNA (relação A260/A280) foi avaliada por espectrofotometria no equipamento NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA), posteriormente, foram digeridos com a enzima de restrição EcoRI High Fidelity (New England Biolabs Inc., Bervely, MA, EUA), para a verificação dos clones contendo o inserto de interesse. Para a restrição enzimática foi utilizado 1x do CutSmart® Buffer (New England Biolabs Inc., Bervely, MA, EUA), e 1 U de enzima EcoRI a cada 1 μg de DNA, em um volume final de 25 μL. Os tubos contendo a reação foram incubados a 37°C por 3h no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Após o período de incubação, os produtos da digestão foram analisados pela eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5x, nas seguintes condições: 100 V, 60 mA por 40 min.

**Quadro 1** – Vetores de expressão utilizados na etapa de transfecção.

Siglas	Vetores utilizados para a caracterização funcional das variantes na região codificadora
Vetor vazio	pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)
PCSK9	pcDNA3.1 com inserto (cDNA da PCSK9)
	(GeneArt Gene Synthesis - Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA)
E32K	pcDNA3.1 contendo o cDNA da PCSK9 com a variante E32K
R469W	pcDNA3.1 contendo o cDNA da PCSK9 com a variante R469W
GFP	plv-eGFP



**Figura 3** – Mapa do plasmídeo pcDNA3.1. vazio e contendo o inserto (cDNA da PCSK9), respectivamente. Fonte: Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA.

## 3.8. Mutagênese sítio-dirigida das variantes da região codificadora da PCSK9

A mutagênese sítio-dirigida das variantes foi realizada utilizando o *Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit (Thermo Fisher Scientific* Inc., Wilmington, EUA). Primeiramente foi realizada a PCR contendo 1 μL dos iniciadores senso e anti-senso (0,5 μΜ) (**Tabela 2**), 10 μl do 5X *Phusion HF Buffer*, 1 μL do *mix* de dNTP (200 μΜ cada), 0,5 μL da *Phusion Hot Start DNA Polymerase* (0.02 U/μL), juntamente com 10 pg do *template* (pcDNA3.1 + PCSK9) em um volume final de 25 μL, seguindo os seguintes parâmetros: desnaturação inicial 1x: 98°C por 30 s; amplificação (desnaturação, hibridização e extensão) 25x: 98°C por 10 s, 72°C por 30 s e 72°C por 4 min; extensão final 1x: 72°C por 10 min. Para o controle, foram utilizados 35 μL de água, 10 μL do 5x *Phusion HF Buffer*, 1 μL do *mix* de dNTPs (200 μM cada), 1 μL dos iniciadores controles (0,5 μΜ), 0,5 μL da *Phusion Hot Start DNA Polymerase* (0.02 U/μL) e 2 μL do plasmídeo controle pUC19 (2686 bp) (10 ng), seguindo os seguintes parâmetros: 1x a 98°C por 30 s, 25x a 98°C por 10 s, 25x a 72°C por 45 s, e por fim, 1x a 72°C por 5 min. Posteriormente, foi acrescentado 1 μL da enzima de restrição *DpnI FastDigest* no produto da PCR, o qual foi incubado a 37°C

por 15 min. Após a digestão do produto da PCR pela enzima *DpnI*, foi pipetado 5 μL deste produto em uma reação de ligação utilizando 2 μL do *Rapid Ligation Buffer* 5x; 2,5 μL de água e 0,5 μL de T4 DNA ligase. Posteriormente, 5 μL do *mix* de ligação foi utilizado para a transformação das *E. coli* quimiocompetente, conforme descrito no **item 1.8**. Para o controle foram acrescentados na placa de LB-Agar Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG, 0,1 M) e 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo (X-gal, 20 mg/mL). O plasmídeo controle derivado do pUC19 contém um códon de parada (TAA) na posição 8 do gene *lacZ-α*, formando colônias brancas em placas de meio sólido LB-Agar, contendo X-Gal e IPTG. Os iniciadores controles revertem o códon de parada do gene *lacZ-α* em um códon de leucina. Portanto, uma reação de controle de mutagênese bem-sucedida forma colônias azuis em placas de meio sólido LB-Agar, contendo X-Gal e IPTG (**Figura supl.** 2).

Para confirmar se a variante foi inserida no vetor foi realizado o sequenciamento por Sanger no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, Setor de Sequenciamento de DNA do Instituto de Biociências da USP (IB-USP), conforme descrito no **item 1.5**, utilizando os iniciadores senso do promotor T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) e anti-senso do BGH (TAGAAGGCACAGTCGAGG), conforme instruções do fabricante.

**Tabela 2** – Sequência 5'-3' dos iniciadores que foram utilizados na mutagênese sítiodirigida.

Variante	Sequência 5'→3'	Sentido
c.94G>A	CGTGCGCAGAAGGACGAGG	Senso
(p.E32K)	GGCGCCGCGGGACC	Anti-senso
c.1405C>T	GGGCCTACATGGATGGCCA	Senso
(p.R469W)	CGAGTGTGCTGACCACACAG	Anti-senso

## 3.9. Transfecção nas células HEK293FT

Aproximadamente 2,5x10<sup>5</sup> células foram semeadas em placas de 6 poços. Após 24h, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) 1x, cultivadas em meio

Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA) e, após 1h, foram transfectadas com 2,5 µg dos vetores presentes no Quadro 1, utilizando Lipofectamine 3000® e P3000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA), nas seguintes proporções: 3 µL Lipofectamine : 1 µg de DNA e 2 µL P3000 : 1 µg de DNA. Para verificar a eficiência da transfecção, as células foram co-transfectadas com 0,5 µg do vetor plv-eGFP. A intensidade de fluorescência da proteína verde fluorescente (GFP) foi medida utilizando o citômetro de fluxo BD FACS CANTO II (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) em comprimento de onda de 488 nm o qual detecta fluorescência verde (FITC) e visualizada no Microscópio invertido com fluorescência Nikon Eclipse Ti, utilizando a objetiva com aumento de 10x, 24h pós-transfecção. Cerca de 8h pós-transfecção, as células transfectadas foram incubadas em meio DMEM contendo 10% de SFB. Decorridas 48h, as células transfectadas foram incubadas em meio DMEM contendo 10% de soro deficiente de lipoproteínas (LPDS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, EUA) durante um período de 24h para aumentar a expressão endógena do LDLR. Posteriormente, as células transfectadas foram utilizadas nas etapas 3.11, 3.12 e 3.13. Todos os experimentos foram realizados em duplicada e repetidos pelo menos três vezes.

### 3.10. Viabilidade celular

Aproximadamente 24h pós-transfecção, a porcentagem de células viáveis foi avaliada no citômetro de fluxo *BD FACS CANTO II (BD Biosciences*, San Diego, CA, EUA) utilizando uma solução de iodeto de propídio (PI) (1 μL em 100 μL de PBSx1). A intensidade de fluorescência do PI foi avaliada em comprimento de onda de 488 nm (PerCP). Para cada amostra foram analisados 10 mil eventos.

## 3.11. Expressão da PCSK9 por Western Blotting

A suspensão celular foi centrifugada a 1.000 r.p.m. por 7 min, lavada duas vezes com PBS x1 e centrifugadas a 1.000 r.p.m. por 7 min. Após esse processo, o sedimento foi ressuspendido em tampão de lise RIPA (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, Mo, EUA) contendo inibidor de protease 1x (*cOmplete* TM *Protease Inhibitor Cocktail* – Roche) e centrifugadas a

14.000 r.p.m. por 30 min a 4°C. O sobrenadante coletado foi centrifugado a 100.000 x g por 1h a 4°C, utilizando a ultracentrífuga Sorvall<sup>TM</sup> MTX 150 (*Thermo Fisher Scientific* Inc., Wilmington, EUA). O precipitado foi ressuspendido em Tris-HCl 10 mM (pH 8,4) e armazenado a -80°C. O conteúdo de proteínas foi quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A separação das proteínas foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% contendo dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE). Uma alíquota com 25 ou 40 µg de proteínas em tampão de amostra (Tris-HCl 100 mM pH 6,8; mercaptoetanol 10%; SDS 2%; glicerol 20% e azul de bromofenol 0,01%) foi submetida a eletroforese SDS-PAGE 10% em condições desnaturantes (140V por 1h50). Para verificação do tamanho da proteína, foi utilizado o padrão de peso molecular de proteínas 10-260 kDa Spectra<sup>TM</sup> Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA). As proteínas fracionadas em gel foram transferidas para a membrana de PVDF em cuba de eletroforese (100V por 1h40min). A eficiência da transferência foi avaliada pela coloração da membrana com Ponceau S. A membrana foi bloqueada por 1h a temperatura ambiente, com 5% de leite desnatado diluído em TBST (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 0,9% com 0,1% de Tween 20) para minimizar as ligações inespecíficas. Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes por 10 min com TBST, e incubada overnight a 4°C, sob agitação, contendo o anticorpo primário anti-PCSK9 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) (diluído 1:3.000 em TBST), ou anticorpo monoclonal anti-βactina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, EUA) (diluído em 1:10.000 em TBST). Após três lavagens por 10 min com TBST, as membranas foram incubadas com o anticorpo de donkey anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA) (diluído 1:5.000, em TSBT) por 1 h a temperatura ambiente, sob agitação. Posteriormente, a membrana foi novamente lavada três vezes com TBST. Os sinais das proteínas foram detectados por quimiluminescência, utilizando o sistema de detecção ECL Advanced Western Blotting Kit (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA) e o sistema de foto documentação *ImageQuant* 400 (*GE Healthcare*, Chicago, Illinois, EUA).

# 3.12. Quantificação da atividade do LDLR e internalização do LDL por citometria de fluxo

As células foram lavadas duas vezes em PBS 1x, e incubadas por 4h com 20 ug/mL de *BODIPY* ® *FL LDL* (*Life Technologies*, Forest City, EUA) em 37°C para verificar a internalização do LDL. Após a incubação, as células HEK293FT foram lavadas uma vez com PBS-BSA 1%. Para avaliar a atividade do LDLR, as células foram incubadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-LDLR conjugado com Alexa Fluor 647 (*Santa Cruz, Biotechnology*, Dallas, Texas, EUA) (diluído 1:40) durante 30 minutos a temperatura ambiente, e posteriormente, lavadas uma vez com PBS-BSA 1%, fixadas em formaldeído 4% durante 10 min, e lavadas duas vezes com PBS-BSA1%, e uma última vez com PBS 1x (ETXEBARRIA *et al.*, 2012). A intensidade de fluorescência das células foi medida no citômetro de fluxo *BD FACS CANTO II* (*BD Biosciences*, San Diego, CA, EUA). A intensidade de fluorescência do *BODIPY* ® *FL LDL* foi medida em comprimento de onda de 488 nm (FITC), e a intensidade de fluorescência do anti-LDLR conjugado com Alexa Fluor 647 em comprimento de onda de 594/633 nm (APC).

## 3.13. Microscopia Confocal de Varredura a Laser

As células incubadas com o anticorpo anti-LDLR e com a LDL, conforme descrito no item 3.12 foram também utilizadas para visualizar a ligação do LDLR-LDL e a expressão do LDLR na superfície celular por microscopia confocal de varredura a laser. Cerca de 10 μL de células foram colocadas em uma lâmina de vidro juntamente com o meio de montagem *Fluoroshield* contendo 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, Mo, EUA) e incubadas por 10 min. A DAPI é um marcador fluorescente que se liga fortemente a regiões ricas em adenina-timina no DNA. Esta molécula é utilizada para visualizar os núcleos em células vivas ou mortas. Posteriormente, foi realizada a leitura das lâminas no microscópio Carl Zeiss modelo LSM 880, disponibilizado pelo Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco do IB-USP, utilizando-se as objetivas com aumento de 40 e 60 vezes, e os filtros FITC (*BODIPY* ® *FL LDL*), Cy5

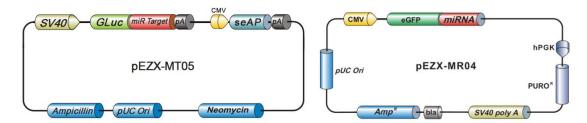
(anti-LDLR conjugado com Alexa Fluor 647) e DAPI (DAPI). As imagens foram visualizadas com o programa Zen.

# 3.14. Transformação das células *Escherichia coli* quimiocompetente com os vetores utilizados no ensaio da luciferase

Foram transformadas aproximadamente 200 μL de células *E. coli* com 10 μL dos vetores presentes no **Quadro 2** (**Figura 4**), conforme descrito no item 3.7. Posteriormente, foi realizada a purificação dos plasmídeos utilizando o *PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit* (*Thermo Fisher Scientific* Inc., Wilmington, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Os plasmídeos purificados foram quantificados e o grau de pureza do DNA (relação A260/A280) foi avaliado por espectrofotometria no equipamento NanoDrop® ND-1000 (*Thermo Fisher Scientific* Inc., Wilmington, EUA).

**Quadro 2** – Vetores de expressão utilizados no ensaio da luciferase.

Siglas	Vetores utilizados para a caracterização funcional das variantes na região 3'UTR
3'UTR-PCSK9	pEZX-MT05 contendo a 3'UTR da PCSK9
c.*75C>T	pEZX-MT05 contendo a 3'UTR da PCSK9 com a variante c.*75C>T
c.*345C>T	pEZX-MT05 contendo a 3'UTR da PCSK9 com a variante c.*345C>T
c.*414C>T	pEZX-MT05 contendo a 3'UTR da PCSK9 com a variante c.*414C>T
Haplótipo	pEZX-MT05 contendo a 3'UTR da PCSK9 com o haplótipo formado pelas três variantes
	(c.*75C>T, c.*345C>T e c.*414C>T)
GLuc-SEAP	pEZX-MT05 controle de expressão (GLuc-SEAP)
miR-scrambled	pEZX-MR04 miRNA scrambled control
miR-6875-5p	pEZX-MR04 contendo o miRNA precursor hsa-miR-6875-5p
miR-4721	pEZX-MR04 contendo o miRNA precursor hsa-miR-4721
miR-564	pEZX-MR04 contendo miRNA precursor hsa-mir-564
miR-4313	pEZX-MR04 contendo o miRNA precursor hsa-mir-4313



**Figura 4** – Mapa dos plasmídeos pEZX-MT05 e pEZX-MR04, respectivamente. Fonte: GeneCopoeia Inc., Rockville, EUA.

#### 3.15. Ensaio da luciferase em células HEK293FT

Aproximadamente 2,5x10<sup>5</sup> células foram semeadas em placas de 12 poços. Após 24h, as células foram lavadas com PBS 1x, cultivadas em meio Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific* Inc., Wilmington, EUA) e, após 1h, foram co-transfectadas com os vetores presentes no **Quadro 3** (**Figura supl. 4**), utilizando Lipofectamine 3000® (*Thermo Fisher Scientific* Inc., Wilmington, EUA), seguindo as orientações do fabricante. O vetor GLuc-SEAP foi utilizado para normalizar a expressão da luciferase. Cerca de 24h póstransfecção, as células foram incubadas em meio DMEM contendo 10% de SFB. Decorridas 48h, o sobrenadante das células foi coletado e a atividade da *Gaussia* luciferase (Gluc) foi medida utilizando o *Secrete-Pair Dual Luminescence Assay Kit* (*GeneCopoeia* Inc., Rockville, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A intensidade da luminescência foi medida utilizando o leitor de placas (Synergy, Biotek, Winooski, Vermont, EUA). Os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos duas vezes.

Quadro 3 – Vetores co-transfectados em células HEK293FT no ensaio da luciferase.

3'UTR PCSK9	3'UTR PCSK9	3'UTR PCSK9	Haplótipo	Haplótipo
miR-scrambled	miR-4721	miR-564	miR-scrambled	miR-4721
GLuc-SEAP	GLuc-SEAP	GLuc-SEAP	GLuc-SEAP	GLuc-SEAP
Haplótipo	c.*75C>T	c.*75C>T	c.*345C>T	c.*345C>T
miR-564	miR-scrambled	miR-4721	miR-scrambled	miR-564
GLuc-SEAP	GLuc-SEAP	GLuc-SEAP	GLuc-SEAP	GLuc-SEAP

## 3.16. Transfecção de miRNA miméticos em células HepG2

Aproximadamente 2,5x10<sup>5</sup> células foram semeadas em placas de 6 poços. Após 24h, as células foram lavadas com PBS1x, cultivadas em meio Opti-MEM (*Thermo Fisher Scientific* Inc., Wilmington, EUA) e, após 1h, foram transfectadas com 100 pmol de *mirVana*® *miRNA mimic* (*Thermo Fisher Scientific* Inc., Wilmington, EUA) (**Quadro 4**), utilizando 8 μL de Lipofectamine 3000®. O *mirVana*<sup>TM</sup> *miRNA Mimic, Negative Control* #1 (*Thermo Fisher Scientific* Inc., Wilmington, EUA) foi utilizado como controle negativo. Cerca de 24h pós-transfecção, as células transfectadas foram incubadas em meio DMEM contendo 10% de SFB. Decorridas 48h, as células transfectadas foram utilizadas para a extração de RNA (item 3.17) e após 72h, as células transfectadas foram utilizadas para a extração de proteínas (item 3.18). Todos os experimentos foram realizados em duplicada e repetidos três vezes.

**Quadro 4** – Dados dos miRNAs miméticos utilizados para transfectar as células HepG2.

miRNAs miméticos	Identificação do ensaio	Sequência do miRNA maduro
hsa-miR-6875-5p	MC27374	UGAGGGACCCAGGACAGGAGA
hsa-miR-4721	MC22385	UGAGGGCUCCAGGUGACGGUGG
hsa-miR-564	MC11440	AGGCACGGUGUCAGCAGGC
hsa-miR-4313	MC16749	AGCCCCUGGCCCCAAACCC

## 3.17. Extração de RNA total de células HepG2

O RNA total, incluindo miRNAs, foi extraído de células HepG2 transfectadas transitoriamente com os miRNAs miméticos utilizando o *miRNeasy® Mini Kit (QIAGEN*, GmbH, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante e com a adição do controle externo de oligonucleotídeos *Caenorhabditis elegans* miR-39 (cel-miR-39), *Spike-in control (QIAGEN*, GmbH, Alemanha). O RNA total isolado foi quantificado (A260 nm) e seu grau de pureza (relação A260/280) avaliado por espectrofotometria, conforme implementada na plataforma *NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.*, EUA). As amostras foram armazenadas a -80°C até serem processadas.

## 3.18. Análise de miRNAs pela PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

A análise de miRNAs foi realizada por RT-qPCR utilizando as amostras de RNA total para verificar a eficiência da transfecção dos miRNAs miméticos nas células HepG2. O cDNA foi sintetizado a partir dos miRNAs extraídos utilizando-se o miScript II RT Kit (QIAGEN, GmbH, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Para a realização da PCR em tempo real foram utilizados os ensaios pré-validados miScript Primer Assay (QIAGEN, GmbH, Alemanha) (Quadro 5), em uma solução contendo o QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, miScript Universal Primer, e água livre de RNAses (QIAGEN, GmbH, Alemanha) em um volume total de 10 µL por poço. A amplificação foi realizada em uma placa de 384 poços utilizando o QuantStudio® (Life Technologies, Forest City, EUA). Os dados foram coletados de três experimentos independentes realizados em duplicata. A expressão relativa foi calculada pela diferença entre o cycle threshold (Ct) do miRNA alvo e o Ct do miRNA de referência: ΔCt = (Ct miRNA alvo - Ct miRNA referência). A expressão diferencial (fold change) foi calculada pela fórmula 2-ΔΔCt (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001), em relação aos valores médios do grupo controle (células HepG2 transfectadas com o mirVana<sup>TM</sup> miRNA Mimic, Negative Control #1). Para avaliar se havia amplificação inespecífica dos ensaios de RT-qPCR foram utilizadas amostras sem a adição de cDNA.

**Quadro 5** – Dados dos ensaios da qPCR para análise de expressão de miRNAs.

RNAm alvo	Identificação de miRNAs	Número de catálogo
PCSK9	hsa-miR-6875-5p	MS00048006
	hsa-miR-4721	MS00039767
	hsa-miR-564	MS00004718
	hsa-miR-4313	MS00009702
Controles	hsa-miR-191	MS00031528
	hsa-miR-21	MS00009086
	cel-miR-39	MS00019789

## 3.19. Análise de RNAm pela PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

A expressão do RNAm do gene PCSK9 foi quantificada pela RT-qPCR. O cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA total de células HepG2 transitoriamente transfectadas com miRNAs miméticos usando a SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA gerado foi adicionado a uma solução contendo QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 10x QuantiTect Primer Assay (PCSK9 - QT00005509, QIAGEN, GmbH, Alemanha) e água livre de RNAses (QIAGEN, GmbH, Alemanha) em um volume total de 10 µL por poço. A RT-PCRq foi realizada em uma placa de 384 poços utilizando o QuantStudio® (Life Technologies, Forest City, EUA). Os dados forem coletados de três experimentos independentes realizados em duplicata. A expressão relativa foi calculada pela diferença entre o cycle threshold (Ct) do gene alvo e o Ct do gene de referência:  $\Delta$ Ct = (Ct gene alvo - Ct gene referência). A expressão diferencial (fold change) foi calculada pela fórmula 2-ΔΔCt (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001), em relação aos valores médios do grupo controle (células HepG2 transfectadas com o mirVana<sup>TM</sup> miRNA Mimic, Negative Control #1). Para avaliar se havia amplificação inespecífica dos ensaios da RT-qPCR foram utilizadas amostras sem a adição de cDNA.

## 3.19.1. Seleção do gene de referência

Foram testados três genes de referência, *GAPDH*, *18S rDNA*, e *ACTB* (**Quadro 6**). Os ensaios da RT-qPCR dos genes de referência foram realizados nas mesmas condições do ensaio da *PCSK9*. Os dados de Ct dos ensaios foram analisados pelo *NormFinder algorithm analysis* (<a href="https://moma.dk/normfinder-software">https://moma.dk/normfinder-software</a>), o qual permite a identificação do gene de referência mais estável para o estudo.

**Quadro 6** – Dados dos ensaios da RT-qPCR dos genes de referência.

RNAm	Número do catálogo
ACTB	QT01680476
GAPDH	QT00079247
RRN18S	QT00199367

## 3.20. Expressão da PCSK9 por Western Blotting

A suspensão celular foi centrifugada a 1.000 r.p.m. por 7 min, lavada duas vezes com PBSx1 e centrifugadas a 1.000 r.p.m. por 7 min. Após esse processo, o sedimento foi ressuspendido em tampão de lise RIPA (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, Mo, EUA) contendo inibidor de protease 1x (*cOmplete* TM *Protease Inhibitor Cocktail* – Roche, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, Mo, EUA) e centrifugadas a 14.000 r.p.m. por 30 min. A análise por *Western Blotting* foi realizada conforme descrita anteriormente no item 3.11.

## 3.21. Quantificação da PCSK9 no plasma de pacientes HF

Amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo EDTA, posteriormente, o plasma foi separado por centrifugação e armazenado a -80°. A PCSK9 foi quantificada por imunoensaio com detecção fluorimétrica em célula de fluxo utilizando o *Proprotein Convertase 9 Magnetic Luminex Performance Assay* (R&D *systems*, Mineápolis, Minnesota, EUA) e o equipamento Luminex (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA). Os dados foram analisados com os seguintes programas: *Xponent software solutions* versão 3.1.871.0 (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA e *Milliplex Analyst* versão 3.5.5.0 (VigeneTech Inc., Carlisle, MA, EUA).

### 3.22. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados utilizando a ferramenta SPSS versão 2.0 (IBM® Corporation, Somers, EUA) e para a construção dos gráficos foi utilizado o

programa  $GraphPad\ Prism$ ® versão 5.0 ( $GraphPad\ Software\ Inc.$ , San Diego, CA, EUA). As variáveis quantitativas paramétricas foram comparadas por teste t. As variáveis quantitativas não paramétricas foram comparadas por Mann-Whitney e por Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi p < 0,050.

## 4. RESULTADOS

## 4.1. Seleção das variantes do gene PCSK9

Nos 48 pacientes sequenciados, foram identificadas 22 variantes no gene *PCSK9*. Dentre estas, três foram encontradas na região 5'UTR, nove na região codificadora e dez na região 3'UTR (**Tabela supl. 1**). Cinco variantes (rs45448095, rs562556, rs505151, rs11583680 e rs662145) foram consideradas benignas seguindo a classificação de Richards e colaboradores (2015), pois apresentaram uma frequência alélica maior do que 5% nos bancos de dados 1000 *genomes* e ABraOM (**Tabela supl. 1**).

## 4.1.1. Variantes na região codificadora

Das nove variantes identificadas na região codificadora da *PCSK9*, seis variantes foram selecionadas para as análises posteriores por apresentarem uma frequência alélica menor do que 5% nas bases de dados 1000 *genomes* e ABraOM (**Tabela 3**). As variantes E32K (rs564427867) e R469W (rs141502002) possivelmente resultam em ganho de função da *PCSK9*, enquanto a variante R237W (rs148195424) possivelmente resulta em perda de função. As demais variantes foram tidas como neutras. Foi encontrada uma variante nova sem prévia descrição na literatura (R680Q).

**Tabela 3** – Variantes da região codificadora do gene PCSK9 selecionadas para análises posteriores.

Variante	Troca de aa	Código rs	Frequência alélica (%)		Possível	
			1000 genomes	ABraOM	Pacientes HF*	efeito**
c.94G>A	p.E32K	rs564427867	0,04	-	1,04	Ganho de função <sup>[1]</sup>
c.709C>T	p.R237W	rs148195424	0,02	0,16	2,08	Perda de função <sup>[2]</sup>
c.1327G>A	p.A443T	rs28362263	2,66	1,72	2,08	Neutra <sup>[3]</sup>
c.1405C>T	p.R469W	rs141502002	0,18	0,25	1,04	Ganho de função <sup>[4]</sup>
c.1856A>C	p.Q619P	rs28362277	0,44	0,25	1,04	Neutra <sup>[3]</sup>
c.2039G>A	p.R680Q	Sem código	-	-	1,04	Sem dados

Nota: aa: aminoácidos; ABraOM: Arquivo Brasileiro Online de Mutações; \*frequência alélica das variantes nos 48 pacientes sequenciados. \*\*Com base em dados disponíveis na literatura. [1] NOGUCHI *et al.*, 2010; MABUCHI *et al.*,

2011; MABUCHI et al., 2014; HAN et al., 2015; [2] CAMERON et al., 2006; [3] KOTOWSKI et al., 2006; [4] ALLARD et al., 2005.

A predição do risco funcional *in silico*, utilizando as ferramentas *Polyphen-2*, *SIFT*, *Clin-Var*, *PROVEAN* e *MutationTaster* das variantes selecionadas encontra-se na **tabela 4**. Uma variante, R237W, foi descrita como possivelmente danosa à proteína em quatro ferramentas de predição. A variante R469W foi classificada como possivelmente danosa apenas na ferramenta *Polyphen-2* e possivelmente patogênica pelo *Clin-Var* e a variante E32K foi classificada como provavelmente patogênica pelo *Clin-Var*. As demais foram consideradas benignas ou provavelmente benignas, com exceção da R680Q que foi considerada patogênica pelo *MutationTaster*.

**Tabela 4** – Predição in silico do risco funcional das variantes na região codificadora.

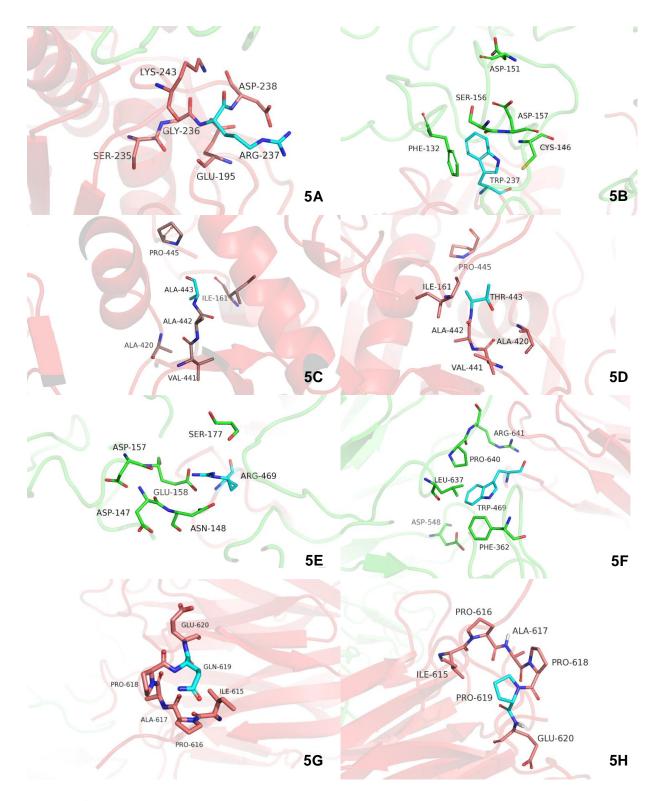
Variante	Polyphen-2	SIFT	Clin-Var	PROVEAN	MutationTaster
E32K	Benigna	Tolerada	Provavelmente patogênica	Neutra	Polimorfismo
R237W	Provavelmente danosa	Deletéria	Provavelmente patogênica	Deletéria	Patogênica
A443T	Benigna	Tolerada	Benigna	Neutra	Polimorfismo
R469W	Possivelmente danosa	Tolerada	Provavelmente patogênica	Neutra	Polimorfismo
Q619P	Benigna	Tolerada	Provavelmente benigna	Neutra	Polimorfismo
R680Q	Benigna	Tolerada	Benigna	Neutra	Patogênica

## 4.1.2. *Docking* molecular

Na **figura 5** encontra-se a análise por *docking* molecular do complexo PCSK9-LDLR. Podemos observar as posições de interação no complexo entre o LDLR com a PCSK9 selvagem (**Figuras 5A, 5C, 5E** e **5G**) e com a PCSK9 mutada nas seguintes posições: 237, 443, 469 e 619, respectivamente (**Figuras 5B, 5D, 5F** e **5H**).

Nas **figuras 5, A-D**, podemos observar que as trocas R237W e R469W, implicaram em uma possível mudança conformacional. No controle a arginina na posição 237 está interagindo apenas com os aminoácidos, em sua grande maioria polares: ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina e serina da PCSK9 (**Figura 5, A**). Já quando houve a troca por um triptofano, esta posição em relação ao LDLR é alterada, e o triptofano passa a interagir com

os aminoácidos apolares (cisteína, fenilalanina e serina) do LDLR na sua região organizada. Na posição 469, no controle a arginina está interagindo com os aminoácidos polares (ácido aspártico, asparagina, glutamina e serina) do LDLR (**Figura 5, C**), porém quando há a troca pelo triptofano, o mesmo passa a interagir com os aminoácidos apolares (fenilalanina, leucina e prolina) do LDLR em sua região organizada. Para as variantes A443T e Q619P não foram observadas mudanças nas posições quando comparadas com o controle, e os aminoácidos trocados estão interagindo apenas com aminoácidos da PCSK9 (**Figura 5, E-H**).



**Figura 5** – Docking molecular do complexo PCSK9-LDLR selvagem (5A, 5C, 5E e 5G) e do complexo com a PCSK9 mutada (5B, 5D, 5F e 5H) nas posições 237, 443, 469 e 619. Nota: Ala: alanina; Arg: arginina; Asp: ácido aspártico; Cys: cisteina; Glu: ácido glutâmico; Gln: glutamina; Gly: glicina; Ile: isoleucina; Lys: lisina; Phe: fenilalanina; Pro: prolina; Ser: serina; Thr: treonina; Trp: triptofano; Val: Valina. Em vermelho, os aminoácidos da PCSK9; em verde, os aminoácidos do LDLR; em azul claro, a posição da troca de aminoácidos.

61

## 4.1.3. Diagnóstico genético: gene PCSK9

De um total de 48 pacientes sequenciados, 25 (52,08%) tiveram o diagnóstico genético confirmado por apresentarem variantes já descritas e associadas à HF nos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*, sendo que dois (4,17%) pela presença de variantes de ganho de função na *PCSK9*.

Na **tabela 5** encontram-se os dados clínicos e biodemográficos dos dois pacientes diagnosticados geneticamente por variantes no gene da *PCSK9*. O caso índex 1 era um indivíduo do sexo masculino de 15 anos, com diagnóstico clínico segundo o critério MEDPED de provável HF; já o caso índex 2, também do sexo masculino, tinha 45 anos e diagnóstico clínico de possível HF. Apesar de ambos estarem sob tratamento hipolipemiante, o caso index 1 apresentou LDL-c de 286 mg/dL e o caso índex 2, de 115 mg/dL. Após o sequenciamento, foi encontrada a variante E32K de *PCSK9* no caso índex 1, enquanto no caso índex 2, foi encontrada a variante R469W.

**Tabela 5 -** Dados clínicos e biodemográficos dos pacientes diagnosticados geneticamente por variantes no gene da PCSK9.

Variável		Caso index 1	Caso index 2
Idade (anos)		15	45
Gênero		Masculino	Masculino
Diagnóstico HF*		Provável	Possível
Sinais clínicos de HF**		Não	Não
Perfil lipídico	Colesterol total	366	178
(mg/dL)	HDL-c	44	35
	LDL-c	286	115
	Triglicérides	181	-
Terapia hipolipemiante		Rosuvastatina 40 mg/dia	Atorvastatina 80 mg/dia
		Ezetimiba 10 mg/dia	Ezetimiba 10 mg/dia
Diagnóstico genético		E32K	R469W

Nota: HF: hipercolesterolemia familial; HDL-c: colesterol em lipoproteína de alta densidade; LDL-c: colesterol em lipoproteína de baixa densidade. \*Critérios da I Diretriz de Hipercolesterolemia Familial (SANTOS *et al.*, 2012) e da Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (FALUDI *et al.*, 2017).

Na **tabela 6** encontram-se os dados clínicos e biodemográficos dos pais do caso index 1. A mãe possui histórico familiar de HF, foi diagnosticada como certeza para HF seguindo os critérios da I Diretriz de Hipercolesterolemia Familial (SANTOS *et al.*, 2012) e

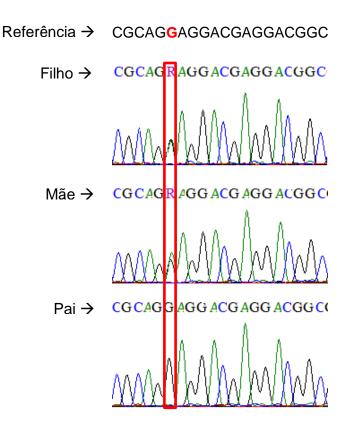
da Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (FALUDI *et al.*, 2017), e teve a presença da variante E32K confirmada pelo sequenciamento de Sanger (**item 2.4**; **Figura 6**). O pai apresentou diagnóstico clínico de possível HF e não apresentou a variante E32K após o sequenciamento por Sanger.

**Tabela 6** – Dados clínicos e biodemográficos dos pais do caso index 1.

Variável		Mãe	Pai
Idade (anos)		42	39
Gênero		Feminino	Masculino
Diagnóstico HF*		Certeza	Possível
Sinais clínicos de HF**		Não	Não
Perfil lipídico	Colesterol total	412	323
(mg/dL)	HDL-c	60	44
_	LDL-c	330	227
	Triglicérides	109	262
PCSK9 (µg/mL)	-	0,29	0,37
Terapia hipolipemiante		Sem tratamento	Sem tratamento
Diagnóstico genético		E32K	-
Histórico familiar		HF	Diabetes tipo 2
		Dislipidemia	1
		Hipertensão	
		Infarto do miocárdio	
		Derrame	
		Morte súbita	

Nota: HF: hipercolesterolemia familial; HDL-c: colesterol em lipoproteína de alta densidade; LDL-c: colesterol em lipoproteína de baixa densidade. \*Critérios da I Diretriz de Hipercolesterolemia Familial (SANTOS *et al.*, 2012) e da Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (FALUDI *et al.*, 2017).

Na **figura 6** encontra-se o eletroferograma do sequenciamento por Sanger realizado para a verificação da presença da variante E32K nos pais do caso index 1. A variante foi detectada no filho e na mãe (heterogizoto AG), mas não no pai (homozigoto GG).



**Figura 6** – Eletroferograma do sequenciamento por Sanger de um indivíduo portador da variante c.94G>A (p.E32K) e seus progenitores.

Nota: A letra "R" indica que os dois nucleotídeos que estão na mesma posição (indicando um heterozigoto) pertencem ao grupo das purinas (AG).

## 4.2.Transformação

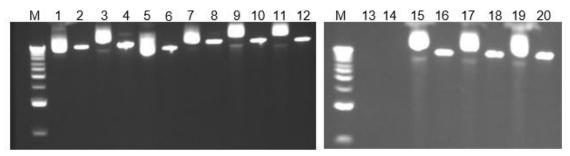
A figura 7 mostra a separação pela eletroforese do pcDNA3.1 vazio, com o inserto (PCSK9), e com as variantes E32K e R469W. Podemos observar que há a presença de dois fragmentos, um de aproximadamente 6 kb, correspondente ao vetor vazio, e o segundo fragmento de aproximadamente 8 kb, correspondente ao vetor contendo o inserto (PCSK9) e as variantes (E32K e R469W).



**Figura 7** − Análise do produto da digestão do plasmídeo pcDNA3.1 vazio, com o inserto (PCSK9), e com as variantes E32K e R469W, utilizando a enzima de restrição EcoRI. Gel de agarose 1% (corado com GelRed<sup>TM</sup>).

Nota: **M:** marcador de tamanho de fragmento de 1 kb; **1 e 2:** pcDNA3.1.; **3 e 4:** pcDNA3.1 + PCSK9; **5 a 8:** pcDNA3.1 + PCSK9\*E32K; **9 a 12:** pcDNA3.1 + PCSK9\*R469W.

A **figura 8** mostra a separação pela eletroforese dos produtos de digestão dos plasmídeos pcDNA3.1, pcDNA3.1 + PCSK9, pcDNA3.1 + PCSK9\*E32K e pcDNA3.1 + PCSK9\*R469W, juntamente com o produto não digerido.



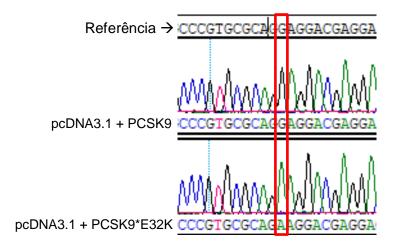
**Figura 8** − Análise do produto da digestão do plasmídeo pcDNA3.1 vazio, com o inserto da PCSK9, e com as variantes E32K e R469W, utilizando a enzima de restrição EcoRI. Gel de agarose 1% (corado com GelRed<sup>TM</sup>).

Nota: Todos os números ímpares representam os vetores não digeridos e os números pares os vetores digeridos. **M:** marcador de tamanho de fragmento de 1 kb; **1 e 2:** pcDNA3.1.; **3 e 4:** pcDNA3.1 + PCSK9; **5 e 6:** pcDNA3.1 + PCSK9\*E32K (amostra 1); **7 e 8:** pcDNA3.1 + PCSK9\*E32K (amostra 2); **9 e 10:** pcDNA3.1 + PCSK9\*E32K (amostra 3); **11 e 12:** pcDNA3.1 + PCSK9\*E32K (amostra 4); **13 e 14:** pcDNA3.1 + PCSK9\*R469W (amostra 1); **15 e 16:** pcDNA3.1 + PCSK9\*R469W (amostra 2); **17 e 18:** pcDNA3.1 + PCSK9\*R469W (amostra 3); **19 e 20:** pcDNA3.1 + PCSK9\*R469W (amostra 4).

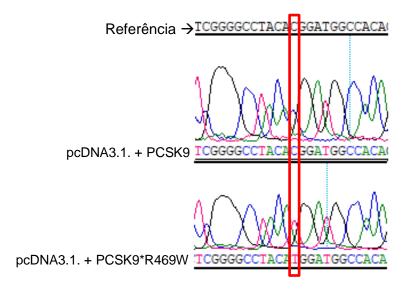
#### 4.2.1. Confirmação da inserção da mutação por Sequenciamento

Na **figura 9** encontra-se o eletroferograma do sequenciamento por Sanger do plasmídeo pcDNA3.1 + PCSK9 e pcDNA3.1 + PCSK9\*E32K. Podemos observar que na posição 94, do cDNA da PCSK9, houve uma troca de um G por A. Na **figura 10** encontra-

se o eletroferograma do sequenciamento por Sanger do plasmídeo pcDNA3.1 + PCSK9 e pcDNA3.1 + PCSK9\*R469W. Na posição 1405, do cDNA da PCSK9, houve uma troca de um C por T.



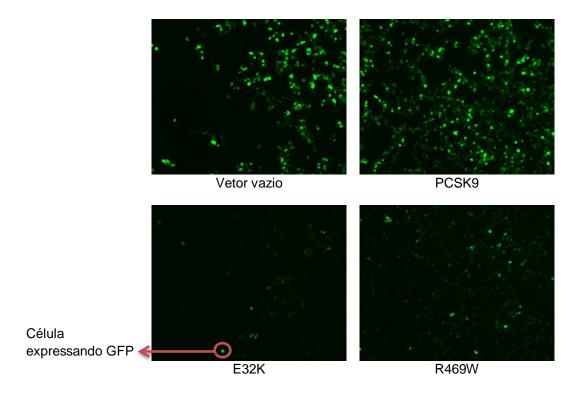
**Figura 9** – Eletroferograma do sequenciamento por Sanger dos plasmídeos pcDNA3.1 + PCSK9 e do pcDNA3.1 + PCSK9\*E32K, respectivamente.



**Figura 10** – Eletroferograma do sequenciamento por Sanger dos plasmídeos pcDNA3.1 + PCSK9 e pcDNA3.1 + PCSK9\*R469W, respectivamente.

## 4.3. Transfecção das células HEK293FT

A fotomicrografia das células co-transfectadas com o plasmídeo de expressão plveGFP encontra-se na **Figura 11**. Pode-se verificar que o processo de transfecção ocorreu nas células transfectadas com todas as construções.



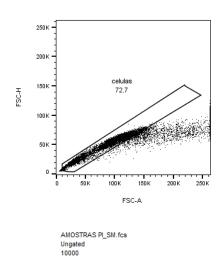
**Figura 11** – Fotomicrografia de células HEK293FT co-transfectadas com o plasmídeo plv-eGFP.

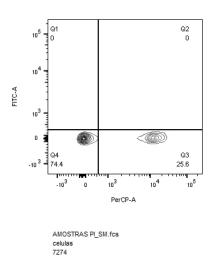
Nota: A fluorescência verde indica que as células estão expressando GFP. As imagens foram obtidas com o Microscópio invertido com fluorescência Nikon Eclipse Ti, utilizando a objetiva com aumento de 10x e o fluorocromo GFP, 24h pós-transfecção.

A quantificação da expressão de GFP pelas células HEK293FT co-transfectadas com o plasmídeo plv-eGFP estão ilustradas na **figura 12**. Os resultados mostram uma porcentagem de eficiência de transfecção de 17,5% nas células contendo o vetor vazio, 16,5% nas células contendo o vetor com a PCSK9, 13,9% nas células contendo o vetor com a variante E32K e 14% nas células contendo o vetor com a variante R469W. A avaliação da viabilidade de células HEK293FT co-transfectadas com o plasmídeo plv-eGFP, marcadas com PI mostram uma porcentagem de morte celular de 25,6% nas células que não foram transfectadas (**Figura 12B**), 54,2% nas células contendo o vetor vazio (**Figura 12D**),

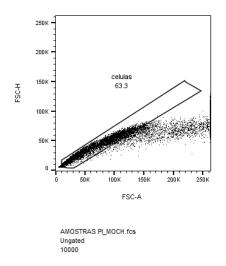
52,2% nas células contendo o vetor com a PCSK9 (**Figura 12F**), 55,4% nas células contendo o vetor com a variante E32K (**Figura 12H**) e 57% nas células contendo o vetor com a variante R469W (**Figura 12J**). A marcação dupla (quadrante 2 – Q2), ou seja, células expressando GFP e PI foram encontradas em 5,24% das células contendo o vetor vazio, 3,53% das células contendo o vetor com a PCSK9-WT, 2,34% das células contendo o vetor com a variante E32K e 2,50% das células contendo o vetor com a variante R469W (**Figura 12**).

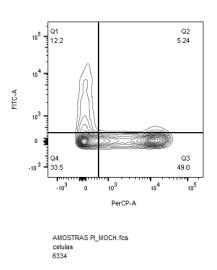
## HEK293FT não transfectadas



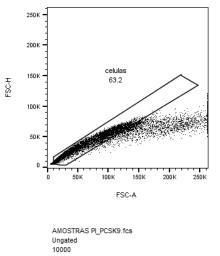


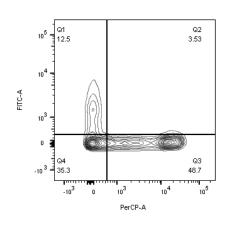
## **Vetor vazio**





## PCSK9-WT



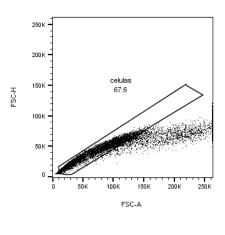


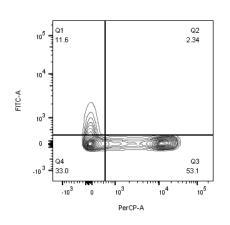
AMOSTRAS PI\_PCSK9.fcs celulas 6322

F

## **E32K**

Ε





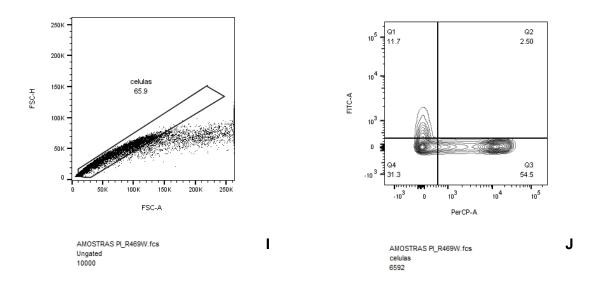
AMOSTRAS PI\_E32K.fcs Ungated 10000

G

AMOSTRAS PI\_E32K.fcs celulas 6755

Н

#### **R469W**

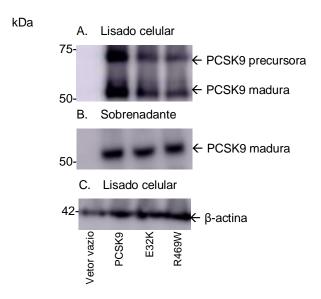


**Figura 12** — Quantificação do GFP e avaliação da viabilidade de células HEK293FT cotransfectadas com o plasmídeo plv-eGFP, marcadas com iodeto de propídeo (PI).

Nota: **A, C, E, G e I:** *Forward Scatter Height* (FSC-H) *versus Forward Scatter-Area* (FSC-A): indicam a porcentagem de células individuais. **B, D, F, H e J:** Q1: porcentagem de células marcadas com GFP (Fluorocromo: FITC-A); Q2: porcentagem de marcação dupla (PI e GFP); Q3: porcentagem de células marcadas com PI (Fluorocromo: PerCP-A).

## 4.4. Análise da PCSK9 por Western Blotting em células HEK293FT transfectadas

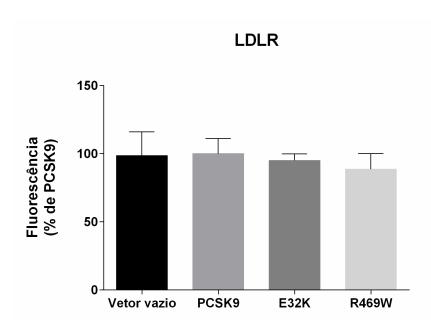
Na **figura 13** podemos observar a expressão da PCSK9 em células HEK293FT transfectadas com as diferentes construções. Nas frações de proteína provenientes do lisado celular das células transfectadas com o vetor com a PCSK9, e nas células transfectadas com o vetor contendo a variante E32K ou R469W (**Figura 13A**) foi observada a presença tanto da forma precursora da PCSK9 como da forma madura. Já no sobrenadante dessas células (**Figura 13B**) foi observada apenas a forma madura da PCSK9, a qual é secretada.



**Figura 13** – Expressão da PCSK9 em células HEK293FT transfectadas. As células foram transfectadas com o vetor vazio, com o vetor com a PCSK9, e com o vetor contendo a variante E32K ou R469W. Após 72h, as proteínas provenientes do lisado celular (A e C: 25μg/lane) e do sobrenadante (B: 25μg/lane) foram separadas pela SDS-PAGE e submetidas a análise por *Western blot*.

# 4.5. Quantificação da atividade do receptor de LDL em células HEK293FT transfectadas

Para estudar o possível efeito das variantes E32K e R469W do gene *PCSK9* na quantidade de LDLR da superfície celular e na internalização de LDL, esses dois parâmetros foram analisados por Citometria de fluxo em células HEK293FT transfectadas transitoriamente (**Figura supl. 3**). As células transfectadas com o vetor vazio e com o vetor contendo a PCSK9 foram utilizadas como controle. Nas **figuras 14 e 15** encontram-se a quantificação da intensidade de fluorescência do LDLR e do LDL, respectivamente. A variante E32K apresentou uma redução de LDLR de 5% em comparação a PCSK9-WT. Já a variante R469W, apresentou uma redução de 11% em comparação a PCSK9-WT. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa na redução da quantidade de LDLR na superfície celular e na internalização da LDL para ambas as variantes quando comparadas com a PCSK9-WT.



**Figura 14** – Porcentagem de LDLR em células HEK293FT transfectadas. Nota: A Citometria de fluxo foi utilizada para quantificar a quantidade de LDLR em células HEK293FT transfectadas com o vetor vazio, com a PCSK9 sem e com as variantes E32K e R469W. Os dados apresentados são mediana e intervalo interquartílico de três experimentos independentes realizados em duplicata.

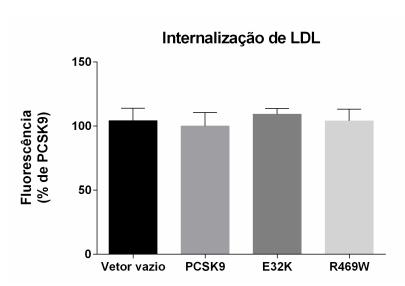


Figura 15 – Porcentagem de internalização de LDL em células HEK293FT transfectadas.

Nota: A Citometria de fluxo foi utilizada para quantificar a internalização da LDL em células HEK293FT transfectadas com o vetor vazio, com a PCSK9 sem e com as variantes E32K e R469W. Os dados apresentados são mediana e intervalo interquartílico de três experimentos independentes realizados em duplicata.

# 4.6. Microscopia confocal

As células HEK293FT transfectadas utilizadas na análise pela Citometria de Fluxo foram também utilizadas para visualizar a ligação do LDLR-LDL e a expressão do LDLR na superfície celular por microscopia confocal de varredura a laser (Figura 16).

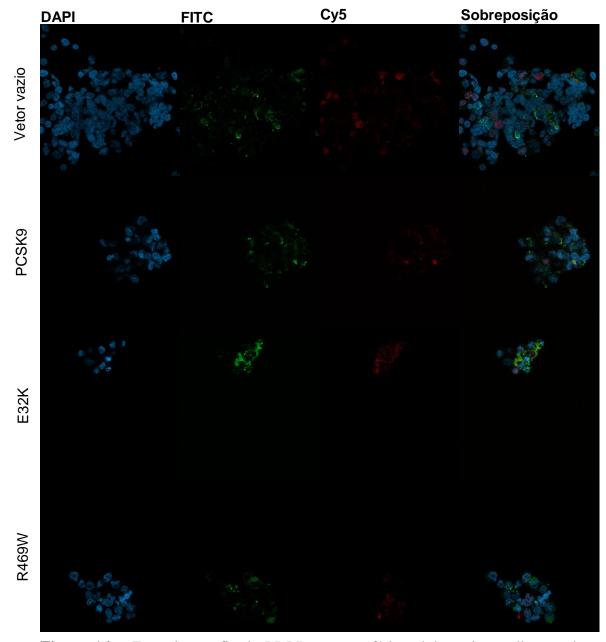


Figura 16 - Fotomicrografia da LDLR na superfície celular e internalização de LDL em células HEK293FT transfectadas. Nota: A fluorescência azul (DAPI) corresponde ao núcleo de cada célula HEK293FT; a fluorescência verde (FITC) corresponde ao LDL conjugado com o BODIPY ® FL; a fluorescência vermelha (Cy5) corresponde ao LDLR marcado com o anti-LDLR conjugado com Alexa Fluor 647. Sobreposição: sobreposição de todas as marcações (DAPI, FITC e Cy5).

73

A leitura das lâminas foi realizada no microscópio Carl Zeiss modelo LSM 880, utilizando-se as objetivas com aumento de 40 e 60 vezes, e os fluorocromos FITC, Cy5 e DAPI. As imagens foram visualizadas com o programa Zen.

#### 4.7. Seleção das variantes na região 3'UTR da PCSK9

Das 10 variantes identificadas na região 3'UTR da PCSK9, nove variantes foram selecionadas para as análises posteriores por apresentarem uma frequência alélica menor do que 5% nas bases de dados 1000 *genomes* e ABraOM (**Tabela 7**).

Tabela 7 - Variantes da região 3'UTR do gene PCSK9 selecionadas para análises posteriores.

Variante	Código rs	Frequência alélica (%)			
		1000 genomes	ABraOM	Pacientes HF*	
c.*75C>T	rs28362287	2,48	2,54	5,20	
c.*171C>T	rs557622245	0,20	0,43	1,04	
c.*331T>C	Sem código	· -	-	1,04	
c.*345C>T	rs17111555	2,54	2,36	5,20	
c.*414C>T	rs13376071	3,23	3,68	5,20	
c.*444G>C	rs28362288	1,98	1,41	2,08	
c.*614C>T	rs17111557	3,65	4,18	7,29	
c.*849T>C	rs28362292	1,5	- -	3,12	
c.*1052C>T	rs149837083	0,06	-	1,04	

Nota: ABraOM: Arquivo Brasileiro Online de Mutações; \*frequência alélica das variantes nos 48 pacientes sequenciados.

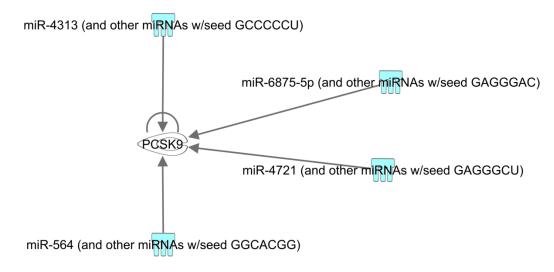
A predição *in silico* do possível impacto das variantes na região 3'UTR da *PCSK9* no sítio de ligação de miRNAs utilizando as ferramentas *PolymiRTS*, *MirSNP* e *miRNASNP2* encontra-se na **tabela 8**. A predição indica que: a variante c.\*75C>T impede a ligação de cinco miRNAs, e diminui a ligação do miR-4721; a variante c.\*345C>T impede a ligação do miR-564; a variante c.\*414C>T impede a ligação do hsa-miR-4313 e diminui a ligação do miR-1184; a variante c.\*614C>T impede a ligação do hsa-miR-548m e diminui a ligação do miR-2278; a variante c.\*849T>C impede a ligação do miR-4690-3p; a variante c.\*1052C>T impede a ligação do miR-591. Para as demais variantes não houve nenhuma predição de impedimento ou diminuição de ligação de miRNAs.

**Tabela 8** – Predição in silico das variantes na 3'UTR da PCSK9 que impedem ou diminuem a ligação de miRNAs.

Variante	PolymiRTS	MirSNP	miRNASNP2
c.*75C>T	hsa-miR-3126-5p	hsa-miR-3126-5p	-
	hsa-miR-6758-5p	hsa-miR-4721*	
	hsa-miR-6856-5p		
	hsa-miR-6875-5p		
	hsa-miR-7845-5p		
c.*345C>T	-	hsa-miR-564	hsa-miR-564
c.*414C>T	-	hsa-miR-1184*	-
		hsa-miR-4313	
c.*614C>T	hsa-miR-548m	hsa-miR-2278*	-
c.*849T>C	hsa-miR-4690-3p	-	-
c.*1052C>T	-	hsa-miR-591	hsa-miR-591

Nota: o asterisco (\*) indica miRNAs que têm sua ligação diminuída na presença das variantes.

A análise integrativa entre o RNAm da *PCSK9* e os miRNAs preditos nas ferramentas *PolymiRTS*, *MirSNP* e *miRNASNP2* encontra-se na **figura 17**. Dos 15 miRNAs que foram preditos como tendo a sua ligação impedida ou diminuída devido à presença das variantes na região 3'UTR, apenas 5 (hsa-miR-6875-5p, hsa-miR-3126-5p, hsa-miR-4721, hsa-miR-564, hsa-miR-4313) se mantiveram na análise de predição *in silico* realizada pelo programa IPA. O miR-6875-5p e o miR-3126-5p possuem o mesmo sítio de ligação, apresentando os mesmos alvos nas análises de predição, por esse motivo foi mantido apenas o miR-6875-5p na **figura 17**.



© 2000-2019 QIAGEN. All rights reserved.

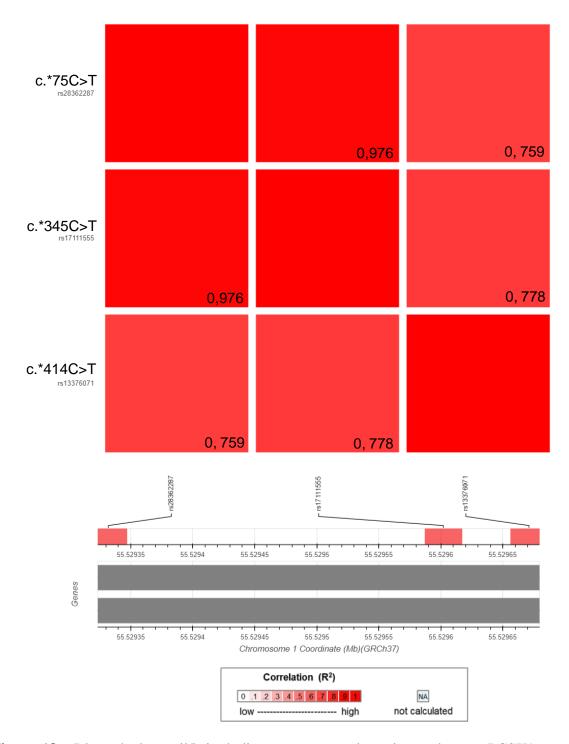
**Figura 17** – Rede integrativa entre o RNAm da PCSK9 e seus potenciais miRNAs reguladores.

Na **tabela 9** encontram-se os dados das três variantes da região 3'UTR que possivelmente impactam a ligação dos miR-6875-5p, miR-4721, miR-564 e miR-4313. As variantes c.\*75C>T, c.\*345C>T e c.\*414C>T foram encontradas nos mesmos pacientes.

**Tabela 9** – Predição in silico do impacto das variantes na região 3'UTR no sítio de ligação dos miRNAs selecionados.

Variante	miRNA	Impacto na ligação	Pacientes
c.*75C>T	hsa-miR-6875-5p	impede	Caso index 1, 3, 4 e 5
	hsa-miR-4721	diminui	
c.*345C>T	hsa-miR-564	impede	Caso index 1, 3, 4 e 5
c.*414C>T	hsa-miR-4313	impede	Caso index 1, 3, 4 e 5

Na **Figura 18** encontra-se o bloco de desequilíbrio de ligação entre as variantes c.\*75C>T (rs28362287), c.\*345C>T (rs17111555) e c.\*414C>T (rs13376071) do gene PCSK9. Os valores que estão no interior dos losangos representam o desequilíbrio de ligação utilizando o parâmetro  $r^2$ . As variantes possuem mais de 75% de desequilíbrio de ligação entre elas.



**Figura 18** – Bloco de desequilíbrio de ligação entre as três variantes do gene PCSK9. Nota: Quanto mais próximo de 1, maior é o desequilíbrio de ligação entre as variantes.

Na **tabela 10** encontram-se os dados clínicos e biodemográficos dos quatro pacientes que apresentaram as três variantes na região 3'UTR da *PCSK9*. O caso index 1 é

o mesmo paciente que teve o diagnóstico genético de HF devido à presença da variante E32K. O caso index 3, sexo feminino, tinha 63 anos e diagnóstico clínico de possível HF; já o caso index 4, sexo masculino, tinha 37 anos e diagnóstico clínico de certeza HF, bem como o caso index 5, sexo feminino e 55 anos. Ambos os casos 4 e 5 apresentaram sinais clínicos de HF. Apesar de todos os pacientes realizarem tratamento, o caso index 1 apresentou LDL-c de 286 mg/dL, o caso index 3 de 120 mg/dL, o caso index 4 de 196 mg/dL e o caso index 5 de 231 mg/dL.

**Tabela 10** – Dados clínicos e biodemográficos dos pacientes que apresentaram as três variantes na região 3'UTR da PCSK9.

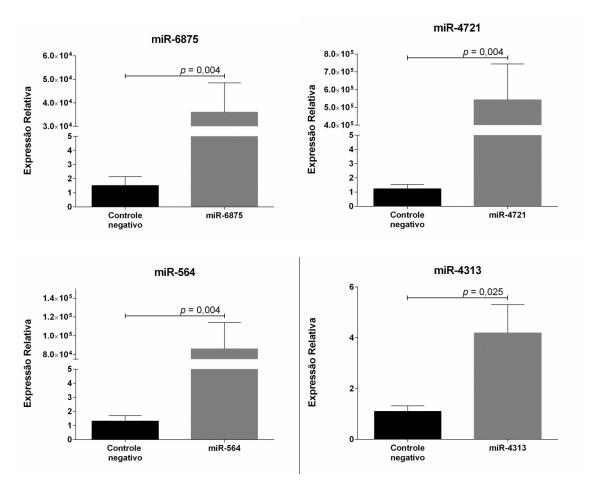
Variável		Caso	Caso	Caso	Caso
		index 1	index 3	index 4	index 5
Idade (anos)		15	63	37	55
Gênero		Masculino	Feminino	Masculino	Feminino
Diagnóstico HF*		Provável	Possível	Certeza	Certeza
Sinais clínicos de HF**		Não	Não	Sim	Sim
Perfil lipídico	Colesterol total	366	188	291	303
(mg/dL)	HDL-c	44	53	32	55
	LDL-c	286	120	196	231
	Triglicérides	181	77	317	83
PCSK9 (µg/mL)		0,32	0,29	0,22	0,55
Terapia		Rosuvastatina	Atorvastatina	Atorvastatina	Atorvastatina
hipolipemiante		40 mg/dia	80 mg/dia	80 mg/dia	80 mg/dia
		Ezetimiba	Ezetimiba	Ezetimiba	Ezetimiba
		10 mg/dia	10 mg/dia	10 mg/dia	10 mg/dia
Diagnóstico genético		E32K	-	C681X	V429M
		(PCSK9)		(LDLR)	(LDLR)

Nota: HF: hipercolesterolemia familial; HDL-c: colesterol em lipoproteína de alta densidade; LDL-c: colesterol em lipoproteína de baixa densidade\*Critérios da I Diretriz de Hipercolesterolemia Familial (SANTOS *et al.*, 2012) e da Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (FALUDI *et al.*, 2017).

#### 4.8. Expressão dos miRNAs miméticos transfectados em células HepG2

A expressão relativa dos miRNAs 48h após a transfecção dos miRNAs miméticos (miR-6875, miR-4721, miR-564 e miR-4313) em células HepG2 encontra-se na **Figura 19**. Pode-se observar um aumento de 23.970,34 vezes na expressão do miR-6875 em células transfectadas com esse miRNA mimético em comparação ao controle negativo (p=0,004),

um aumento de 441.879,77 vezes na expressão do miR-4721 em células transfectadas com esse miRNA em comparação ao controle negativo (p=0,004), um aumento de 66.035,51 vezes na expressão do miR-564 em células transfectadas com esse miRNA em comparação ao controle negativo (p=0,004), e por fim, um aumento de apenas 3,79 vezes na expressão do miR-4313 em células transfectadas com esse miRNA em comparação ao controle negativo (p=0,025).

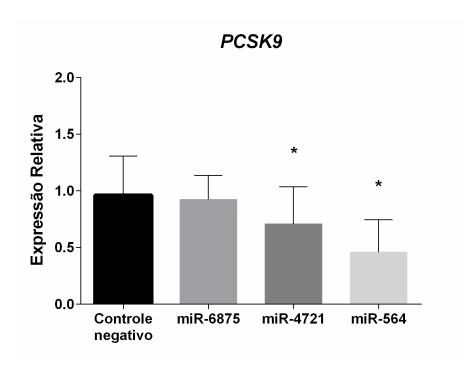


**Figura 19** – Expressão relativa dos miRNAs 48h após a transfecção dos miRNAs miméticos (miR-6875, miR-4721, miR-564 e miR-4313) e do controle negativo em células HepG2.

Nota: Dados são apresentados como *fold-change* versus o grupo controle (células transfectadas com o *mirVana*<sup>TM</sup> *miRNA Mimic, Negative Control #1*). Dados de expressão normalizados utilizando o mir-21. Variáveis comparadas pelo teste Mann-Whitney.

# 4.9. Expressão do RNAm da *PCSK9* em células HepG2 transfectadas com miRNAs miméticos

A expressão relativa do RNAm da *PCSK9* em células HepG2 transfectadas com os miRNAs miméticos miR-6875, miR-4721, miR-564 está representada na **Figura 20**. Podese observar uma redução de 1,37 vezes na expressão do RNAm da *PCSK9* em células transfectadas com o miR-4721 em comparação ao controle negativo (*p*=0,036), e uma redução de 2,14 vezes na expressão do RNAm da *PCSK9* em células transfectadas com o miR-564 em comparação ao controle negativo (*p*=0,010). Células transfectadas com o miR-6875 não apresentaram alterações estatisticamente significativas na expressão do RNAm da *PCSK9* em comparação com o controle negativo.

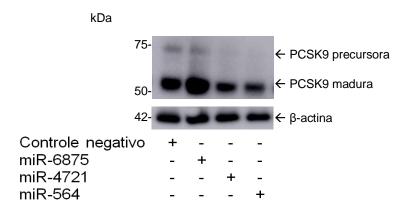


**Figura 20** – Expressão relativa do RNAm da PCSK9 em células HepG2 transfectadas com miRNAs miméticos (miR-6875, miR-4721 e miR-564) e com o controle negativo.

Nota: Dados são apresentados como *fold-change* versus o controle negativo (células transfectadas com o  $mirVana^{TM}$  miRNA Mimic, Negative Control #I). Dados de expressão normalizados utilizando a média do ACTB e GAPDH. Variáveis comparadas pelo teste Mann-Whitney. \* p <0,050 em comparação ao controle negativo.

# 4.10. Expressão da PCSK9 em células HepG2 transfectadas com os miRNAs miméticos

Na **figura 21** podemos observar a expressão da PCSK9 em células HepG2 transfectadas com os diferentes miRNAs miméticos. Observou-se uma redução da expressão da PCSK9 nas células transfectadas com o miR-4721 e com o miR-564, em comparação com as células transfectadas com o *mirVana*<sup>TM</sup> *miRNA Mimic, Negative Control #1* e com o miR-6875. As concentrações de β-actina foram semelhantes entre os grupos.



**Figura 21** – Expressão da PCSK9 em células HepG2 transfectadas com os miRNAs miméticos. As células foram transfectadas com o controle negativo (mirVana<sup>TM</sup> miRNA Mimic, Negative Control #1), e com os miRNAs miméticos miR-6875, miR-4721 e miR-564. Após 72h, as proteínas provenientes do lisado celular (5μg/lane) foram separadas por SDS-PAGE e submetidas a análise por *Western blot*. Este experimento é representativo dos demais.

#### 4.11. Ensaio da Luciferase em células HEK293FT

Para avaliar a interação entre os miRNAs (miR-4721 e miR-564), e a região 3'UTR da *PCSK9*, e o possível impacto nessa interação na presença das variantes na região 3'UTR, células HEK293FT foram transfectadas com um plasmídeo pEZX-MT05 contendo a 3'UTR da PCSK9 (sem e com as variantes) e um gene repórter da *Gaussia* luciferase, juntamente com um plasmídeo de expressão contendo o miR-4721 e o miR-564. Na **figura** 22 podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa na expressão

da luciferase entre as células transfectadas com o miR-4721 e o miR-564, quando comparadas com o controle (miR-scrambled) em todos os casos testados.

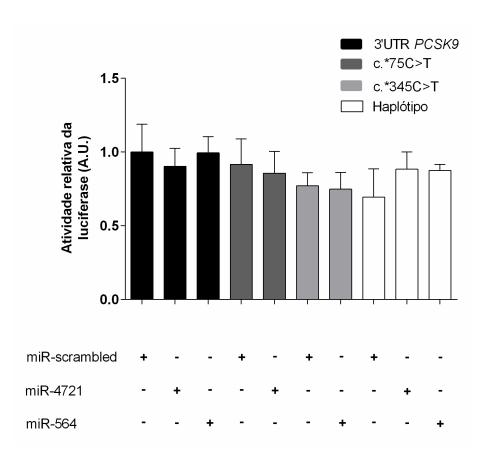
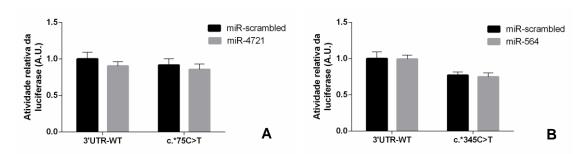


Figura 22 – Atividade relativa da luciferase em células HEK293FT.

Nota: Para avaliar a interação miRNA-mRNA, as células foram transfectadas com a 3'UTR da *PCSK9* juntamente com o miR-4721 e o miR-564. Para avaliar o impacto da variante c.\*75C>T na ligação do miR-4721, as células foram transfectadas com a 3'UTR da *PCSK9* contendo a variante c.\*75C>T e o miR-4721. Para avaliar o impacto da variante c.\*345C>T na ligação do miR-564, as células foram transfectadas com a 3'UTR da *PCSK9* contendo a variante c.\*345C>T e o miR-564. Para avaliar o impacto da presença das três variantes encontradas em desequilíbrio de ligação (figura 18) na ligação do miR-4721 e miR-564, as células foram transfectadas com a 3'UTR da *PCSK9* contendo as três variantes (haplótipo) e os miR-4721 e miR-564. O miR-scrambled foi utilizando como controle. A atividade da luciferase foi normalizada utilizando o vetor de expressão GLuc-SEAP. Variáveis comparadas por Kruskal-Wallis e comparação em pares pelo teste Mann-Whitney (N = 4 para cada grupo, com exceção do haplótipo onde n=2).

Na **figura 23**, observa-se que a presença da variante c.\*75C>T não alterou a atividade da luciferase quando comparada com a 3'UTR da *PCSK9* WT (**23A**). Entretanto, a presença da variante c.\*345C>T diminuiu a atividade da luciferase, em comparação a 3'UTR da *PCSK9* WT (**23B**, p=0,003).



**Figura 23** – Impacto das variantes na região 3'UTR da PCSK9 na expressão da luciferase. Nota: (**A**) Não houve diferença estatisticamente significativa entre a presença da variante c.\*75C>T e a atividade da luciferase quando comparada com a 3'UTR WT. (**B**) A presença da variante c.\*345C>T diminuiu a atividade da luciferase quando comparada com a 3'UTR WT (p=0,003), independente da presença do miR-564. Variáveis comparadas por Kruskal-Wallis.

## 4.12. Quantificação da PCSK9 no plasma de pacientes HF

As características clínicas e biodemográficas dos pacientes HF (n=40) estão descritas na **Tabela 11**. A faixa etária média dos pacientes foi de  $45.9 \pm 19.8$  anos, e observou-se maior prevalência de mulheres (62,5%) e de etnia branca (58,5%). A maioria dos pacientes (45%) possui diagnóstico clínico segundo o critério MEDPED de certeza HF.

**Tabela 11** – Características dos 40 pacientes HF.

Variável		Total (40)
Idade, anos		$45,9 \pm 19,8$
Gênero	Feminino	62,5 (25)
Menopausa		26,8 (11)
Etnia	Brancos	58,5 (24)
	Negros	14,6 (6)
	Pardos	22,0 (9)
Xantomas		35,0 (14)
Xantelasmas		27,5 (11)
Arco córneo		22,5 (9)
Diagnóstico HF*	Possível	40,0 (16)
-	Provável	15,0 (6)
	Certeza	45,0 (18)
Hipertensão		48,8 (20)
Diabetes tipo 2		20,0 (8)
Síndrome metabólica		17,5 (7)
Obesidade		22,5 (9)
IMC, kg/m <sup>2</sup>		$26,1 \pm 6,3$
IAM		22,5 (9)
DAC		35,0 (14)
DAP		30,0 (12)
Angina		30,0 (12)
Estenose carótida		2,4 (1)
Tabagismo	Tabagista	10,0 (4)
· ·	Não tabagista	55,0 (22)
	Ex-tabagista	35,0 (14)
Etilismo	-	12,5 (5)
Terapia hipolipemiante		67,5 (27)

Nota: As variáveis contínuas são apresentadas como média e desvio padrão. As variáveis categóricas são apresentadas como porcentagem (número de indivíduos). AVC: acidente vascular cerebral; DAC: doença arterial coronariana; DAP: doença arterial periférica; HF: hipercolesterolemia familial; IAM: infarto agudo do miocárdio; IMC: índice de massa corporal. \*Critérios da I Diretriz de Hipercolesterolemia Familial (SANTOS et al., 2012) e da Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (FALUDI et al., 2017).

Na **tabela 12** encontram-se os dados do perfil lipídico e da concentração da PCSK9 no plasma dos 40 pacientes HF. Os pacientes apresentaram uma concentração média de colesterol total de 272,4  $\pm$  72,2 mg/dL e uma concentração média de LDL-c de 186,9  $\pm$  71,1. A concentração média de PCSK9 foi de 0,32  $\pm$  0,12  $\mu$ g/mL.

**Tabela 12** – Perfil lipídico e concentração de PCSK9 nos 40 pacientes HF.

Variáveis	Total (40)	
Perfil lipídico		
Colesterol total, mg/dL	$272 \pm 72,2$	
LDL-c, mg/dL	$187 \pm 71,1$	
HDL-c, mg/dL	$49 \pm 12,5$	
Triglicérides, mg/dL	$177 \pm 157,8$	
PCSK9, μg/mL	$0,32 \pm 0,12$	

Nota: As variáveis contínuas são apresentadas como média e desvio padrão. HF: hipercolesterolemia familial; HDL-c: colesterol em lipoproteína de alta densidade; LDL-c: colesterol em lipoproteína de baixa densidade.

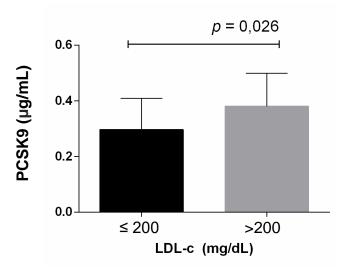
A associação entre concentrações de PCSK9 plasmática e características clínicas em pacientes HF encontra-se na **tabela 13**. Foi possível observar que pacientes com doença arterial periférica (DAP) apresentaram maiores concentrações de PCSK9 (p=0,022). Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado com presença de angina, arco córneo, doença arterial coronariana (DAC), diabetes tipo 2, hipertensão, infarto agudo do miocárdio (IAM), síndrome metabólica, xantomas e xantelasmas.

**Tabela 13** – Associação entre a concentração de PCSK9 plasmática e características clínicas em pacientes HF.

	Concentração		
	Característica clínica		<del>_</del>
Características clínicas	Ausência	Presença	
Angina	$0.32 \pm 0.13$	$0.32 \pm 0.09$	0,979
Arco córneo	$0.31 \pm 0.12$	$0.36 \pm 0.13$	0,237
DAC	$0.31 \pm 0.12$	$0.33 \pm 0.12$	0,625
DAP	$0.29 \pm 0.11$	$0.39 \pm 0.12$	0,022
Diabetes tipo 2	$0.31 \pm 0.12$	$0.36 \pm 0.13$	0,280
Hipertensão	$0.30 \pm 0.12$	$0.33 \pm 0.12$	0,491
IAM	$0.32 \pm 0.12$	$0.32 \pm 0.14$	1,000
Síndrome metabólica	$0.33 \pm 0.12$	$0.29 \pm 0.13$	0,529
Xantomas	$0.33 \pm 0.12$	$0.30 \pm 0.12$	0,335
Xantelomas	$0,33 \pm 0,12$	$0,30 \pm 0,12$	0,461

Nota: As variáveis contínuas são apresentadas como média e desvio padrão e foram comparadas por test *t*. AVC: acidente vascular cerebral; DAC: doença arterial coronariana; DAP: doença arterial periférica; HF: hipercolesterolemia familial; IAM: infarto agudo do miocárdio.

Na **figura 24** pode-se observar que o grupo com LDL-c acima de 200 mg/dL apresentou maiores concentrações de PCSK9 plasmática quando comparadas com o grupo com LDL-c  $\leq$  200 mg/dL (p=0,026).



**Figura 24** — Associação entre concentrações de LDL-c e PCSK9 plasmática em pacientes HF. Nota: As variáveis são apresentadas como média e desvio padrão e foram comparadas por test *t*. LDL-c ≤ 200 mg/dL (n=27); LDL-c > 200 mg/dL (n=12).

## 5. DISCUSSÃO

Estudos que visam à caracterização funcional *in vitro* de possíveis variantes de ganho de função na *PCSK9* são de extrema importância, pois pacientes que possuem essas variantes tem uma maior concentração de LDL-c, devido a maior degradação do LDLR mediada pela PCSK9. Essas variantes podem também comprometer a resposta dos pacientes as estatinas, de modo que uma caracterização precisa dessas variantes se torna fundamental para um melhor direcionamento terapêutico. Variantes de ganho de função podem ser ocasionadas, por exemplo, devido a variantes na região codificadora do gene que resultem na troca de aminoácidos, o que pode aumentar a afinidade da PCSK9 pelo LDLR, ou por variantes na região regulatória, como a 3'UTR, que levem a um aumento da transcrição desse gene.

O estudo de sequenciamento dos éxons e regiões flanqueadoras de 48 pacientes, anterior a este, descreveu variantes do tipo *missense* na região codificadora do gene da *PCSK9* tais como: E32K que determina a alteração na sequência que se localiza na região do pró-domínio N-terminal (31-152 aa) da proteína; a variante R237W estabelece a troca de aminoácido no domínio catalítico (153-425 aa) e finalmente, as variantes A443T, R469W, Q619P e R680Q determinam alterações das sequências que se encontram no domínio C-terminal (426-692 aa) da PCSK9 (**Tabela 3**). No presente estudo a principal meta foi o estabelecimento *in vitro* das alterações funcionais que essas modificações podem ocasionar e contribuir no diagnóstico final da HF.

Apesar de estudos indicarem que a interação entre a PCSK9 e o LDLR é mediada principalmente pela ligação do domínio catalítico da PCSK9 ao domínio EGF-A do LDLR (ZHANG et al., 2007; KWON et al., 2008), outras evidências sugerem que outros domínios ou regiões de ambas as proteínas estão envolvidos na degradação do LDLR mediada pela PCSK9 (YAMAMOTO; LU; RYAN, 2010; DU et al., 2011). Du e colaboradores (2011) mostraram que os resíduos 61-70 são críticos para a remoção autocatalítica do pró-domínio. Quando estes resíduos são deletados ocorre a completa abolição do autoprocessamento da PCSK9 (DU et al., 2011). Já os resíduos da porção N-terminal do pró-domínio (31-60 aa) modulam a função da PCSK9: quando os resíduos 31-53 foram deletados houve um aumento significativo da afinidade da PCSK9 pelo LDLR (KWON et al., 2008).

O domínio C-terminal, por sua vez, está diretamente envolvido na ligação da PCSK9 ao LDLR (YAMAMOTO; LU; RYAN, 2010), fato que também é reportado no estudo de Du e colaboradores, que mostra que quando o domínio C-terminal da PCSK9 é deletado, não ocorre a degradação do LDLR. Entretanto, quando apenas o módulo 2 (534-601 aa) do domínio C-terminal foi deletado, nenhuma alteração foi observada. Quando o módulo 2 e 3 foram deletados houve uma diminuição de cerca de 50% na degradação (DU et al., 2011). Nesse mesmo estudo foi mostrado que o módulo 1 permite uma secreção eficiente da PCSK9 tanto sozinho como quando pareado ao módulo 3, fato que não é observado quando o módulo 1 é pareado com o módulo 2. Esses dados sugerem que os módulos 1 e 3 são necessários para que o processo de degradação do LDLR ocorra (DU et al., 2011).

As variantes E32K, R469W e Q619P, são encontradas na região do pró-domínio N-terminal, no módulo 1 do domínio C-terminal, e no módulo 3 do domínio C-terminal, respectivamente. Tendo em vista a função desses domínios, podemos sugerir que a variante E32K pode interferir na afinidade da PCSK9 pelo LDLR, e as variantes R469W e Q619P na degradação do LDLR mediada pela PCSK9.

A ferramenta utilizada para estabelecer metas mais direcionadas foi o uso da análise por *docking* molecular, que avaliou a interação da estrutura de cristal do LDLR com a da PCSK9 selvagem e com a da PCSK9 mutada nas seguintes posições, separadamente: R237W, A443T, R469W e Q619P. A variante E32K não pode ser analisada, pois ela se encontra no pró-domínio N-terminal, o qual é invisível em estruturas de cristais devido à falta de densidade eletrônica (DU *et al.*, 2011).

A variante R237W estabelece uma troca de uma arginina por um triptofano. A arginina é um aminoácido carregado positivamente, já o triptofano é um aminoácido com cadeia lateral hidrofóbica. Na variante A443T, ocorre a troca de uma alanina (aminoácido hidrofóbico) por uma treonina (aminoácido com cadeia lateral polar não carregada). Já na variante R469W, há a troca de uma arginina (cadeia lateral polar não carregada) por um triptofano (cadeia lateral hidrofóbica). Por fim, na variante Q619P ocorre a troca de uma glutamina (cadeia lateral polar não carregada) por uma prolina (cadeia lateral hidrofóbica) (**Figura 5**).

Um importante fator que governa o enovelamento de proteínas é a distribuição de seus aminoácidos polares e apolares. As cadeias laterais apolares (hidrofóbicas) tendem a se agrupar no interior da molécula, o que evita com que entrem em contato com a água que as cerca no interior de uma célula. Por outro lado, as cadeias laterais polares (hidrófilas), tendem a se posicionar na superfície da molécula, onde podem formar ligações de hidrogênio com a água e com outras moléculas polares (ALBERTS *et al.*, 2009, p. 127). As quatro trocas observadas foram de um aminoácido de cadeia lateral polar para um apolar ou vice e versa, o que pode implicar em uma alteração, mesmo que pequena, no enovelamento da PCSK9, que pode ter como consequência a diminuição ou o aumento da afinidade desta proteína pelo seu ligante o LDLR.

Nas figuras 5, A-D, pode-se observar que as trocas R237W e R469W, implicaram em uma possível mudança conformacional da PCSK9. No controle, a arginina na posição 237 está interagindo apenas com os aminoácidos, em sua grande maioria polares (ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina e serina), da PCSK9 (Figura 5, A). Já quando houve a troca por um triptofano, esta posição em relação ao LDLR é alterada, e o triptofano passa a interagir com os aminoácidos apolares (cisteína, fenilalanina e serina) do LDLR na sua região organizada; como o triptofano é um aminoácido apolar, esta ligação tende a ser forte, o que poderia aumentar a afinidade da PCSK9 pelo LDLR (Figura 5, B). Entretanto, Cameron e colaboradores, em 2006, observaram que células transfectadas com a variante R237W tiveram um aumento do LDLR na superfície celular, o que contrapõe este achado (CAMERON *et al.*, 2006). As predições *in silico* (Tabela 4) indicam que esta variante leva a uma perda de função catalítica, sendo fisiopatologicamente favorável ao portador dessa variante, o que corrobora com os achados de Cameron e colaboradores (2006).

Na avaliação por *docking* molecular, quando analisado o controle na posição 469 a arginina está interagindo com os aminoácidos polares (ácido aspártico, asparagina, glutamina e serina) do LDLR (**Figura 5, C**), porém quando há a troca pelo triptofano, o mesmo passa a interagir com os aminoácidos apolares (fenilalanina, leucina e prolina) do LDLR em sua região organizada, o que poderia aumentar a sua afinidade pelo LDLR, devido a essa região possuir características de interação hidrofóbica. Esta variante já foi associada com HF em uma paciente da República dos Camarões (ALLARD *et al.*, 2005). Como o resíduo R encontra-se conservado em várias espécies, como humanos, rato, gambá,

galinha, *X. laevis e* em Medaka (peixe-arroz) (CAMERON *et al.*, 2008a), uma alteração nessa posição poderia implicar em alguma modificação estrutural nessa proteína, o que suporta os dados encontrados no presente estudo na análise por *docking* molecular.

A variante R469W foi detectada no caso index 2, o qual apresentou altas concentrações de LDL-c mesmo em terapia (**Tabela 5**). A presença da variante R469W poderia influenciar nessa resposta, visto que a administração de estatinas reduz o LDL-c por induzir a expressão de SREBP-2, o que leva a um aumento na expressão de LDLR (HUA, *et al.*, 1993; SHENG, *et al.*, 1995), porém também aumenta a expressão gênica da *PCSK9*. O aumento da expressão da *PCSK9* diminui o efeito das estatinas, pois a PCSK9 degrada o LDLR (DUBOC *et al.*, 2004; RASHID *et al.*, 2005). Sendo assim, uma variante nesse gene que determine ganho de função da proteína aumentaria a afinidade da PCSK9 pelo LDLR, o que implicaria em uma maior degradação do LDLR, e consequentemente, em uma diminuição do efeito das estatinas.

Já para as trocas A443T e Q619P não foram observadas mudanças nas posições quando comparadas com o controle. A análise por *docking* molecular sugere que os aminoácidos trocados estão interagindo apenas com aminoácidos da PCSK9 (**Figura 5, E-H**). Estas variantes foram encontradas tanto em pacientes com concentrações altas e baixas de LDL-c (KOTOWSKI *et al.*, 2006), sendo possivelmente variantes neutras, o que confirma os dados da predição *in silico* que indicam que estas variantes seriam benignas (**Tabela 4**).

A variante E32K foi associada com altas concentrações de LDL-c em pacientes com HF em populações japonesas (NOGUCHI *et al.*, 2010; MABUCHI *et al.*, 2011; MABUCHI *et al.*, 2014) e coreana (HAN *et al.*, 2015), dado que confere com a predição *in silico* do *ClinVar* de que esta seria uma variante possivelmente patogênica (**Tabela 4**). O resíduo E encontra-se conservado em algumas espécies, como em humanos, macacos, elefantes, peixe-zebra e em *X. laevis* (CAMERON *et al.*, 2008a), o que pode indicar que uma troca de E por R nessa posição interfira na região do pró-domínio desta proteína.

Para confirmar a presença desta variante em uma família brasileira com ascendência japonesa e que possui altas concentrações de LDL-c (**Tabelas 5** e **6**), realizou-se o sequenciamento, desta região do gene da *PCSK9* pelo método de Sanger, do paciente portador de HF e seus progenitores. A variante E32K foi confirmada no filho e na mãe,

ambos portadores de HF, mas não no pai (não portador de HF), podendo sugerir que a mesma está associada à HF nesta família (**Figura 6**). Esse achado corrobora para o diagnóstico genético de HF do caso index 1 pela variante E32K (**Tabela 5**).

A escassez de dados bibliográficos e a contradição das predições *in silico* reafirmam a importância de estudos funcionais que elucidem a possível patogenicidade dessas variantes. Neste projeto foi realizada a caracterização funcional das variantes E32K e R469W, as quais apresentam uma frequência alélica menor do que 1,0% nos bancos de dados *1000 genomes*, *ExAC* e *ABraOM* e, conforme citado anteriormente, seriam provavelmente mutações de ganho de função.

Para isso, inicialmente, foi realizado a mutagênese sítio-dirigida das variantes E32K e R469W, em um plasmídeo pcDNA3.1 subclonado com o cDNA da PCSK9. Pode-se observar que a digestão dos plasmídeos purificados (**Figuras 7** e **8**), seguido do dado do sequenciamento (**Figuras 9** e **10**) confirmaram a presença do inserto (cDNA da PCSK9) e das variantes E32K e R469W no plasmídeo pcDNA3.1. A variante E32K apresenta a troca de um G por A, na posição 94 do cDNA da PCSK9 (**Figura 9**). Já a variante R469W, apresenta uma troca de um C por T na posição 1405 (**Figura 10**). Após essa confirmação, as células HEK293FT foram transfectadas com esses plasmídeos. Essa linhagem celular foi selecionada por ter sido utilizada em outros estudos funcionais semelhantes que mostraram resultados importantes (FASANO *et al.*, 2009, ABIFADEL *et al.*, 2012, DI TARANTO *et al.*, 2017, ELBITAR *et al.*, 2018).

Para avaliar a eficiência da transfecção, as células HEK293FT foram cotransfectadas com o plasmídeo plv-GFP (**Figura 11**) e analisadas por citometria de fluxo após 24 horas. Os dados mostraram uma porcentagem de eficiência de transfecção de 17,5% nas células contendo o vetor vazio, 16,5% nas células contendo o vetor com a PCSK9, 13,9% nas células contendo o vetor com a variante E32K e 14% nas células contendo o vetor com a variante R469W (**Figura 12**). Para avaliar a viabilidade celular 24h pós-transfecção, as células foram marcadas com PI e analisadas novamamente por citometria de fluxo. Os resultados mostraram uma porcentagem de morte celular de 25,6% nas células que não foram transfectadas, 54,2% nas células contendo o vetor vazio, 52,2% nas células contendo o vetor com a PCSK9, 55,4% nas células contendo o vetor com a variante E32K e 57% nas células contendo o vetor com a variante R469W. Apesar disso, a

marcação dupla para PI e GFP foi encontrada apenas em 5,24% das células contendo o vetor vazio, 3,53% nas células contendo a PCSK9, 2,34% nas células contendo a variante E32K, e 2,50% nas células contendo a variante R469W, indicando que a maioria das células que estavam expressando GFP (11 a 12%) estavam viáveis (**Figura 12**). Essa porcentagem está de acordo com um estudo semelhante de Cameron e colaboradores (2006), o qual observou uma porcentagem de eficiência de transfecção de 10 a 20% em células HepG2, a qual não interferiu na caracterização funcional de variantes de ganho e perda de função (CAMERON *et al.*, 2006). Em estudos futuros sugere-se verificar se alterações na quantidade de DNA e/ou da lipofectamine poderiam aumentar a eficiência da transfecção e a diminuir a morte celular, visto que altas concentrações de DNA e lipofectamine podem ser tóxicas para as células.

Na análise por *blotting* foi possível observar que a quantidade de PCSK9 secretada foi semelhante em células transfectadas com a PCSK9-WT e com as variantes E32K e R469W, o que sugere que essas variantes não resultam em alterações estruturais que poderiam levar a uma perda de função (**Figura 13**).

Para estudar o possível efeito das variantes E32K e R469W do gene *PCSK9* na quantidade de LDLR da superfície celular e na internalização de LDL, esses dois parâmetros foram analisados por Citometria de fluxo em células HEK293FT transfectadas transitoriamente. Essa metodologia foi escolhida por apresentar uma maior sensibilidade na detecção de diferenças no LDLR que outras metodologias, como o *Western blot* (CAMERON *et al.*, 2006).

A variante E32K apresentou uma redução de LDLR de ~5% em comparação a PCSK9-WT. Já a variante R469W, apresentou uma redução de ~11% em comparação a PCSK9-WT (**Figura 14**). Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas na redução da quantidade de LDLR na superfície celular e na internalização da LDL para ambas as variantes quando comparadas com a PCSK9-WT (**Figuras 14** e **15**), é possível que estas variantes possam contribuir, quando associadas a um conjunto de variantes deletérias em outros genes, para o fenótipo de HF.

Fasano e colaboradores (2009), estudando três variantes de ganho de função na *PCSK9*, encontraram reduções nas concentrações de LDLR na superfície celular de células linfócitos humanos transformados pelo EBV, semelhantes ao nosso estudo, onde as

variantes D129N, N425S e R496W apresentaram reduções nas concentrações de LDLR de ~12.8%, ~6% e ~7.4%, respectivamente (FASANO *et al.*, 2009).

Futuramente, outros estudos podem eventualmente validar nossos achados utilizando outras linhagens celulares, visto que diferenças na redução do LDLR e internalização de LDL podem ser encontradas entre diferentes tipos de linhagens celulares (CAMERON *et al.*, 2006).

Analisando as variantes na região 3'UTR da *PCSK9* (**Tabela 7**), foi possível prever o possível impacto de cinco variantes (c.\*75C>T, c.\*345C>T, c.\*414C>T, c.\*614C>T e c.\*849T>C) no sítio de ligação de miRNAs. A predição indicou que essas variantes poderiam impedir ou diminuir a ligação de miRNAs na região 3'UTR (**Tabela 8**). Dos 15 miRNAs que foram preditos como tendo a sua ligação impedida ou diminuída devido à presença das variantes na região 3'UTR, apenas 5 (hsa-miR-6875-5p, hsa-miR-3126-5p, hsa-miR-4721, hsa-miR-564, hsa-miR-4313) se mantiveram na análise de predição realizada pela ferramenta IPA. O miR-6875-5p e o miR-3126-5p possuem o mesmo sítio de ligação, apresentando os mesmos alvos nas análises de predição, por esse motivo para as análises posteriores apenas o miR-6875-5p foi mantido (**Figura 17**).

A variante c.\*75C>T impede a ligação do miR-6875, e diminui a ligação do miR-4721; a variante c.\*345C>T impede a ligação do miR-564; a variante c.\*414C>T impede a ligação do miR-4313 (**Tabela 9**). As variantes c.\*75C>T, c.\*345C>T e c.\*414C>T foram encontradas nos mesmos pacientes, e possuem mais de 75% de desequilíbrio de ligação entre elas (**Figura 18**).

Nesse caso, a hipótese do presente estudo foi que a presença dessas três variantes nos pacientes HF poderiam impedir ou diminuir a ligação desses quatro miRNAs na 3'UTR da *PCSK9*, o que poderia contribuir para um aumento da expressão da *PCSK9*, consequentemente, levando a uma maior degradação do LDLR. Para testar essa hipótese, utilizou-se células HepG2 que foram transfectadas com quatro miRNAs miméticos, separadamente: miR-6875, miR-4721, miR-564 e miR-4313. Após 48h da transfecção, avaliou-se a expressão dos miRNAs nas células transfectadas as quais foram comparadas com as células transfectadas com o controle negativo (*mirVana* <sup>TM</sup> *miRNA Mimic, Negative Control #1*). Todos os miRNAs foram mais expressos nas células transfectadas com os miRNAs miméticos em comparação ao controle, porém o miR-4313 apresentou um

aumento muito inferior aos demais, e por isso foi excluído das análises posteriores (**Figura 19**).

As células HepG2 transfectadas com o miR-4721, apresentaram uma pequena redução na expressão do RNAm da *PCSK9* (1,37 vezes), mas estatisticamente significativa quando comparadas com as células transfectadas com o controle negativo (*p*=0,036). Já as células transfectadas com o miR-564, apresentaram uma redução de 2,14 vezes na expressão do RNAm da *PCSK9* em comparação com o controle negativo (*p*=0,010). Células transfectadas com o miR-6875 não apresentaram alterações estatisticamente significativas na expressão do RNAm da *PCSK9* em comparação com o controle negativo (**Figura 20**). O mesmo foi observado na análise do *blotting*, onde houve uma diminuição da PCSK9 em células HepG2 transfectadas com o miR-4721 e com o miR-564, em comparação com as células transfectadas com o controle negativo e com o miR-6875. As concentrações de β-actina foram semelhantes entre os grupos (**Figura 21**).

Como os dados experimentais realizados nesse estudo indicaram que apenas o miR-4721 e o miR-564 atuavam diminuindo a expressão da *PCSK9*, foi conduzido um ensaio da luciferase para verificar a interação entre os miRNAs, miR-4721 e miR-564, e a região 3'UTR da *PCSK9*, e o possível impacto nessa interação na presença das variantes c.\*75C>T, c.\*345C>T e do haplótipo (**Figura 18**). Para validar a hipótese inicial, esperávamos que ambos os miRNAs diminuíssem a expressão da luciferase quando transfectados juntamente com a 3'UTR-WT da *PCSK9*, o que indicaria que houve a interação miRNA-RNAm, e que na presença das variantes c.\*75C>T, c.\*345C>T e do haplótipo, não houvesse a interação miRNA-RNAm, que resultaria na ausência de mudança da expressão da luciferase. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão da luciferase entre as células transfectadas com o miR-4721 e o miR-564, quando comparadas com o controle (miR-scrambled) em todos os casos testados, não sendo possível validar a interação miRNA-RNAm, tampouco a diminuição dessa interação na presença das variantes estudadas (**Figura 22**).

Variantes na região 3'UTR podem também afetar a estabilidade do RNA (STERI *et al.*, 2017). A variante c.\*75C>T não alterou a atividade da luciferase quando comparada com a 3'UTR-WT da *PCSK9* (**Figura 23A**). Entretanto, a variante c.\*345C>T diminuiu a atividade da luciferase, em comparação a 3'UTR-WT da *PCSK9* (**Figura 23B**, *p*=0,003).

Apesar de não ter sido possível realizar a análise estatística com as células transfectadas com o plasmídeo contendo o haplótipo (n=2), não foi observada uma redução na atividade da luciferase (**Figura 22**).

Para testar o possível impacto da variante c.\*345C>T na estabilidade do RNAm, seria necessário a realização de um estudo funcional que avaliasse a meia-vida do RNAm em células contendo essa variante. Também seria importante verificar se a presença das variantes c.\*75C>T e c.\*414C>T (presentes no haplótipo) anulariam o efeito da variante c.\*345C>T.

Novos estudos também são necessários para verificar o possível mecanismo de atuação dos miR-4721 e miR-564 na diminuição da expressão da *PCSK9*, visto a impossibilidade de validar a interação desses miRNAs com a 3'UTR da *PCSK9* pelo ensaio da luciferase. Não foram encontrados estudos relacionando ambos os miRNAs com doenças cardiovasculares ou genes relacionados ao metabolismo do colesterol. Para o miR-564 foram encontrados estudos envolvendo diferentes tipos de cânceres, por exemplo, foi demonstrado que a expressão positiva do miR-564 inibe a proliferação e invasão de células do carcinoma hepatocelular (LIANG *et al.*, 2017) e do câncer de pulmão (YANG *et al.*, 2015).

Em um estudo recente, Pérez-Campo e colaboradores (2017), estudando variantes na região 3'UTR de genes relacionados ao metabolismo do colesterol e utilizando um ensaio de luciferase similar ao do nosso estudo, demonstraram que as variantes c.\*279C>T e c.\*647G>A do gene *SREBF2* diminuíram a atividade da luciferase, quando comparadas com a 3'UTR-WT. Nesse estudo, eles também avaliaram o possível impacto dessas variantes na ligação de miRNAs utilizando as ferramentas de predição *in silico* PolymiRT database e mirBASE. Entretanto, não foi possível validar *in vitro* o impacto das variantes no gene *SREBF2* na ligação dos miRNAs preditos (PÉREZ-CAMPO *et al.*, 2017).

A predição *in silico* do possível impacto das variantes na região 3'UTR da *PCSK9* na ligação dos miRNAs não foi adequada para o nosso estudo, provavelmente porque os parâmetros que a maioria dessas ferramentas levam em consideração (como o favorecimento da termodinâmica na interação miRNA-RNAm e da estrutura secundária do RNAm) não são suficientes para eliminar a maioria dos falsos-positivos, principalmente na ausência de validação experimental (FRIDRICH; HAZAN; MORAN, 2019).

Para verificar o possível efeito das variantes c.\*75C>T, c.\*345C>T e c.\*414C>T na expressão da PCSK9 em pacientes com HF, foi realizada a quantificação da PCSK9 no plasma de 40 indivíduos HF (os quais fazem parte dos 48 pacientes sequenciados pelo estudo anterior do grupo). Supõe-se que devido ao tamanho amostral, não foi possível encontrar nenhuma diferença estaticamente significativa entre o grupo com o haplótipo (n=4) e o grupo sem o haplótipo (n=36). O grupo haplótipo apresentou uma concentração média de PCSK9 ( $\mu$ g/mL) de 0,34  $\pm$  0,14, de colesterol total ( $\mu$ g/dL) de 287,0  $\pm$  73,7, e de LDL-c ( $\mu$ g/dL) de 208,3  $\pm$  69,5 (**Tabela 10**). Já o grupo sem o haplótipo apresentou uma concentração média de PCSK9 ( $\mu$ g/mL) de 0,31  $\pm$  0,12, de colesterol total ( $\mu$ g/dL) de 270,8  $\pm$  72,9 e de LDL-c ( $\mu$ g/dL) de 184,5  $\pm$  71,9. O grupo haplótipo apresentou concentrações levemente maiores de PCSK9, colesterol total e LDL-c em comparação com o grupo sem o haplótipo.

Altas concentrações plasmáticas de PCSK9 foram associadas em pacientes com calcificação arterial coronariana (CAC) (ALONSO *et al.*, 2016), doença arterial coronariana (DAC) (NOSE *et al.*, 2018) e infarto agudo do miocárdio (IAM) (ALMONTASHIRI *et al.*, 2014). Evidências também sugerem uma correlação positiva entre concentrações de PCSK9 e LDL-c (LAKOSKI *et al.*, 2009).

No presente estudo observou-se que pacientes com DAP apresentaram maiores concentrações de PCSK9, quando comparados com pacientes sem DAP (*p*=0,022) (**Tabela 13**). Pacientes com LDL-c acima de 200 mg/dL também apresentaram maiores concentrações de PCSK9 circulante quando comparadas com o grupo com LDL-c ≤ 200 mg/dL (*p*=0,026) (**Figura 24**). Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado com presença de angina, arco córneo, doença arterial coronariana (DAC), diabetes tipo 2, hipertensão, infarto agudo do miocárdio (IAM), síndrome metabólica, xantomas e xantelasmas (**Tabela 13**). As principais limitações nessas análises foram o tamanho amostral (n=40), e a não exclusão de pacientes que faziam uso das estatinas, o que pode influenciar nas concentrações da PCSK9, devido à associação entre o uso de estatinas e o aumento da concentração da PCSK9 (DUBOC *et al.*, 2004; RASHID *et al.*, 2005). Futuramente seria interessante quantificar a PCSK9 circulante de todos os pacientes recrutados para o projeto temático HF, especialmente de pacientes não usuários de

estatinas. A concentração da PCSK9 circulante poderia ser utilizada como possível biomarcador de predisposição a doenças e eventos cardiovasculares nesses pacientes.

As variantes da *PCSK9* estudadas neste projeto podem não explicar individualmente o fenótipo HF, mas podem contribuir para a severidade da doença ao se associar com outras variantes em outros genes.

O caso index 1, portador da variante E32K e das variantes c.\*75C>T, c.\*345C>T e c.\*414C>T (**Figura 18**), possui uma variante no gene *APOB* c.8353A>C (N2785H), a qual foi predita como sendo possivelmente patogênica na ferramenta *Polyphen-2*; variantes de perda de função no gene *APOB* estão relacionadas com uma menor remoção de LDLs da circulação para o interior das células (VARRET *et al.*, 2008); e uma variante no gene *SLCO1B1* c.521T>C (V174A), a qual foi associada com efeitos adversos relacionados a estatinas (KITZMILLER *et al.*, 2016; HOFFMANN, 2018). O caso index 2, portador da variante R469W, possui também a variante c.56G>C (S19W) no gene *APOA5*, a qual foi associada com hipertrigliceridemia (GUARDIOLA & RIBALTA, 2017). Entretanto, não foi possível analisar a concentração de triglicérides desse paciente devido à indisponibilidade desse dado (**Tabela 5**).

Os casos index 3, 4 e 5 possuem as variantes c.\*75C>T, c.\*345C>T e c.\*414C>T. O caso index 3 possui também uma variante no gene *APOB* c.10294C>G (Q432E), considerada possivelmente danosa pelo *Polyphen-2*, e outra na *APOE* c.487C>T (R163C), predita como provavelmente danosa e deletéria, pelo *Polyphen-2* e SIFT, respectivamente. Variantes de perda de função no gene *APOE* vêm sendo reportadas em pacientes com HAD e hiperlipidemia familial combinada (MARDUEL *et al.*, 2013). Essas variantes em conjunto poderiam explicar o fato de essa paciente apresentar concentrações de CT e de LDL-c altos, mesmo em terapia (**Tabela 10**). O caso index 4 possui uma variante no gene *LDLR* c.2043C>A (C681X), a qual foi associada com HF em diferentes populações, incluindo a brasileira (LEHRMAN *et al.* 1987; ABIFADEL *et al.*, 2009; MOLFETTA *et al.*, 2017). Essa variante foi descrita primeiramente em uma população libanesa, e é responsável pela criação de um códon de parada, tendo como consequência a produção de uma proteína truncada ou parcialmente traduzida (LEHRMAN *et al.* 1987; MOLFETTA *et al.*, 2017). Por fim, o caso index 5 possui uma variante no gene *LDLR* c.1285G>A (V429M), a qual também foi associada com HF (van der GRAAF *et al.*, 2011; MOLLAKI

& DROGARI, 2016) (**Tabela 10**). Os casos index 4 e 5 apresentaram altas concentrações de LDL-c mesmo em terapia, juntamente com a presença de xantomas, possivelmente devido às variantes no gene *LDLR* (**Tabela 10**).

Este projeto demonstrou que apenas análises *in silico* não são suficientes para a caracterização precisa das variantes encontradas em estudos de sequenciamento, sendo fundamental a caracterização funcional *in vitro* dessas variantes, bem como a associação desse dado com variantes em outros genes relacionados ao metabolismo do colesterol para tentar compreender de uma forma mais ampla o fenótipo desses pacientes. O diagnóstico molecular da HF pode contribuir não somente para a melhor descrição da fisiopatologia da doença, mas também pode explicar um grande número de insucesso das terapias, onde apenas 20% dos indivíduos atingem as metas estabelecidas pela diretriz segundo VALLEJO-VAZ e colaboradores 2015.

**CONCLUSÕES** 

## 6. CONCLUSÕES

As variantes, E32K e R469W, da *PCSK9* explicam parte da expressão fenotípica da HF, mas quando associadas às análises de variantes de outros genes podem explicar a maior severidade da doença.

A predição *in silico* do possível impacto das variantes na região 3'UTR da *PCSK9* na ligação dos miRNAs não foi adequada para o nosso estudo, pois não foi possível validar a interação miRNA-RNAm.

O modelo *in vitro* com células HepG2 transfectadas com o miR-4721 e o miR-564 indica um provável mecanismo indireto de regulação da PCSK9.

Os resultados da quantificação da PCSK9 circulante nos pacientes indicam que esse dado tem grande potencial para ser utilizado como biomarcador de doenças cardiovasculares.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIFADEL, M., *et al.* Mutations in *PCSK9* cause autosomal dominant hypercholesterolemia. **Nat Genet.** 2003 Jun;34(2):154-6.

ALBERTS, B., et al. Biologia Molecular da Célula, p. 127. 5th Ed. Artmed, 2009.

ALLARD, D., *et al.* Novel mutations of the PCSK9 gene cause variable phenotype of autosomal dominant hypercholesterolemia. **Hum Mutat.** 2005 Nov;26(5):497.

ALMONTASHIRI, N. A. M., *et al.* Plasma PCSK9 levels are elevated with acute myocardial infarction in two independent retrospective angiographic studies. **PLoS One.** 2014 Sep 2;9(9):e106294. doi: 10.1371/journal.pone.0106294. eCollection 2014.

ALONSO, R., *et al.* PCSK9 and lipoprotein (a) levels are two predictors of coronary artery calcification in asymptomatic patients with familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis.** 2016 Nov;254:249-253. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.08.038. Epub 2016 Aug 27.

AWAN, Z., BAASS, A., GENEST, J. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): lessons learned from patients with hypercholesterolemia. **Clin Chem.** 2014 Nov;60(11):1380-9. doi:10.1373/clinchem.2014.225946. Epub 2014 Sep 23.

BENJANNET, S., *et al.* NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. **J Biol Chem.** 2004 Nov 19;279(47):48865-75. Epub 2004 Sep 9.

BLESA, S., *et al.* A New PCSK9 Gene Promoter Variant Affects Gene Expression and Causes Autosomal Dominant Hypercholesterolemia. **J Clin Endocrinol Metab** (2008) 93 (9): 3577-3583. DOI: https://doi.org/10.1210/jc.2008-0269. Published: 01 September 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1-1, p. 248 – 254, 1976.

BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. **Science.** 1976 Jan 16;191(4223):150-4.

- CAMERON, J., *et al.* Effect of mutations in the *PCSK9* gene on the cell surface LDL receptors. **Hum Mol Genet.** 2006 May 1;15(9):1551-8. Epub 2006 Mar 28.
- \_\_\_\_\_\_\_, *et al.* S462P in the *PCSK9* gene reduces secretion of mutant PCSK9 without affecting the autocatalytic cleavage. **Atherosclerosis.** 2009 Mar;203(1):161-5. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.10.007. Epub 2008 Oct 17.
- \_\_\_\_\_\_, *et al.* Investigations on the evolutionary conservation of PCSK9 reveal a functionally important protrusion. **FEBS J.** 2008a Aug;275(16):4121-33. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06553.x. Epub 2008 Jul 9.
- CANUEL, M., *et al.* Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) can mediate degradation of the low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1). **PLoS One.** 2013 May 13;8(5):e64145. doi:10.1371/journal.pone.0064145. Print 2013.
- CHAN, J.C., *et al.* A proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 neutralizing antibody reduces serum cholesterol in mice and nonhuman primates. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2009 Jun 16;106(24):9820-5. doi: 10.1073/pnas.0903849106. Epub 2009 May 14.
- CHEN, X., et al. SEC24A deficiency lowers plasma cholesterol through reduced PCSK9 secretion. eLife 2013;2:e00444 DOI: 10.7554/eLife.00444.
- COHEN, J., *et al.* Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in *PCSK9*. **Nat Genet.** 2005 Feb;37(2):161-5. Epub 2005 Jan 16.
- CUNNINGHAM, D., *et al.* Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. **Nat Struct Mol Biol.** 2007 May;14(5):413-9. Epub 2007 Apr 15.
- DAVIGNON, J., DUBUC, G., SEIDAH, N.G. The influence of *PCSK9* polymorphisms on serum low-density lipoprotein cholesterol and risk of atherosclerosis. **Curr Atheroscler Rep.** 2010 Sep;12(5):308-15. doi: 10.1007/s11883-010-0123-6.
- DI TARANTO, M. D. *et al.* Identification and in vitro characterization of two new *PCSK9* Gain of Function variants found in patients with Familial Hypercholesterolemia. **Scientific Reports** volume 7, Article number: 15282 (2017).
- DU, F., *et al.* Novel domain interaction regulates secretion of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) protein. **J Biol Chem.** 2011 Dec 16;286(50):43054-61. doi: 10.1074/jbc.M111.273474. Epub 2011 Oct 25.
- DUBUC, G., et al. Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase

neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2004 Aug;24(8):1454-9. Epub 2004 Jun 3.

ELBITAR, S. *et al.* New Sequencing technologies help revealing unexpected mutations in Autosomal Dominant Hypercholesterolemia. **Sci Rep.** 2018 Jan 31;8(1):1943. doi: 10.1038/s41598-018-20281-9.

ETXEBARRIA, A., *et al.* Functional characterization of splicing and ligand-binding domain variants in the LDL receptor. **Hum Mutat.** 2012 Jan;33(1):232-43. doi: 10.1002/humu.21630. Epub 2011 Nov 3.

FASANO, T., *et al.* Degradation of LDLR protein mediated by 'gain of function' PCSK9 mutants in normal and ARH cells. **Atherosclerosis.** 2009 Mar;203(1):166-71. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.10.027. Epub 2008 Nov 6.

FISHER, T.S. *et al.* Effects of pH and low density lipoprotein (LDL) on PCSK9-dependent LDL receptor regulation. **J Biol Chem.** 2007 Jul 13;282(28):20502-12. Epub 2007 May 10.

FRIDRICH, A.; HAZAN, Y.; MORAN, Y. Too Many False Targets for MicroRNAs: Challenges and Pitfalls in Prediction of miRNA Targets and Their Gene Ontology in Model and Non-model Organisms. **Bioessays.** 2019 Apr;41(4):e1800169. doi: 10.1002/bies.201800169.

GARCIA, C.K., *et al.* Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. **Science.** 2001 May 18;292(5520):1394-8. Epub 2001 Apr 26.

GENECOPOEIA. Mapa dos plasmídeos pEZX-MT05 e pEZX-MR04. Disponível em: <a href="http://www.genecopoeia.com.cn/case/vector/map/vector\_map\_pdf/pEZX-MT05.pdf">http://www.genecopoeia.com.cn/case/vector/map/vector\_map\_pdf/pEZX-MT05.pdf</a> e <a href="https://www.genecopoeia.com/wp-content/uploads/oldpdfs/product/mirna/pEZXMR04">https://www.genecopoeia.com/wp-content/uploads/oldpdfs/product/mirna/pEZXMR04</a> .pdf</a>>. Acesso em: 25 de Abril de 2019.

GOLDSTEIN, J. L., BROWN, M. S. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. **The metabolic bases of inherited diseases**. (1989) New York: McGraw-Hill; p. 1215-50.

GOLDSTEIN, J. L., HOBBS, H.H, BROWN, M.S. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver, CR.; Beaudet, AL.; Sly, WS.; Valle, D., editors. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.** Vol. 8th ed. McGraw-Hill, Inc.; New York: 2001. p. 2863-913.

GUARDIOLA, M.; RIBALTA, J. Update on *APOA5* Genetics: Toward a Better Understanding of Its Physiological Impact. **Curr Atheroscler Rep.** 2017 Jul;19(7):30. doi: 10.1007/s11883-017-0665-y.

FALUDI, A. *et al.* Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose - 2017. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**, v. 109, n. 1, 2017.

HAN, S.M., *et al.* Genetic testing of Korean familial hypercholesterolemia using whole-exome sequencing. **PLoS One.** 2015 May 11;10(5):e0126706. doi: 10.1371/journal.pone.0126706. eCollection 2015.

HENDERSON, R., *et al.* The genetics and screening of familial hypercholesterolemia. **J Biomed Sci.** 2016; 23: 39. Published online 2016 Apr 16. doi: 10.1186/s12929-016-0256-1.

HOBBS, H.H., *et al.* Deletion of exon encoding cysteine-rich repeat of low density lipoprotein receptor alters its binding specificity in a subject with familial hypercholesterolemia. **J Biol Chem.** 1986 Oct 5;261(28):13114-20.

HOFFMANN, M. M. Towards a More Personalized Treatment of Dyslipidemias to Prevent Cardiovascular Disease. **Current Cardiology Reports**, v. 20, n. 7, p. 56, 25 jul. 2018.

HORTON, J.D., COHEN, J.C., HOBBS, H.H. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. **Trends Biochem Sci.** 2007 Feb;32(2):71-7. Epub 2007 Jan 9.

\_\_\_\_\_\_\_, COHEN, J.C., HOBBS, H.H. PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism. **J Lipid Res.** 2009 Apr;50 Suppl:S172-7. doi: 10.1194/jlr.R800091-JLR200. Epub 2008 Nov 19.

HUA, X., *et al.* SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1993 Dec 15; 90(24): 11603–11607.

INVITROGEN. pcDNA<sup>TM</sup>3.1(+) - pcDNA<sup>TM</sup>3.1(-). Catalog nos. V790-20 and V795-20, Version K, 10 November 2010 28-0104.

KHACHADURIAN, A.K. The Inheritance of Essential Familial Hypercholesterolemia. **Am J Med.** 1964 Sep;37:402-7.

KITZMILLER, J. P. *et al.* Pharmacogenomics of statins: Understanding susceptibility to adverse effects. **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**, v. 9, p. 97–106, 2016.

KOTOWSKI, I.K., *et al.* A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol. **Am J Hum Genet.** 2006 Mar;78(3):410-22. Epub 2006 Jan 20.

KOZAKOV, D. *et al.* The ClusPro web server for protein-protein docking. **Nat Protoc.** 2017 Feb;12(2):255-278. doi: 10.1038/nprot.2016.169. Epub 2017 Jan 12.

KWON, H.J., *et al.* Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2008 Feb 12;105(6):1820-5. doi: 10.1073/pnas.0712064105. Epub 2008 Feb 4.

- LABONTÉ, P., *et al.* PCSK9 impedes hepatitis C virus infection in vitro and modulates liver CD81 expression. **Hepatology.** 2009 Jul;50(1):17-24. doi:10.1002/hep.22911.
- LAKOSKI, S. G., *et al.* Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. **J** Clin Endocrinol Metab. 2009 Jul;94(7):2537-43. doi: 10.1210/jc.2009-0141. Epub 2009 Apr 7.
- LEHRMAN, M. A., *et al.* The Lebanese allele at the low density lipoprotein receptor locus. Nonsense mutation produces truncated receptor that is retained in endoplasmic reticulum. **J Biol Chem.** 1987 Jan 5;262(1):401-10.
- LEREN, T.P. Mutations in the *PCSK9* gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia. **Clin Genet.** 2004 May;65(5):419-22.
- LIANG, C., *et al.* miR-564 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion by targeting the GRB2-ERK1/2-AKT axis. **Oncotarget.** 2017 Nov 18;8(64):107543-107557. doi: 10.18632/oncotarget.22504. eCollection 2017 Dec 8.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods.** 2001 Dec;25(4):402-8.
- MABUCHI, H., *et al.* Molecular genetic epidemiology of homozygous familial hypercholesterolemia in the Hokuriku district of Japan. **Atherosclerosis.** 2011 Feb;214(2):404-7. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.11.005. Epub 2010 Nov 13.
- MARDUEL, M., *et al.* Description of a large family with autosomal dominant hypercholesterolemia associated with the *APOE* p.Leu167del mutation. **Hum Mutat.** 2013 Jan;34(1):83-7. doi: 10.1002/humu.22215. Epub 2012 Oct 11.
- MAXWELL, K.N., BRESLOW, J.L. Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2004 May 4;101(18):7100-5. Epub 2004 Apr 26.
- MOLFETTA, G. A., *et al.* Mutational screening in the LDLR gene among patients presenting familial hypercholesterolemia in the Southeast of Brazil. **Genet Mol Res.** 2017 Aug 31;16(3). doi: 10.4238/gmr16039226.

MOLLAKI, V.; DROGARI, E. Genetic causes of monogenic familial hypercholesterolemia in the Greek population: Lessons, mistakes, and the way forward. **J Clin Lipidol.** 2016 Jul-Aug;10(4):748-756. doi: 10.1016/j.jacl.2016.02.020. Epub 2016 Mar 23.

MOMTAZI, A. A., *et al.* MicroRNAs: New Therapeutic Targets for Familial Hypercholesterolemia? **Clin Rev Allergy Immunol.** 2018 Apr;54(2):224-233. doi: 10.1007/s12016-017-8611-x.

MÜLLER, C. Xanthomata, Hypercholesterolemia, Angina Pectoris. **Journal of Internal Medicine**, 12 January 1938. DOI: 10.1111/j.0954-6820.1938.tb19279.x.

NAELI, P., *et al.* Post-transcriptional Regulation of PCSK9 by miR-191, miR-222, and miR-224. **Front. Genet.**, 27 November 2017 | https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00189

NAURECKIENE, S., MA, L., SREEKUMAR, K., PURANDARE, U., LO, C.F., HUANG, Y., *et al.* Functional characterization of Narc 1, a novel proteinase related to proteinase K. **Arch Biochem Biophys.** 2003 Dec 1;420(1):55-67.

NOGUCHI, T., *et al.* The E32K variant of PCSK9 exacerbates the phenotype of familial hypercholesterolaemia by increasing PCSK9 function and concentration in the circulation. **Atherosclerosis.** 2010 May;210(1):166-72. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.11.018. Epub 2009 Nov 20.

NORDESTGAARD, B., *et al.* Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. **Eur Heart J.** 2013 Dec;34(45):3478-90a. doi: 10.1093/eurheartj/eht273. Epub 2013 Aug 15.

NOSE, D., *et al.* Association between plasma levels of PCSK9 and the presence of coronary artery disease in Japanese. He**art Vessels.** 2019 Jan;34(1):19-28. doi: 10.1007/s00380-018-1218-1. Epub 2018 Jul 5.

PARK, S.W., MOON, Y.A., HORTON, J.D. Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. **J Biol Chem.** 2004 Nov 26;279(48):50630-8. Epub 2004 Sep 22.

PÉREZ-CAMPO, F. M., *et al.* Functional analysis of new 3' untranslated regions genetic variants in genes associated with genetic hypercholesterolemias. **J Clin Lipidol.** 2017 Mar - Apr;11(2):532-542. doi: 10.1016/j.jacl.2017.02.004. Epub 2017 Feb 28.

POIRIER, S., *et al.* The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2. **J Biol Chem.** 2008 Jan 25;283(4):2363-72. Epub 2007 Nov 26.

POIRIER, S., MAYER, G. The biology of PCSK9 from the endoplasmic reticulum to

lysosomes: new and emerging therapeutics to control low-density lipoprotein cholesterol. **Drug Des Devel Ther.** 2013 Oct 4;7:1135-48. doi:10.2147/DDDT.S36984. eCollection 2013.

RAAL, F.J., *et al.* Reduction in mortality in subjects with homozygous familial hypercholesterolemia associated with advances in lipid-lowering therapy. **Circulation.** 2011 Nov 15;124(20):2202-7. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.042523. Epub 2011 Oct 10.

RASHID, S., *et al.* Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2005 Apr 12;102(15):5374-9. Epub 2005 Apr 1.

RICHARDS, S., *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genet Med.** 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5.

SABATINE, M. S., *et al.* Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. **N Engl J Med.** 2017 May 4;376(18):1713-1722. doi: 10.1056/NEJMoa1615664. Epub 2017 Mar 17.

SANTOS, R.D., *et al.* Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). **Arq Bras Cardiol** 2012;99(2 Supl. 2):1-28.

SEIDAH, N.G., *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2003 Feb 4;100(3):928-33. Epub 2003 Jan 27.

\_\_\_\_\_\_, *et al.* The activation and physiological functions of the proprotein convertases. **Int J Biochem Cell Biol.** 2008;40(6-7):1111-25. doi: 10.1016/j.biocel.2008.01.030. Epub 2008 Feb 8.

\_\_\_\_\_\_. PCSK9 as a therapeutic target of dyslipidemia. **Expert Opin Ther Targets.** 2009 Jan;13(1):19-28. doi:10.1517/14728220802600715.

\_\_\_\_\_. Proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) inhibitors in the treatment of hypercholesterolemia and other pathologies. **Curr Pharm Des.** 2013;19:3161–3172.

SEIDAH, N.G., PRAT, A. The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. **J Mol Med (Berl).** 2007 Jul;85(7):685-96. Epub 2007 Mar 10.

SHAN, L., *et al.* PCSK9 binds to multiple receptors and can be functionally inhibited by an EGF-A peptide. **Biochem Biophys Res Commun.** 2008 Oct 10;375(1):69-73. doi:10.1016/j.bbrc.2008.07.106. Epub 2008 Jul 31.

SHENG, Z., *et al.* Independent regulation of sterol regulatory element-binding proteins 1 and 2 in hamster liver. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1995 Feb 14;92(4):935-8.

SILVA, S., *et al.* In vitro functional characterization of missense mutations in the *LDLR* gene. **Atherosclerosis.** 2012 Nov;225(1):128-34. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.08.017. Epub 2012 Aug 20.

SORIA, L.F., *et al.* Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1989 Jan;86(2):587-91.

SOUTAR, A.K., NAOUMOVA, R.P. Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med.** 2007 Apr;4(4):214-25.

SSC. Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. **BMJ.** 1991 Oct 12; 303(6807): 893–896.

STEIN, E.A. Low-density lipoprotein cholesterol reduction by inhibition of PCSK9. **Curr Opin Lipidol.** 2013 Dec;24(6):510-7. doi:10.1097/MOL.0000000000000021.

STERI, M. *et al.* Genetic variants in mRNA untranslated regions. **Wiley Interdiscip Rev RNA.** 2018 Jul;9(4):e1474. doi: 10.1002/wrna.1474. Epub 2018 Mar 26.

THOMAS, P.; SMART, T. G. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. **J Pharmacol Toxicol Methods.** 2005 May-Jun;51(3):187-200.

VALLEJO-VAZ, A.J., *et al.* Familial hypercholesterolaemia: A global call to arms. **Atherosclerosis.** 2015 Nov;243(1):257-9. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.09.021. Epub 2015 Sep 18.

Van der GRAAF, A., *et al.* Molecular basis of autosomal dominant hypercholesterolemia: assessment in a large cohort of hypercholesterolemic children. **Circulation.** 2011 Mar 22;123(11):1167-73. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.979450. Epub 2011 Mar 7.

VARRET, M. *et al.* Genetic heterogeneity of autosomal dominant hypercholesterolemia. **Clin Genet.** 2008 Jan;73(1):1-13. Epub 2007 Nov 16.

VERSMISSEN, J., *et al.* Efficacy of statins in familial hypercholesterolaemia: a long term cohort study. **BMJ.** 2008; 337: a2423. Published online 2008 Nov 11. doi: 10.1136/bmj.a2423

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). A Genetic Strategy for Preventing Early Deaths - Familial Hypercholesterolemia (FH). Geneva, 19 July 1996-7.

YAMAMOTO, T., LU, C., RYAN, R.O. A two-step binding model of PCSK9 interaction with the low density lipoprotein receptor. **J Biol Chem.** 2011 Feb 18;286(7):5464-70. doi: 10.1074/jbc.M110.199042. Epub 2010 Dec 11.

YANG, B., *et al.* MiR-564 functions as a tumor suppressor in human lung cancer by targeting ZIC3. **Biochem Biophys Res Commun.** 2015 Nov 27;467(4):690-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.082. Epub 2015 Oct 21.

YOUNG, L., *et al.* Detection of Mycoplasma in cell cultures. **Nat Protoc.** 2010 May;5(5):929-34. doi: 10.1038/nprot.2010.43. Epub 2010 Apr 22.

ZAID, A., *et al.* Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. **Hepatology.** 2008 Aug;48(2):646-54. doi: 10.1002/hep.22354.

ZAMBRANO, T. *et al.*Impact of 3'UTR genetic variants in PCSK9 and LDLR genes on plasma lipid traits and response to atorvastatin in Brazilian subjects: a pilot study. **Int J Clin Exp Med.** 2015 Apr 15;8(4):5978-88. eCollection 2015.

ZHANG, D.W., *et al.* Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. **J Biol Chem.** 2007 Jun 22;282(25):18602-12. Epub 2007 Apr 23.

ZHAO, Z., *et al.* Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. **Am J Hum Genet.** 2006 Sep;79(3):514-23. Epub 2006 Jul 18.

ZIMMERMANN, L., *et al.* A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core. **J Mol Biol.** 20;430(15):2237-2243. doi: 10.1016/j.jmb.2017.12.007. Epub Dec 16.

# **ANEXOS**

# **ANEXOS**

Quadro supl. 1. Critérios para diagnóstico de Hipercolesterolemia Familial\*.

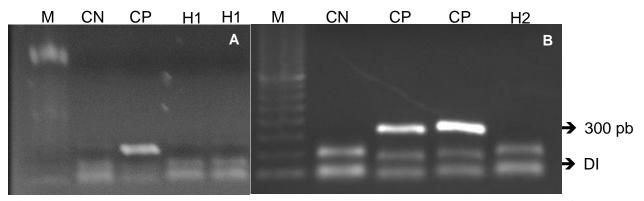
Parâmetros	Critérios	Pontos				
Histórico familiar	Parente de primeiro grau com doença vascular ou coronariana precoce					
de HF	(homem <55 anos, mulher <60 anos); OU					
	Parente adulto com colesterol total >290 mg/dL;	1				
	Parente de 1º grau portador de xantoma tendinoso e/ou arco córneo; OU	2				
	Parente de 1º grau com menos de 16 anos e colesterol total >260 mg/dL	2				
História clínica	Paciente portador de doença coronária prematura (homem <55 anos, mulher	2				
	<60 anos)					
	Paciente portador de doença arterial cerebral ou periférica prematura					
	(homem <55 anos, mulher <60 anos)					
Exame físico	Xantoma tendíneo	6				
	Arco córneo antes dos 45 anos	4				
LDL-c, mg/dL	≥ 330	8				
	250-329	5				
	190-249	3				
	155-189	1				
Análise do DNA	Presença de mutação funcional nos genes <i>LDLR</i> , <i>APOB</i> ou <i>PCSK9</i>	8				
Diagnóstico de HF	Certeza	≥8				
	Provável	6-8				
	Possível	3-5				

Nota: HF: Hipercolesterolemia Familial; LDL-c: colesterol em lipoproteína de baixa densidade. \*Critérios da I Diretriz de Hipercolesterolemia Familial (SANTOS *et al.*, 2012) e da Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (FALUDI *et al.*, 2017).

**Tabela supl. 1.** Variantes no gene *PCSK9* identificadas em pacientes com Hipercolesterolemia Familial.

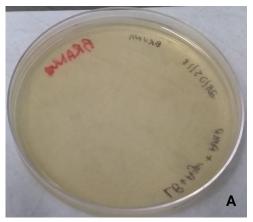
Variante	Código rs	Frequência alélica (%)				
		1000 genomes	ABraOM	Pacientes HF*		
c287G>A	rs72658888	0,52	0,95	1,04		
c245G>T	rs28362201	2,94	2,73	3,12		
c64C>T	rs45448095	9,38	8,58	2,08		
c.94G>A	rs564427867	0,04	-	1,04		
c.158C>T	rs11583680	9,13	7,83	2,08		
c.709C>T	rs148195424	0,02	0,16	2,08		
c.1327G>A	rs28362263	2,66	1,72	2,08		
c.1405C>T	rs141502002	0,18	0,25	1,04		
c.1420G>A	rs562556	86,90	82,59	77,08		
c.1856A>C	rs28362277	0,44	0,25	1,04		
c.2009G>A	rs505151	89,90	92,28	88,54		
c.2039G>A	Sem código	-	-	1,04		
c.*75C>T	rs28362287	2,48	2,54	5,20		
c.*171C>T	rs557622245	-	-	1,04		
c.*331T>C	Sem código	-	-	1,04		
c.*345C>T	rs17111555	2,54	2,36	5,20		
c.*414C>T	rs13376071	3,23	3,68	5,20		
c.*444G>C	rs28362288	1,98	1,41	2,08		
c.*571C>T	rs662145	72,42	68,22	48,96		
c.*614C>T	rs17111557	3,65	4,18	7,29		
c.*849T>C	rs28362292	1,5	-	3,12		
c.*1052C>T	rs149837083	0,06	-	1,04		

Nota: ABraOM: Arquivo Brasileiro Online de Mutações; \*frequência alélica das variantes nos 48 pacientes sequenciados.



**Figura supl. 1.** – Teste de detecção de *Mycoplasma* sp. em células HEK293FT (**1A**) e células HepG2 (**1B**). Gel de agarose 1% (corado com GelRed<sup>TM</sup>).

Nota: O controle positivo deve estar entre 200-300 pb, a ausência de bandas nessa posição indica que não houve contaminação. M: marcador de peso molecular 100 pb. CN: controle negativo; CP: controle positivo; H1: HEK293FT; H2: HepG2; DI: dímeros dos iniciadores.



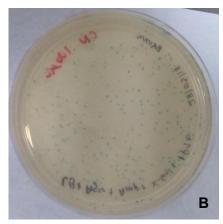
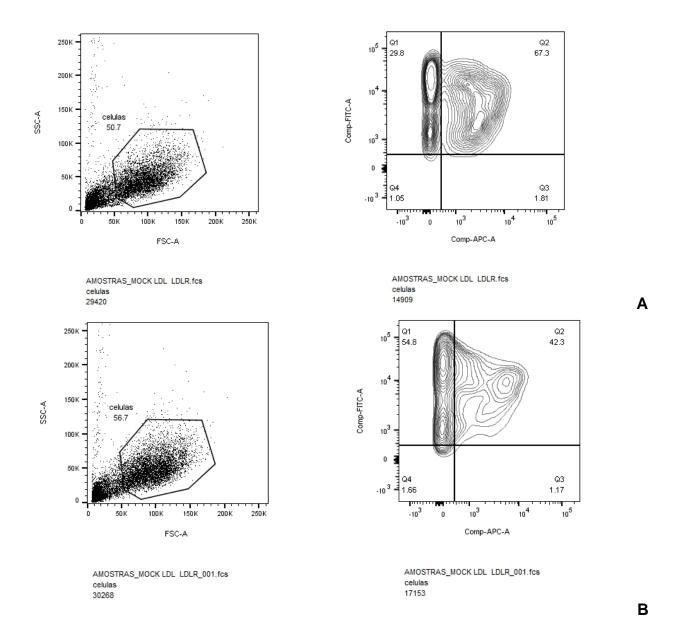
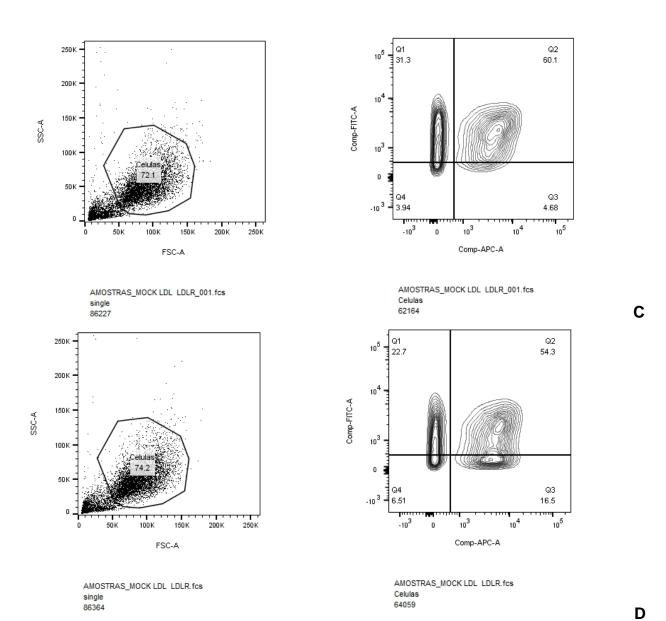
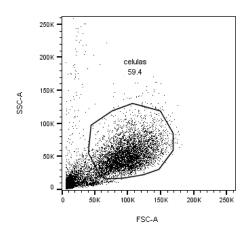


Figura supl. 2. – Controle da reação de mutagênese sítio-dirigida.

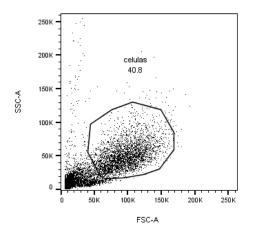
Nota: Foi realizada uma triagem de colônias azuis/brancas para verificar a taxa de eficiência da transformação. Na **figura supl. 2A** encontra-se o controle negativo e na **Figura supl. 2B** o controle positivo da transformação. Aproximadamente, 210 colônias (95%) eram azuis e 10 colônias (5%) eram brancas.



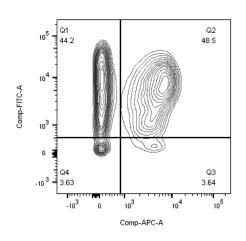




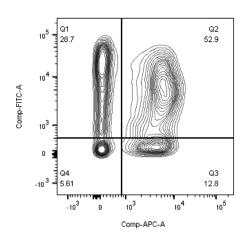
AMOSTRAS\_MOCK LDL LDLR.fcs single 54757



AMOSTRAS\_MOCK LDL LDLR\_001.fcs single 48606



AMOSTRAS\_MOCK LDL LDLR.fcs celulas 32512

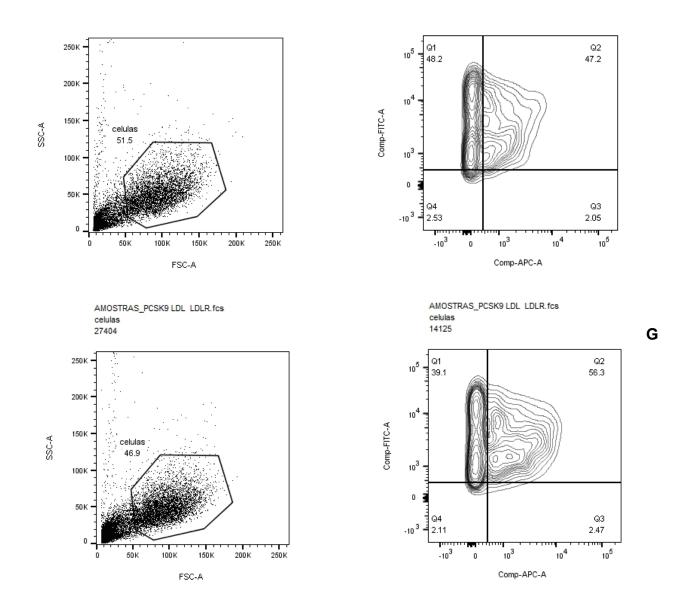


AMOSTRAS\_MOCK LDL LDLR\_001.fcs celulas 19842

119

Ε

F



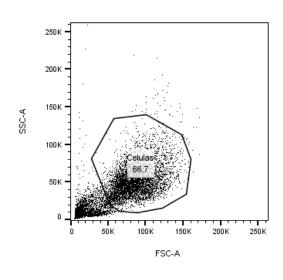
AMOSTRAS\_PCSK9 LDL LDLR\_001.fcs

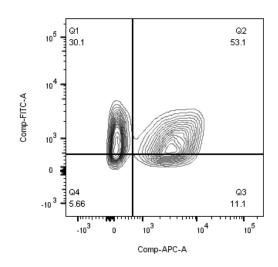
celulas 23026

Н

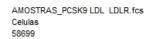
AMOSTRAS\_PCSK9 LDL LDLR\_001.fcs

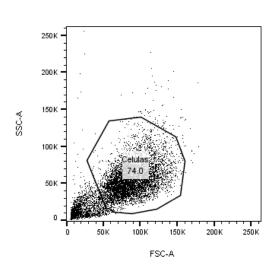
celulas 10807

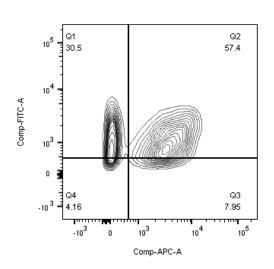




AMOSTRAS\_PCSK9 LDL LDLR.fcs single 88037





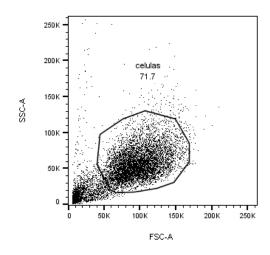


AMOSTRAS\_PCSK9 LDL LDLR\_001.fcs single 86422

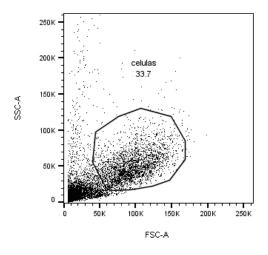
AMOSTRAS\_PCSK9 LDL LDLR\_001.fcs Celulas 63969

I

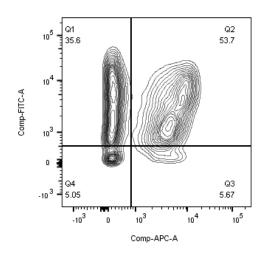
J



AMOSTRAS\_PCSK9 LDL LDLR\_001.fcs single 51626



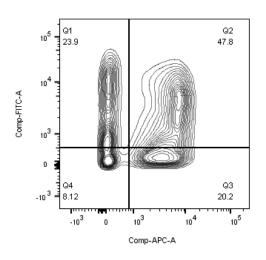
AMOSTRAS\_PCSK9 LDL LDLR.fcs single 51061



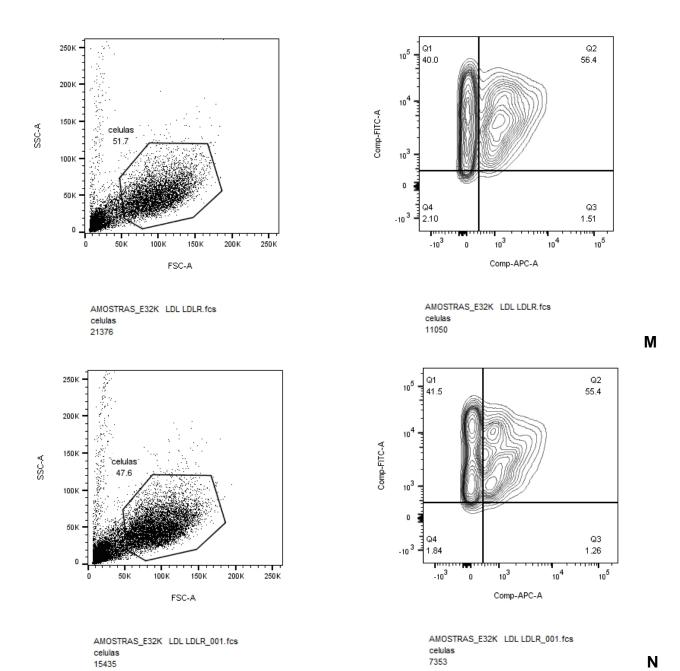
AMOSTRAS\_PCSK9 LDL LDLR\_001.fcs celulas 37024

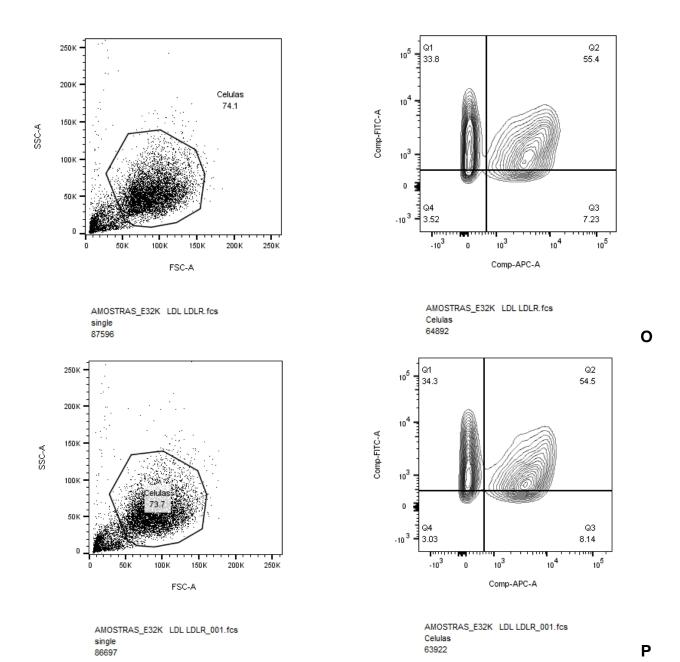
Κ

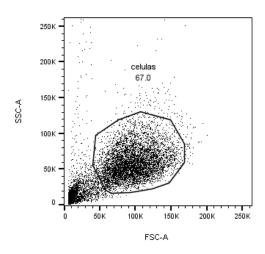
L



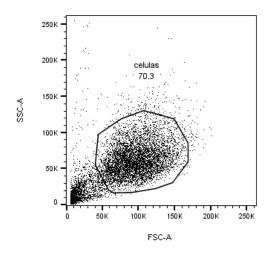
AMOSTRAS\_PCSK9 LDL LDLR.fcs celulas 17195



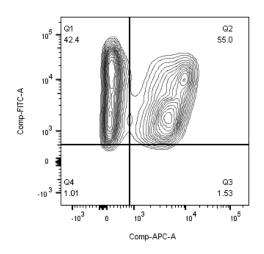




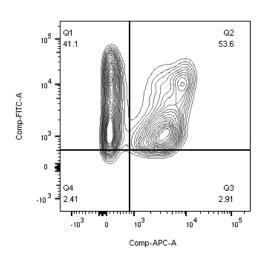
AMOSTRAS\_E32K LDL LDLR.fcs single 45319



AMOSTRAS\_E32K LDL LDLR\_001.fcs single 50440



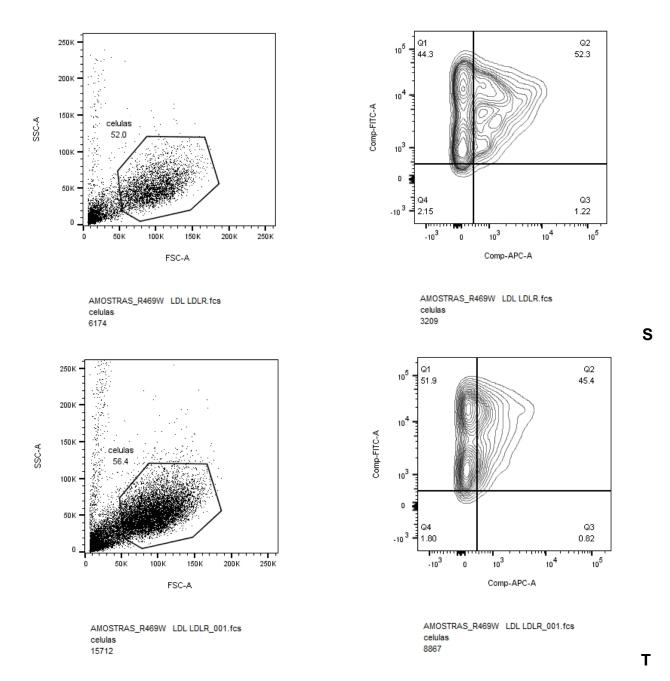
AMOSTRAS\_E32K LDL LDLR.fcs celulas 30347

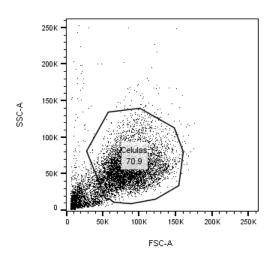


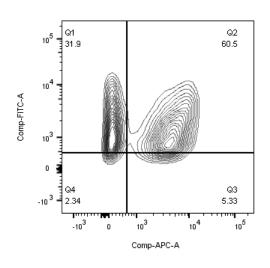
AMOSTRAS\_E32K LDL LDLR\_001.fcs celulas 35477

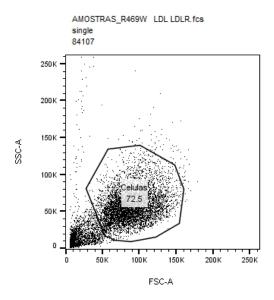
R

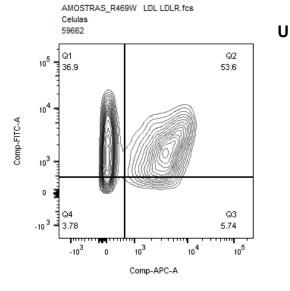
Q





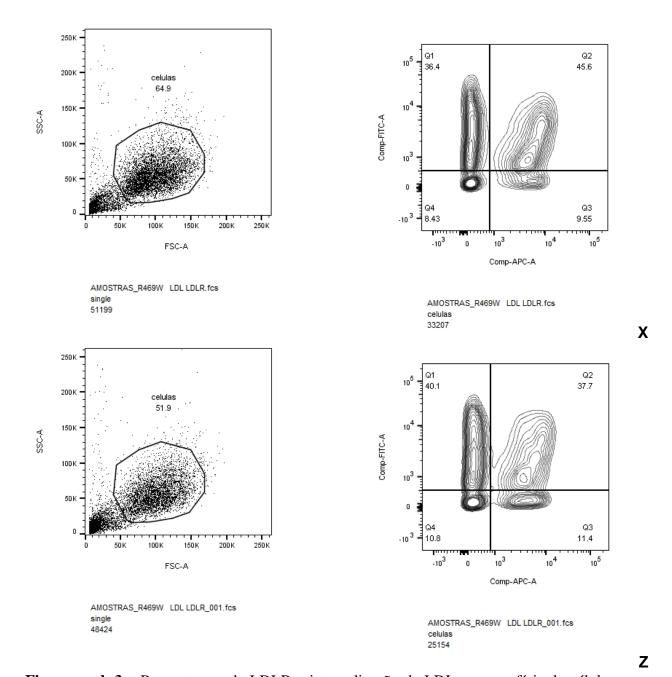






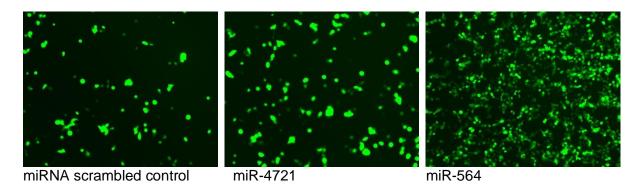
AMOSTRAS\_R469W LDL LDLR\_001.fcs single 83913 AMOSTRAS\_R469W LDL LDLR\_001.fcs Celulas 60846

٧



**Figura supl. 3** – Porcentagem de LDLR e internalização de LDL na superfície de células HEK293FT transfectadas.

Nota: A Citometria de fluxo foi utilizada para quantificar a internalização da LDL e a LDLR na superfície de células HEK293FT transfectadas com o vetor vazio, com a PCSK9 sem e com as variantes E32K e R469W. Forward Scatter (FSC) versus Side Scatter (SSC): porcentagem de células individuais selecionadas; Q1: Porcentagem de células marcadas com a LDL conjugada com BODIPY ® FL (Fluorocrmo: Comp-FITC-A); Q2: Porcentagem da marcação dupla LDL e LDLR; Q3: Porcentagem de células marcadas com anti-LDLR conjugado com Alexa Fluor 647 (Fluorocromo: Comp-APC-A). A-F: Vetor vazio; G-L: PCSK9-WT; M-R: E32K; S-Z: R469W.



**Figura supl. 4** – Fotomicrografia de células HEK293FT co-transfectadas com o plasmídeo pEZX-MR04 contendo os insertos: miR-scrambled control, miR-4721 e miR-564, respectivamente.

Nota: A fluorescência verde indica que as células estão expressando GFP.

# CAAE nº 24618713.0.1001.5462

Parecer do Comitê de Ética do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC)



#### 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: 7

CAAE: 24618713.0.1001.5462

Instituição Proponente: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia - SP

Patrocinador Principal: CNPQ

Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER** 

Número do Parecer: 1.660.468

#### Apresentação do Projeto:

A hipercolesterolemia familial (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 pirossequenciamento; (v) análise farmacogenômica incluindo genes envolvidos no metabolismo e na resposta a hipolipemiantes. As análises de bioinformática serão realizadas utilizando-se os programas MiSeq Reporter e CLC Genomic Workbench. Este estudo é pioneiro no país e a sua realização na população brasileira, altamente miscigenada, é inovadora e desafiadora.

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

Bairro: Ibirapuera CEP: 04.012-909

UF: SP Município: SAO PAULO

Página 01 de 04



Continuação do Parecer: 1.660.468

Os resultados deste estudo visam contribuir para oconhecimento 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 molecularpara 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.

#### 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:

Pesquisa segue as etapas adequadas ao trabalho científico. A emenda está sendo solicitada para ampliar os objetivos específicos e incluir métodos no projeto de pesquisa supracitado. Tal solicitação se faz necessária devido a adição de outras metodologias com o intuito de ampliar os objetivos inicialmente propostos buscando uma maior compreensão dessa do ença. Foram inclusas

**Endereço:** Av. Dr. Dante Pazzanese N. $^{\circ}$  500, Torre  $6^{\circ}$  andar

Bairro: Ibirapuera CEP: 04.012-909

UF: SP Município: SAO PAULO

Página 02 de 04



Continuação do Parecer: 1.660.468

análises epigenômicas de miRNA e metilação que serão realizadas nas amostras já armazenadas do projeto inicial

Além disso, para realizar análises funcionais das variantes encontradas no projeto original e comprovar sua relação com a fisiopatologia da doença,os pacientes que apresentarem variantes nos genes LDLR, APOB e PCSK9, serão reconvocados para uma nova coleta (4 tubos de 4 ml contentoanticoagulante EDTA). Todas as inclusões realizadas no projeto também foram adicionadas ao TCLE que segue para apreciação.

# Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado.

# Recomendações:

Nenhuma

# Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma esclarecer as datas dos documentos

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_750781 E5.pdf	30/06/2016 16:02:48		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_Instituci onal.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.	14/11/2014		Aceito

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

Bairro: Ibirapuera CEP: 04.012-909

UF: SP Município: SAO PAULO

Página 03 de 04



Continuação do Parecer: 1.660.468

Outros	pdf	12:20:49	Aceito
Outros	DECLARAÇÕES CEP Thiago D C	12/11/2013	Aceito
	Hirata.pdf	14:32:38	

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 03 de Agosto de 2016

Assinado por: Pedro Silvio Farsky (Coordenador)

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

Bairro: Ibirapuera
UF: SP **CEP:** 04.012-909

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5085-6040 Fax: (11)5085-6040 E-mail: cep@dantepazzanese.org.br

Página 04 de 04

# CAAE nº 24618713.0.3001.0067

Parecer do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP)



# FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO



### 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: 4

CAAE: 24618713.0.3001.0067

Instituição Proponente: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia - SP

Patrocinador Principal: CNPQ

Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER** 

Número do Parecer: 1.744.753

#### Apresentação do Projeto:

A hipercolesterolemia familial (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 pirossequenciamento; (v) análise farmacogenômica incluindo genes envolvidos no metabolismo e na resposta a hipolipemiantes. As análises de bioinformática serão realizadas utilizando-se os programas MiSeq Reporter e CLC Genomic Workbench. Este estudo é pioneiro no país e a sua realização na população brasileira, altamente miscigenada, é inovadora e desafiadora.

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

Bairro: Butantã CEP: 05.508-000

UF: SP Município: SAO PAULO

Página 01 de 04



# FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.744.753

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 molecularpara 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.

#### 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 poderão ser importantes para melhorar o diagnóstico, prognóstico e a prevenção dos eventos cardiovasculares em pacientes com dislipidemias primárias.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de pesquisa já aprovado pelo CEP.

# Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão adequados.

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

Bairro: Butantă CEP: 05.508-000 UF: SP Município: SAO PAULO

Página 02 de 04



# FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.744.753

# Recomendações:

Sem recomendações.

# Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem inadequações/pendências.

# Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP entende que a emenda ao projeto de pesquisa pode ser considerada aprovada.

#### Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_750781 E5.pdf	30/06/2016 16:02:48		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_Instituci onal.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:

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

Bairro: Butantã UF: SP CEP: 05.508-000

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepfcf@usp.br

Página 03 de 04



# FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.744.753

SAO PAULO, 26 de Setembro de 2016

Assinado por: Cristina Northfleet de Albuquerque (Coordenador)

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

Bairro: Butantã UF: SP CEP: 05.508-000

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepfcf@usp.br

Página 04 de 04

# Of.CiBio/0252016/FCF

Parecer da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP).





# UNVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Comissão Interna de Biossegurança

Of.CIBio/0252016/FCF

São Paulo, 21 de setembro de 2016

Senhor Professor,

Conforme parecer favorável do relator, informo a Vossa Senhoria que em reunião da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas realizada no dia 14 de setembro p.p., o Projeto "Caracterização funcional in vitro de variantes no gene PCSK9 identificadas em pacientes com Hipercolesterolemia Familiar" foi aprovado.

Atenciosamente,

YARA MARIA LIMA MARDEGAN Membro da CIBio

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. MARIO HIROYUKI HIRATA

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP

**NESTA** 

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP Fone/fax: (011) 3091-3678 - e-mail: atadfcf.usp.br

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



# Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas

#### Documento sem validade oficial

#### **FICHA DO ALUNO**

9136 - 9919992/1 - Bruna Los

brunalos@usp.br Email: Data de Nascimento: 17/05/1993

Cédula de Identidade: RG - 48792314-5 - SP Local de Nascimento: Estado de São Paulo

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Bacharel em Ciências Biológicas - Pontifícia Universidade Católica do Paraná - Paraná

- Brasil - 2016

Curso: Mestrado

Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

Área: Análises Clínicas 04/07/2016 Data de Matrícula: Início da Contagem de Prazo: 04/07/2016 06/05/2019 Data Limite para o Depósito:

Prof(a). Dr(a). Mario Hiroyuki Hirata - 04/07/2016 até o presente. Email: mhhirata@usp.br Orientador:

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 04/07/2016

120 dias Prorrogação(ões):

Período de 04/01/2019 até 04/05/2019

Data de Aprovação no Exame de

Qualificação:

Aprovado em 31/08/2017

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:

Primeira Matrícula em 04/07/2016 Histórico de Ocorrências:

Prorrogação em 15/10/2018

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2019

Impresso em: 26/04/2019 15:37:53

**Fanus** - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



# Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas

# Documento sem validade oficial

# **FICHA DO ALUNO**

#### 9136 - 9919992/1 - Bruna Los

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc	Exc.	Situação
FBC5757- 7/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	02/08/2016	14/11/2016	15	1	100	Α	Ν	Concluída
ICB5702- 10/2	Bases Moleculares das Funções Celulares (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	08/08/2016	20/11/2016	225	0	-	-	N	Matrícula cancelada
MAG5002- 1/2	Genética Molecular Humana e Genômica (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	12/08/2016	24/11/2016	120	8	81	Α	N	Concluída
ESP5101- 1/2	Bioestatística Básica (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	02/03/2017	20/04/2017	60	0		-	N	Turma cancelada
ESP5101- 1/3	Bioestatística Básica (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	07/03/2017	01/05/2017	60	4	100	Α	N	Concluída
FBC5793- 13/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	07/03/2017	19/06/2017	15	0	-	-	N	Matrícula cancelada
BIO5739- 5/4	Organização do Citoplasma da Célula Animal (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	15/03/2017	27/06/2017	120	8	93	Α	N	Concluída
BTC5734- 6/2	Organização e Fluxo da Informação Genética em Sistemas Complexos (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	08/05/2017	11/06/2017	75	5	100	Α	N	Concluída
FBC5780- 2/4	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	07/08/2017	17/09/2017	90	6	100	Α	N	Concluída
FBC5793- 14/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	05/03/2018	19/06/2018	15	1	88	Α	N	Concluída
BIE5782- 4/3	Uso da Linguagem R para Análise de Dados em Ecologia (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	09/04/2018	29/04/2018	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada

	Créditos mír	Créditos mínimos exigidos		
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação		
Disciplinas:	0	25	33	
Estágios:				
Total:	0	25	33	

# 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 04/02/2019

Impresso em: 26/04/2019 15:37:53