**A complexa genética molecular da hipercolesterolemia familiar**

Kevin Kei Kobori NUSP 9370751

Pedro Henrique Araujo Isola NUSP 10845471

**Introdução**

A hipercolesterolemia familiar (HF), é a condição genética mais comum que predispõe indivíduos a terem doença cardiovascular prematura, ela provém de mutações em alguns genes relacionados com o metabolismo de lipoproteínas, sendo eles: APOB, APOE, LDLR, PCSK9, e STAP1. Os problemas causados pela HF estão relacionados a elevados níveis do colesterol LDL-C que causam aterosclerose, o LDL possui vários efeitos deletérios de funções vasculares os quais resultam na obstrução de artérias, quando ela é sobrecarregada com o colesterol.

Um dos grandes problemas enfrentados quando se avalia a HF é a eficácia de seu diagnóstico, neles é geralmente avaliada as características físicas (xantomas tendinosos, xantelasmas ou arco senil) da doença juntamente com o histórico pessoal e familiar de doença cardiovascular prematura, além da avaliação de variantes patogênicas em um dos três principais genes associados a HF (APOB, LDLR, e PCSK9). No entanto nem sempre uma variante rara no DNA pode ser considerada patogênica, logo a avaliação clínica que leva em consideração essas variantes pode apresentar resultados falsos, além disso muitos pacientes têm as características físicas da doença sem apresentar uma variante patogênica. Outro fator que envolve a avaliação clínica da doença é o processo de triagem, sendo o processo de triagem universal o mais indicado, pois minimiza a quantidade de casos perdidos através da testagem do DNA de adultos, crianças e adolescentes, porém é um processo caro.

**Descrição do Problema**

A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença onde o indivíduo acometido possui altos níveis de LDL (low density lipoprotein) sanguíneo, devido a distúrbios no metabolismo celular. O LDL é uma partícula esférica constituído por um núcleo de moléculas de ésteres de colesterila, envolto por uma camada de moléculas de colesterol, moléculas de fosfolipídeos e uma molécula de apolipoproteína B-100 (apoB-100). O LDL possui como função carregar o colesterol do fígado para o restante do corpo, atravessando, assim, importantes vias do sistema arterial. A patogenicidade do LDL está relacionada a falhas na interiorização do LDL ao meio intracelular ou erros em sua metabolização, levando ao seu acúmulo no sistema arterial. A interiorização consiste no reconhecimento da apoB-100 por receptores específico (LDLR) presentes da superfície da membrana celular. Ao ligar-se um mecanismo de endocitose é iniciado e o complexo LDL-LDLR é levado para o interior da célula por meio de um endossomo. Em seguida, devido a mudanças no ph endossômico, o complexo é desfeito e parte do endossomo, então, segrega-se e a vesícula contendo o LDLR é reciclada na superfície da membrana plasmática. A outra parte, o endossomo com o LDL, funde-se com um lissossomo onde enzimas líticas irão agir para degradá-lo.

Na hipercolesterolemia familiar, algumas das estruturas que participam desse processo, devido a ação de variantes ou erros de processamento genéticos, sofrem alterações e modificações que culminam em defeitos metabólicos e consequente aumento dos níveis sérico do LDL sanguíneo. O LDLR, por exemplo, em alguns casos, torna-se parcialmente funcional ou totalmente disfuncional, levando a falhas na interiorização do LDL. Da mesma maneira, a APOB pode sofrer alterações em sua estrutura e dificultar o reconhecimento do LDL pelo receptor. Outro processo incidentes em alguns casos está no processo de degradação do LDL e seu receptor. Neste caso, há a participação do PCSK9 que liga-se ao LDLR e por meio de uma modificação do ph endossômico, o complexo LDL-LDLR é preservado e o receptor degradado junto com seu ligante; LDL. O seguinte artigo, explora e apresenta uma revisão da complexidade dos fatores genéticos que levam ao distúrbio metabólico e as contribuições desses fatores no diagnóstico e na compreensão da doença.

**Ferramentas e conteúdos de Biologia Molecular necessários para a resolução do problema**

A biologia molecular torna-se uma poderosa ferramenta tanto para fins de diagnóstico quanto para questões terapêuticas na Hipercolestermia Familiar, visto que muitos dos distúrbios no processo de metabolização do LDL estão ligadas a erros no processamento do RNA e variantes genéticas. Logo, a compreensão de conceitos genéticos e de mecanismos biomoleculares tornam-se essenciais tanto para a aplicação de técnicas para a identificação das variantes quanto para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos.

Há três grandes variantes genéticas envolvidas na patogenicidade do HF que são aquelas envolvidas na codificação do APOB-100, LDLR, e PCSK9. A análise detalhada utilizando métodos como o sequenciamento e mapeamento genético identificaram uma multiplicidade de tipos de mutações nesses genes. No caso LDLR, por exemplo, foram identificados: variações do número de cópias em larga escala de DNA, mutações sem sentido na região codificante, inserções e deleções dentro ou fora da região codificante, mutações de splicing, mutação de troca de sentido. Da mesma maneira, descobriu-se para o gene da APOB-100 a existência de: mutações sem sentido, mutações pontuais em resíduos de aminoácidos, substituição de um códon no DNA, deleções e inserções de nucleotídeos e mutações de splicing. Já para gene da PCSK9, identificou-se: mutações de perda/ ganho de função causados por Deleções/ inserções.

Diante disso, conceitos como: gene, variantes e polimorfismo; assim como a compreensão dos diferentes mecanismo de mutação no DNA e de processamento de RNA legitimam-se, pois comprovam a relação íntima entre o HF e sua relação com a biologia molecular. Mutações de splicing, por exemplo, podem ocorrer de diversas formas e são extremamente dependentes dos snRNPs. Se caso ocorra uma mutação na extremidade de um éxon; em uma região conservada, há a possibilidade de não haver o reconhecimento adequado das snRNPs da região de início de splicing, podendo ocorrer, assim, uma diminuição do éxon e uma deleção parcial no RNA maduro.

O sequenciamento de DNA consiste na determinação da sequência dos nucleotídeos que compõem uma parte do DNA, para que isso seja feito existem alguns métodos, sendo o mais clássico o método de Sanger. Esse método consiste na produção de diversas cópias de um DNA alvo, através da ligação de primers aos fragmentos de DNA desnaturados e síntese de pares de base pela DNA polimerase, até que um dideoxinucleotídeo (ddNTP - terminador de cadeia), marcado com corante, seja adicionado, o que impossibilita a adição de novos nucleotídeos devido a ausência de um grupo -OH no carbono 3'. Essas etapas definem um ciclo, que é repetido até que o ddNTP seja incorporado em todas as posições do DNA.

No entanto o método de Sanger é caro e ineficiente para projetos em larga escala, nesses casos é feito o sequenciamento de nova geração (NGS), que são um conjunto de técnicas que possuem um custo menor, uma maior eficiência e uma maior velocidade. O NGS é basicamente uma série de pequenas reações de Sanger realizadas em paralelo, esse paralelismo possibilita o sequenciamento de uma maior quantidade de DNA com um rendimento melhor.

No presente contexto a NGS foi utilizada para detectar variantes nos genes relacionados a HF, por exemplo, a NGS em pacientes com HF recessiva severa encontrou mutações raras em outros genes relacionados com a elevação do colesterol, como a mutação no gene ABCG5. Com o uso das novas tecnologias de sequenciamento genético a tendência é que sejam observadas cada vez mais um número maior de novas variantes do gênero.

Porém é necessário ser cauteloso com esse elevado número de variantes gênicas, pois essas variações podem ser não patogênicas, sendo necessário uma evidência funcional para comprovar sua patogenicidade, a análise dessa evidência funcional passa por diversos processos, começando por uma mutagênese do cDNA de LDLR do tipo selvagem, transferindo-o para células com atividade intrínseca mínima do receptor de LDL, seguido por uma análise reducional do receptor mutante. Posteriormente são feitos ensaios para verificar alguns fatores como: retenção no retículo endoplasmático; incapacidade de produzir o receptor maduro e ligar-se com o LDL interno; e finalmente é usado PCR para verificar se a variante afeta o processo de splicing do RNA.

**Referências**

Amanda J. Berberich and Robert A. Hegele. The complex molecular genetics of familial hypercholesterolaemia. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41569-018-0052-6>