

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO
ADULTO

JÚNEA PAOLUCCI DE PAIVA SILVINO

**HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E
SUA RELAÇÃO COM NOVOS MARCADORES DE RISCO
CARDIOVASCULAR**

Belo Horizonte

2023

JÚNEA PAOLUCCI DE PAIVA SILVINO

**HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E
SUA RELAÇÃO COM NOVOS MARCADORES DE RISCO
CARDIOVASCULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Orientadora: Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges (FAFAR/ UFMG)

Co-orientadoras: Profa. Dra. Iêda de Fátima Oliveira Silva (FAFAR/UFMG)

Dra. Cinthia Elim Jannes (INCOR /SP)

SI587h Silvano, Júnea Paolucci de Paiva.
Hipercolesterolemia Familiar [recursos eletrônicos]: caracterização molecular e sua relação com novos marcadores cardiovasculares. / Júnea Paolucci de Paiva Silvano. -- Belo Horizonte: 2023.
176f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Karina Braga Gomes Borges.
Coorientador (a): Iêda de Fátima Oliveira Silva.
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Hiperlipoproteinemia Tipo II. 2. Variantes Farmacogenômicos. 3. Fatores de Risco de Doenças Cardíacas. 4. Micropartículas Derivadas de Células. 5. Dissertação Acadêmica. I. Borges, Karina Braga Gomes. II. Silva, Iêda de Fátima Oliveira. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QU 265.5.L5

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO

ATA DE DEFESA DE TESE

Às 08:30 horas do dia vinte e um de agosto de dois mil e vinte e três, videoconferência por meio da plataforma Lifesize com transmissão no You Tube, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **JÚNEA PAOLUCCI DE PAIVA SILVINO**, número de registro 2019753540, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO. A presidência da sessão coube à professora Karina Braga Gomes Borges, Orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: Karina Braga Gomes Borges - Orientadora (UFMG), Cinthia Elim Jannes Lepski - Coorientadora (INCOR), Ieda de Fatima Oliveira Silva - Coorientadora (UFMG), Rita Carolina Figueiredo Duarte (Bioclin - Quibasa), Ricardo Simões (FCMMG), Ana Lúcia Cândido (UFMG) e Leonardo de Souza Vasconcellos (UFMG). Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua Tese de Doutorado, intitulada: **HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E SUA RELAÇÃO COM NOVOS MARCADORES DE RISCO CARDIOVASCULAR**. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar aprovada a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 21 de agosto de 2023.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Karina Braga Gomes Borges, Professora do Magistério Superior**, em 21/08/2023, às 15:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cinthia Elim Jannes Lepski, Usuário Externo**, em 21/08/2023, às 16:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Simões, Usuário Externo**, em 21/08/2023, às 16:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo de Souza Vasconcellos, Professor do Magistério Superior**, em 21/08/2023, às 17:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Lucia Candido, Professora do Magistério Superior**, em 21/08/2023, às 21:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rita Carolina Figueiredo Duarte, Usuário Externo**, em 22/08/2023, às 08:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ieda de Fatima Oliveira Silva, Professora do Magistério Superior**, em 24/08/2023, às 16:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2495554** e o código CRC **B115F606**.

DEDICATÓRIA

À ciência e à pesquisa produzida no nosso país que, com todas as dificuldades e poucos recursos, ainda conseguem ter um alcance para que mudanças no rumo das doenças ocorram e mais vidas possam ser salvas.

Aos portadores de doenças silenciosas, principalmente as cardiovasculares, que ainda, em disparada, continuam ocasionando mais morbidade e mortalidade em relação às outras doenças.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois acredito que tudo que acontece ou é colocado em nossas vidas e tornam-se nossos propósitos, sempre é por obra e providência Dele.

Agradeço imensamente à minha orientadora Karina Braga Gomes Borges, que é um exemplo de professora e pesquisadora dedicada e de muita competência, além de se tornar uma grande amiga e conselheira pela qual guardo imenso apreço e admiração.

Estendo o agradecimento à minha co-orientadora Fátima Oliveira Silva, com a qual dei início ao estudo dessa população quando me aceitou como orientanda de Mestrado na Faculdade de Farmácia da UFMG. E também à minha co-orientadora Cinthia Elim Jannes que possibilitou dentro do seu projeto Hipercol Brasil Itinerante do Instituto do Coração (InCor) proceder as análises genéticas e engrandecer ainda mais esse projeto.

Agradeço à minha família, principalmente ao meu marido Ricardo e aos meus filhos Lucas e Bernardo, que sem o apoio incondicional e compreensão nos momentos que me fiz ausente, não conseguiria executar esse trabalho.

Às instituições e seus membros docentes das faculdades de Farmácia e de Medicina da UFMG que contribuíram de alguma forma para meu engrandecimento como profissional e professora que sou hoje.

Agradeço a todos que me auxiliaram nos experimentos desse projeto em especial Dr. Rodrigo Pestana, Dra. Rita Carolina Duarte e Dra. Michelle Teodoro. Aos laboratórios parceiros: Laboratório Márcio Jardim, Laboratório Moema e Laboratório Hermes Pardini, representados pelos seus proprietários, bioquímicos e correspondentes equipes que viabilizaram a coleta e análises dos participantes, e que não mediram esforços para que tudo acontecesse de forma a cumprir as medidas pré-analíticas, mesmo quando as coletas ocorriam na zona rural.

E finalmente, à CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

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

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença genética autossômica dominante caracterizada por elevados níveis de colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDLc). Ultimamente, a lipoproteína (a) [Lp(a)] vem ganhando importância no estudo de indivíduos carreadores de variantes genéticas relacionadas à HF. A detecção de variantes genéticas em casos-índices (CI), e a avaliação em cascata de familiares de 1º e 2º grau, podem proporcionar um diagnóstico precoce para redução de desfechos desfavoráveis nessa população. O objetivo desse estudo foi caracterizar geneticamente CI com critérios clínicos de HF e seus familiares, bem como avaliar novos marcadores de risco cardiovascular (GDF-15, CXCL16, FABP3, FABP4, LIGHT, sCD14, ucMGP e micropartículas - MPs) nesses indivíduos de acordo com a presença de variantes genéticas. Foram avaliados 137 indivíduos, sendo 17 CI com variantes identificadas para HF e 120 familiares, residentes na região de Bom Despacho – MG. O sequenciamento genético foi realizado por *Next Generation Sequencing* (NGS) para os CI e pelo método de Sanger para os familiares. Foi realizada dosagem de LDLc por método colorimétrico, Lp(a) por turbidimetria, novos marcadores de risco cardiovascular pelo método multiplex para Luminex e micropartículas por citometria de fluxo. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa R Platform versão 4.2.2. Foram identificadas 7 variantes genéticas, com 86 indivíduos carreadores, sendo a maioria no gene LDLR, e 51 familiares que não carregavam as variantes pesquisadas. A Lp(a) mostrou diferença significativa entre os grupos, sendo maiores níveis encontrados no grupo com variantes. Os marcadores GDF-15, CXCL16, LIGHT, sCD14 e ucMGP não mostraram diferença significativa entre os grupos, mesmo quando analisados pela influência do tratamento com estatinas. Porém, FABP3 e FABP4 mostraram diferença significativa, apresentando maiores níveis no grupo sem variantes genéticas e em uso de estatinas. Contagens mais altas de MPs totais, micropartículas derivadas de cardiomiócitos, endotélio e aquelas expressando fator tissular, foram observadas no grupo carreador de variantes genéticas. Além disso, o grupo HF sem uso de estatinas apresentou maiores contagens destas MPs quando comparado ao grupo sem HF. Em conclusão, variantes genéticas estão associadas à HF na população estudada, e os novos marcadores de risco

cardiovascular – FABP3, FABP4 e MPs – mostraram potencial na identificação de carreadores de variantes genéticas relacionadas à HF, podendo ser úteis na identificação precoce da doença em uma população de risco, na ausência do exame genético.

Palavras-chave: hipercolesterolemia familiar; variantes genéticas; perfil lipídico; novos marcadores de risco cardiovascular; micropartículas.

ABSTRACT

Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant genetic disease characterized by elevated levels of low-density lipoprotein cholesterol (LDLc). Lately, lipoprotein (a) [Lp(a)] has gained importance in the study of individuals carrying genetic variants related to FH. The detection of genetic variants in index cases (IC), and the cascade evaluation of 1st and 2nd degree relatives, can provide an early diagnosis to reduce unfavorable outcomes in this population. The aim of this study was to genetically characterize IC with clinical criteria for FH and their relatives, as well as to evaluate new cardiovascular risk markers (GDF-15, CXCL16, FABP3, FABP4, LIGHT, sCD14, ucMGP and microparticles-MPs) in these individuals according to the presence of genetic variants. A total of 137 individuals were evaluated, 17 of which were IC with identified variants for FH and 120 family members, living in the region of Bom Despacho – MG. Genetic sequencing was performed by Next Generation Sequencing (NGS) for IC and by the Sanger method for relatives. LDLc was determined by colorimetric method, Lp(a) by turbidimetry, new markers of cardiovascular risk by multiplex method for Luminex and microparticles by flow cytometry. Statistical analyzes were performed using the R Platform version 4.2.2 program. Seven genetic variants were identified, with 86 carrier individuals, the majority in the LDLR gene, and 51 family members who did not carry the researched variants. Lp(a) showed a significant difference between groups, with higher levels found in the group with variants. GDF-15, CXCL16, LIGHT, sCD14 and ucMGP markers did not show significant difference between groups, even when analyzed by the influence of statin treatment. However, FABP3 and FABP4 showed a significant difference, with higher levels in the group without genetic variants and using statins. Higher counts of total MPs, microparticles derived from cardiomyocytes, endothelium and those expressing tissue factor were observed in the group carrying genetic variants. In addition, the FH group not using statins had higher counts of these MPs when compared to the group without FH. In conclusion, genetic variants are associated with FH in the studied population, and the new cardiovascular risk markers – FABP3, FABP4 and MPs – showed potential in identifying carriers of genetic variants related to FH, which may be useful in the

early identification of the disease in a population at risk, in the absence of genetic testing.

Keywords: familial hypercholesterolemia; genetic variants; lipid profile; new cardiovascular markers; microparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Metabolismo do Colesterol.....	26
Figura 2: Mecanismo de ação da PCSK9 sobre o LDLR.....	27
Figura 3: Xantoma tendinoso e Arco córneo.....	29
Figura 4: Fluxograma da seleção dos participantes para caracterização molecular.....	91
Figura 5: Fluxograma da seleção dos participantes para avaliação dos marcadores cardiovasculares.....	92
Figura 6: Fluxograma da seleção dos participantes para avaliação das micropartículas.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios de diagnósticos para a HF, baseados no <i>Dutch Lipid Clinic Network</i> (DLCN).....	30
Tabela 2: Painel definido para análise multiparamétrica de micropartículas por citometria de fluxo.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC- *ATP-binding cassette*

ACMG – *American college of medical genetics and genomics*

A-FABP - FABP do adipócito

ANGPTL3 - proteína semelhante à angiotensina 3

aP2 - Adipócito P2

APOA1 – Apolipoproteína A1

APOB- Apolipoproteína B

APOB-100 – Apolipoproteína B-100

APOB-48 – Apolipoproteína B- 48

APOE – Apolipoproteína E

AVE – Acidente vascular encefálico

CA – Circunferência abdominal

CardioMPS – Micropartículas de cardiomiócitos

CI – Caso-índice

CT – Colesterol total

CTEP – *Cholesterol ester transfer protein*

CXCL12 - *Chemokine ligand 12*

CXCL16- *Chemokine ligand 16*

CXCL16/SRPSox – Receptor scavenger fosfatidilserina da lipoproteína oxidada

CXCR6 - C-X-chemokine-receptor 6

DAC- Doença arterial coronariana

DASCV – Doença aterosclerótica cardiovascular

DCV - Doença cardiovascular

DGAT-2-Diacilglicerol aciltransferase-2

DLCN- *Dutch lipid clinic network*

DM – Diabetes mellitus

dp-cMGP – MGP desfosforilado-carboxilada

dp-ucMGP- MGP desfosforilada não-carboxilada

DR- Doença renal

EMPs – Micropartículas de endotélio

FABP – Proteína ligadora de ácidos graxos

FABP3 – Proteína ligadora de ácidos graxos 3

FABP4 – Proteína ligadora de ácidos graxos 4
FDB – Familiar defective apolipoprotein B
FTMPs – Micropartículas que expressam fator tissular
GDF-15 – *Growth differential factor 15*
Gene ABCG5 – Gene *ATP-binding cassette G5*
Gene ABCG8- Gene *ATP-binding cassette G8*
Gene HCHOLA4 - Gene do quarto locus para mapa de hipercolesterolemia autossômica dominante
Gene IDOL - Gene do degradador induzível do LDLR
Gene LDLRAP1- Gene da proteína adaptadora do receptor de LDL1
Gene LIPA- Gene da lipase ácida lisossomal A
Gene STPA-1 – Gene do membro da família de adaptadores de sinal 1
GPI – Glicosilfosfatidil-inositol
GPR 109 A- Receptor específico ligado à proteína G
HAS – Hipertensão arterial sistêmica
HDL – Lipoproteína de alta densidade
HDLc – Colesterol da lipoproteína de alta densidade
HF - Hipercolesterolemia familiar
H-FABP – *Heart-type fatty acid-binding protein*
HFHe – Hipercolesterolemia familiar heterozigótica
HFHo – Hipercolesterolemia familiar homozigótica
HRA- Hipercolesterolemia autossômica recessiva
IAM – Infarto Agudo do Miocárdio
IC – Insuficiência cardíaca
ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular 1
IDL – Lipoproteína de densidade intermediária
IL1 β - Interleucina 1 β
IL-6 – Interleucina 6
IL-8 – Interleucina 6
iPCSK9 – Inibidores de PCSK9
LCAT – Lecitina acil-transferase
LDL- Lipoproteína de baixa densidade
LDLc – Colesterol da lipoproteína de baixa densidade
LDLox – Lipoproteína de baixa densidade oxidada

LDLR - Receptor da lipoproteína de baixa densidade
Lp (a) – Lipoproteína (a)
LPL – Lipoproteína lípase
LPS – Lipopolissacárides
LT β R/TNFRSF3 - Receptor β de linfotoxina
mCD14 – Cluster de diferenciação 14 de membrana
MESA- *Multi Ethnic Study of Atherosclerosis*
MGP – Proteína Gla de matriz
MPs – Micropartículas
MTTP – *Microsomal triglyceride transfer protein*
NARC-1 - *Neuronal apoptosis regulated convertase 1*
NCBI – *National center for biotechnology information*
NCP1L1 – *Niemann-Pick C1-Like1*
NGS – *Next generation sequencing*
NK – Natural killer
NT-proBNP - N-terminal do peptídeo natriurético tipo B
p-cMGP - MGP fosforilado-carboxilado ativa
PCRus – Proteína C reativa ultrasensível
PCSK9 – Pro-proteína convertasesubtilisina/kexina tipo 9
PMPs – Micropartículas de plaquetas
PPAR γ - Receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma
SB – *Simon e Broome register group*
SCA – Síndrome coronariana aguda
sCD14 – Cluster de diferenciação 14 solúvel
siRNA- molécula de RNA interferente
SM – Síndrome metabólica
TG – Triglicérides
TGF – Fator transformador de crescimento
TGF- β - Fator transformador de crescimento beta
TNF – Fator de necrose tumoral
TNFSF 14 /LIGHT – *Tumor necrosis factor superfamily 14*
TnTus – Troponina T ultrasensível
TRL4 – Receptor *toll-like 4*
US MEDPED - *US Make Early Diagnosis Prevent Early Death Program*

VCAM – 1 – Molécula de adesão celular vascular 1

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	ANTECEDENTES CIENTÍFICOS	23
2.1	Metabolismo lipídico	23
2.2	Hipercolesterolemia Familiar	25
2.2.1	Diagnóstico da HF	26
2.2.2	Rastreamento universal	28
2.2.3	Rastreamento em cascata	29
2.2.3.1	Rastreamento genético em cascata	29
2.3	Genes envolvidos na HF de herança autossômica dominante	30
2.3.1	Gene do LDLR	32
2.3.2	Gene APOB	32
2.3.3	Gene da PCSK9	33
2.3.4	Gene envolvido na HF de herança autossômica recessiva	33
2.3.5	Outros genes potencialmente associados com HF	34
2.4	Tratamento Farmacológico	34
2.5	Alterações cardiovasculares na HF	37
2.5.1	Epidemiologia das doenças ateroscleróticas cardiovasculares	37
2.5.2	Doenças cardiovasculares ateroscleróticas e o impacto da HF	38
2.5.3	Perfil lipídico na HF além do LDLc	39
2.5.3.1	Lipoproteína (a) [Lp(a)]	39
2.5.3.2	Lipoproteína de alta densidade (HDL)	40
2.5.3.3	Triglicérides (TG)	41
2.5.4	Biomarcadores relacionados à doença aterosclerótica	41
2.5.4.1	Growth differential factor-15 (GDF-15)	42
2.5.4.2	Chemokine ligand 16 (CXCL-16)	43
2.5.4.3	Fatty acid binding protein 3 (FABP3)	45

2.5.4.4	Fatty acid binding protein 4 (FABP4).....	46
2.5.4.5	Tumor necrosis factor superfamily 14 (TNFSF14/LIGHT)	47
2.5.4.6	Cluster de diferenciação 14 (sCD14)	48
2.5.4.7	Proteína Gla de matriz não carboxilada circulante (ucMGP)....	49
2.5.5	Micropartículas	51
2.5.5.1	Micropartículas de cardiomiócitos (CardioMPs).....	52
2.5.5.2	Micropartículas de células endoteliais (EMPs).....	52
2.5.5.3	Micropartículas que expressam fator tissular (FTMPs)	53
2.5.5.4	Micropartículas de Plaquetas (PMPs)	54
2.6	Referências bibliográficas	55
3	OBJETIVOS	87
3.1	Objetivo Geral	87
3.2	Objetivos específicos	87
4	METODOLOGIA	88
4.1	Aspectos Éticos.....	88
4.2	Caracterização do estudo	88
4.3	Tamanho amostral	88
4.4	Crítérios de inclusão.....	91
4.5	Crítérios de não-inclusão.....	91
4.6	Coleta das amostras	91
4.7	Delineamento experimental.....	92
4.7.1	Teste genético	93
4.7.1.1	Extração de DNA.....	93
4.7.1.2	Sequenciamento do DNA.....	93
4.7.2	Lipoproteína(a) e LDLc	94
4.7.3	Dosagem dos novos marcadores de risco cardiovascular.....	96
4.7.4	Análise das micropartículas por citometria de fluxo	96

4.8	Análise estatística	97
5	CAPÍTULO 1	99
6	CAPÍTULO 2	109
7	CAPÍTULO 3	135
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	158
9	PERSPECTIVAS	160
	Anexo I	161
	Anexo II	162
	Anexo III	163
	Anexo IV	164
	Anexo V	165
	Anexo VI	166
	Anexo VII	167
	Anexo VIII	168
	Anexo IX	169
	Anexo X	170
	Anexo XI	171
	Anexo XII	172
	Anexo XIII	173
	Anexo XIV	174

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O diagnóstico clínico da hipercolesterolemia familiar (HF) ainda é muito utilizado na prática para a identificação de famílias afetadas por essa doença genética mais prevalente dentre aquelas de padrão autossômico dominante. Porém, sempre que possível, o diagnóstico genético deve ser estabelecido para confirmação da doença e estabelecimento de medidas que possam retardar a evolução da doença aterosclerótica nos portadores de HF.

Os marcadores relacionados às alterações que ocorrem no processo aterosclerótico que são sinalizadores de inflamação, como as citocinas e seus produtos, bem como marcadores de oxidação da LDL e disfunção endotelial, podem auxiliar na intervenção e tratamento para minimizar os desfechos cardiovasculares, mas não são específicos para avaliar estes desfechos. Assim, a validação de marcadores de risco cardiovascular mais específico, que se relacionem com a presença das variantes genéticas relacionadas à HF, é altamente desejável.

Assim, este estudo se justifica pela caracterização molecular de um *cluster* de pacientes com HF originados da região de Bom Despacho – MG, bem como a avaliação de novos marcadores de risco cardiovascular em indivíduos carreadores de variantes genéticas relacionadas à HF.

1 INTRODUÇÃO

A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença monogênica relacionada à presença de variantes em genes que expressam proteínas envolvidas no metabolismo do colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDLc). Esta alteração genética resulta na elevação da LDLc por toda vida, tendo como consequência o aumento do risco de desenvolvimento da doença aterosclerótica coronariana (DAC) prematura (NORDESTGAARD et al., 2013; SILVA et al., 2016; SCICALI et al., 2018).

O diagnóstico clínico da HF tem sido baseado em critérios como o de *Dutch Lipid Clinic Network* (DLCN) (WILLIAMS et al, 1993), *US Make Early Diagnosis Prevent Early Death Program* (US MEDPED) (WHO, 1999) e *Simon Broome Register Group* (NCCPCUK, 2008), onde o escore é calculado por pontos de acordo com a presença de história familiar, história clínica, presença de sinais físicos da doença e valores de LDLc suspeitos para HF (HAASE e GOLDBERG, 2012). No Brasil, a Atualização da Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar recomenda o critério de DLCN ou Dutch MEDPED, apesar de ainda não haver uma validação para a população brasileira (IZAR et al., 2021).

A HF pode ser causada por variantes patogênicas localizadas, principalmente nos genes do receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDLR), da apolipoproteína B (APOB) e da pró-proteína convertasesubtilisina/Kexina tipo 9 (PCSK9), existindo mais de 2.900 alterações genéticas associadas à HF, sendo 2.251 descritas no *gene LDLR* (85-90%) (IACOCCA et al., 2018). Em indivíduos heterozigotos, a presença de um único alelo de uma variante patogênica já é suficiente para ocasionar um aumento nos níveis de LDLc, em função do padrão autossômico dominante da doença (GOLDSTEIN e BROWN, 1989). Já nos indivíduos homozigotos, em que são herdados dois alelos com variantes patogênicas, há manifestação de formas mais graves da doença (GOLDSTEIN e BROWN, 1989). Assim, a HF pode ter múltiplos fenótipos devido a diferentes etiologias moleculares e fatores genéticos adicionais (STURM et al., 2018), porém o risco de DAC é maior em carreadores de variantes patogênicas,

provavelmente relacionado à exposição ao longo da vida a níveis elevados de LDLc (KHERA et al., 2016).

O estudo e identificação de mecanismos que governam a patogênese da doença aterosclerótica estimulam o interesse contínuo na descoberta de novos biomarcadores e alvos terapêuticos para prevenção, detecção e tratamento da doença cardiovascular (DCV), que se inicia com o processo aterosclerótico (BOTTS et al., 2021). A fisiopatologia da aterosclerose começa com a lesão endotelial, mediada por uma cascata de eventos de sinalização intra e intercelular que moldam o comportamento celular dentro dos vasos (DA LUZ et al., 2018). As células do endotélio vascular facilitam o transporte ativo da lipoproteína de baixa densidade (LDL) para o espaço subendotelial por meio de vias de transcitose e o acúmulo de LDL inicia uma resposta inflamatória (MUNDI et al., 2018), processo que ocorre intensamente na HF. No início do processo da aterosclerose, o endotélio transita de um estado quiescente para um estado ativado em resposta aos estímulos pró-aterogênicos, incluindo a LDL oxidada (LDL_{ox}) e citocinas pró-inflamatórias (RICARD et al., 2021). A complicação decorrente desse processo é principalmente a síndrome coronariana aguda (SCA), observada com maior frequência em pacientes com HF, incluindo jovens (CAHILL e REDMOND, 2016; DA LUZ et. al, 2018).

Assim, este estudo objetiva identificar variantes genéticas em um *cluster* de pacientes com suspeita clínica de HF e seus familiares, bem como avaliar novos biomarcadores de risco cardiovascular, a fim de compreender os mecanismos bioquímicos que permeiam estas alterações, bem como propor novos marcadores de monitoramento no diagnóstico e evolução da DAC, podendo ser usado como marcador prognóstico em pacientes com HF.

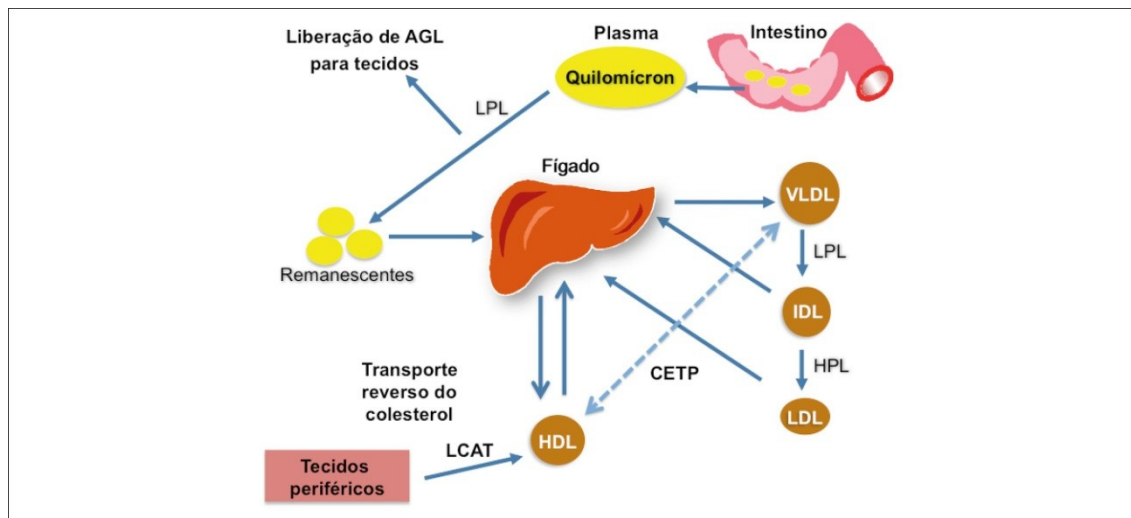
2 ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

2.1 Metabolismo lipídico

O colesterol presente na dieta, após sofrer ação dos ácidos biliares formando micelas, é absorvido nos enterócitos localizados na porção do jejuno médio e íleo terminal do intestino delgado, por meio da proteína transportadora do colesterol, a Niemann-Pick C1-Like1 (NPC1-L1), situada na porção apical da membrana da borda em escova dessas células. Os triglicérides (TG) dietéticos são digeridos no duodeno e absorvidos no íleo proximal por meio da ação das lipases pancreáticas e intestinais, sendo, na presença de ácidos biliares, hidrolisados em glicerol, monoglicérides e ácidos graxos. Após a absorção, os lipídeos são agrupados por meio da *microsomal triglyceride transfer protein* (MTTP) no retículo endoplasmático dos enterócitos. A combinação de triglicérides, colesterol, fosfolipídeos e apolipoproteína B-48 (APOB-48) formam os quilomícrons. Os quilomícrons recém-formados no enterócito saem para a linfa e caem na corrente sanguínea e podem sofrer ação da lipase lipoprotéica (LPL) nos tecidos e liberar ácidos graxos livres. Os quilomícrons remanescentes são rapidamente captados pelos receptores hepáticos, os quais reconhecem a APOB-48 e a apolipoproteína E (APOE), onde serão utilizados para a formação das lipoproteínas que fazem parte do ciclo endógeno do colesterol. No hepatócito, a MTTP reagrupa os TG, colesterol, fosfolipídeos e agora com a presença de apolipoproteína B-100 (APOB-100), forma a lipoproteína de muito baixo peso molecular (VLDL). A liberação de VLDL pelo fígado sofre lipólise progressiva pela ação da LPL presente no endotélio e nos tecidos periféricos se transforma em lipoproteína de peso molecular intermediário (IDL), e subsequentemente, em LDL. Os TG presentes no VLDL e LDL são posteriormente removidos pela *cholesterol ester transfer protein* (CETP) que troca pelos ésteres de colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL). Embora quase todas as células expressem receptores para LDL, a maior parte dessa lipoproteína retorna para o fígado por meio do LDLR, que reconhece a

APOB-100, presente na LDL (BAYNES e DOMINICZAK, 2005; BURTIS e BRUNS, 2016; SBC, 2017) (Figura 1).

Figura 1 – Metabolismo do Colesterol

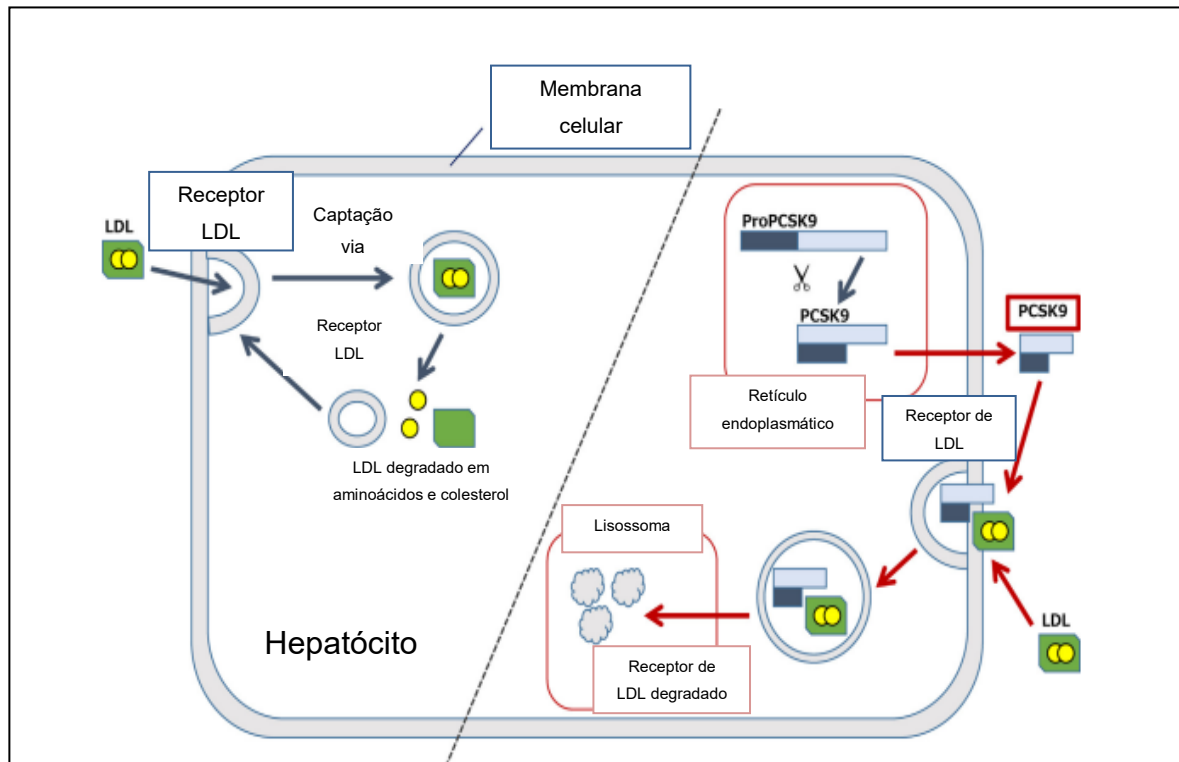


As lipoproteínas participam de três ciclos básicos de transporte de lipídeos no plasma: (1) ciclo exógeno, no qual as gorduras são absorvidas no intestino e chegam ao plasma, sob a forma de quilomícrons, e, após degradação pela lipase lipoproteica (LPL), são direcionadas ao fígado ou tecidos periféricos; (2) ciclo endógeno, em que os lipídeos hepáticos se direcionam aos tecidos periféricos; a VLDL é secretada pelo fígado e, por ação da LPL, transforma-se em IDL e, posteriormente, em LDL, a qual carrega os lipídeos, principalmente o colesterol, para os tecidos periféricos; (3) transporte reverso do colesterol, os lipídeos, principalmente o colesterol dos tecidos, retorna ao fígado; as HDL nascentes captam colesterol não esterificado dos tecidos periféricos pela ação da lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), formando as HDL maduras; por meio da colesterol ester transfer protein (CETP), ocorre também a transferência de ésteres de colesterol da HDL para outras lipoproteínas, como as VLDL. AGL: ácidos graxos livres; HPL: lipase hepática. Fonte: segundo Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, 2017.

A PCSK9 foi descoberta no ano de 2003, pelo pesquisador Seidah, tendo sido inicialmente chamada *neuronal apoptosis regulated convertase 1* (NARC-1), e pertence à família pro-proteína convertase, sendo o nono membro da mesma, por tal motivo foi posteriormente nomeada como PCSK9 (SEIDAH et al., 2003; HORTON et al., 2007; URBAN et al., 2013; CORRAL, 2014). Sua síntese ocorre em muitos tecidos, mas principalmente no fígado e intestino delgado (ABIFADEL et al., 2003; HORTON et al., 2007; LAMBERT et al., 2012; URBAN et al., 2013; LEREN, 2014). A participação da PCSK9 no metabolismo lipídico e o mecanismo pela qual reduz a atividade do LDLR foi elucidado por Lagace e cols. em 2006, quando demonstraram que a PCSK9 circulante se liga ao LDLR e à LDL para serem internalizados pela célula - este complexo é endocitado pelo mecanismo dependente de clatrina, e a ligação da PCSK9 à LDLR torna-se muito forte, ocorrendo degradação lisossomal de todo o complexo LDL + LDLR +

PCSK9 (STEIN e RAAL, 2014; MCKENNEY e FAHA, 2015; SCHULZ e SCHLÜTER, 2017) (**Figura 2**).

Figura 2–Mecanismo de ação da PCSK9 sobre o LDLR



Mecanismo da participação da PCSK9 no LDLR. A PCSK9 circulante se liga ao LDLR, ocorre a endocitose e degradação lisossomal do receptor. Se a PCSK9 não se ligar ao LDLR, este sofre endocitose, é reciclado e retorna à superfície das células para novas capturas de LDL. Fonte: Adaptado de M. Ogura / Journal of Cardiology 71 (2018) 1–7. Modificado pela autora.

2.2 Hipercolesterolemia Familiar

A HF é uma das causas genéticas mais comuns que pode levar à DAC devido aos altos níveis de LDLc circulante, os quais provocam um rápido desenvolvimento da aterosclerose precoce. Na prática, a HF está sendo diagnosticada, na maioria dos casos, no momento em que o indivíduo, na idade adulta jovem, apresenta algum evento cardiovascular. Os pacientes com HF requerem tratamento farmacológico criterioso, às vezes com associação de

múltiplas drogas, para reduzir os níveis de LDLc (NORDESTGAARD et al., 2013; TURGEON et al., 2016).

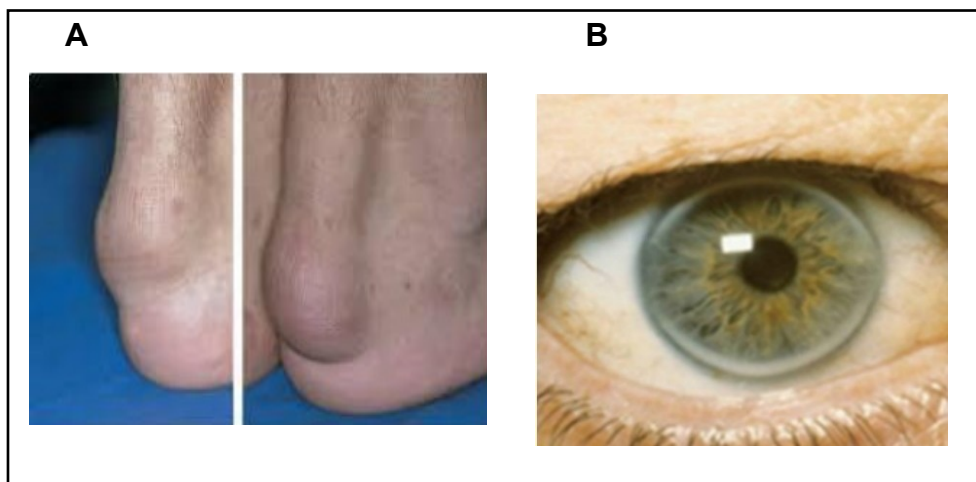
A estimativa da prevalência mundial da forma heterozigótica (HFHe), dita “histórica”, seria de 1:200 a 1:500 indivíduos e a forma homozigótica (HFHo), que é a mais rara, apresenta uma prevalência em torno de 1:300.000 a 1:1.000.000, sendo portanto, a forma mais grave da doença (GOLDSTEIN et al., 2001; AUSTIN et al., 2004; NORDESTGAARD et al., 2013). Porém, estudos mais recentes sugerem que a prevalência da HF seja maior, sendo para a HFHe na proporção de 1:200 a 1:300 e na HFHo na proporção de 1:160.000 a 1:300.000, baseando em critérios clínicos e moleculares (BENN et al., 2012; BENN et al., 2016; AKIOYAMEN et al., 2017; HU et al., 2020). Em 2020, duas grandes meta-análises incluindo milhões de indivíduos sugeriram estimativas mundiais de prevalência de HF na população em geral e em indivíduos com doença aterosclerótica cardiovascular (DASCV), e apesar de ter pequenas diferenças nos números de indivíduos e de estudos incluídos, ambas as meta-análises estimaram uma prevalência combinada de HF de 0,32% (HU et al., 2020; BEHESHTI et al., 2020). Apesar do grande número de estudos e assuntos nestas meta-análises contemporâneas, dados da maioria dos outros países não estão disponíveis e, portanto, a prevalência de HF é desconhecida em várias regiões do mundo, sendo ainda uma doença subdiagnosticada (menos de 10%) e sem receber o adequado tratamento hipolipemiante (menos 25%) no mundo inteiro (BENN et al., 2016; VALLEJO-VAZ et al., 2018). No Brasil, apesar de não existirem dados objetivos sobre a prevalência de HF, baseando-se nos dados clínicos e laboratoriais e na história familiar obtidos do estudo ELSA-Brasil e adotando critérios de DLCN, estima-se uma prevalência de 1:263, correspondendo à uma população de 766.000 indivíduos, e que menos de 1% são diagnosticados e tratados apropriadamente (JANNES et al., 2015; SILVA et al., 2016; HARADA et al., 2018, ROCHA e SANTOS, 2021).

2.2.1 Diagnóstico da HF

O diagnóstico da HF é baseado em sinais clínicos de depósito de colesterol extravascular, como a presença de xantomas tendinosos e/ou arco córneo antes dos 45 anos de idade (**Figura 3**), níveis elevados de LDLc e colesterol total (CT)

no plasma, história familiar positiva para DCV prematura (homens < 55 anos e mulheres < 65 anos) e ainda, a presença de elevados níveis de colesterol em familiares de 1º e 2º graus. Os testes genéticos são utilizados para confirmação diagnóstica, tendo em vista que a presença dos sinais clínicos, apesar de levantar grande suspeita de HF, muitas vezes não resulta em um diagnóstico assertivo (BOUHAIRIE e GOLDBERG, 2015).

Figura 3- Xantoma tendinoso e Arco córneo



A: Xantoma tendinoso em tendão de Aquiles. Fonte: Harrison – Princípios de Medicina Interna, 19ª Ed., 2016.

B: Arco córneo. Fonte: Atualização da Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar – 2021

Existem três critérios de diagnóstico clínico para HF: o *Dutch Lipid Clinic Network* (DLCN), *US Make Early Diagnosis Prevent Early Death Program* (US MEDPED) e o *Simon Broome Register Group* (SB), em que o escore é calculado a partir de dados específicos considerando as características clínicas do paciente. Embora ainda não tenha sido adotada na prática clínica uma validação para a classificação da HF na população brasileira, a I Diretriz Brasileira de HF (SBC, 2012) recomenda a utilização dos critérios de Dutch MEDPED (junção do critério DLCN e US MEDPED), com inclusão dos critérios de SB. O escore DLCN leva em consideração o histórico familiar e/ou pessoal de DAC prematura, sinais físicos, níveis elevados de LDLc, e sugere ainda a análise genética se a pontuação for > 5. O diagnóstico definitivo de HF é dado quando o escore for > 8 (SBC, 2012; CATAPANO et al., 2017). Assim, os critérios de diagnósticos para a HF, baseados no Dutch MEDPED, estão na **Tabela 1**.

O diagnóstico da HF normalmente é precedido pelo rastreamento dos níveis lipídicos, seja pelo rastreamento universal ou pelo rastreamento em cascata (FALUDI et al., 2017).

Tabela 1 - Critérios de diagnósticos para a HF, baseados no *Dutch Lipid Clinic Network* (DLCN)

Parâmetro	Pontos
História familiar	
- Parente de 1º grau portador de doença vascular/ coronária prematura (homem < 55 anos, mulher < 65 anos) OU - Parente adulto de 1º ou 2º grau com colesterol total > 290 mg/dL*	1
- Parente de 1º grau portador de xantoma tendinoso e/ou arco corneano OU - Parente de 1º grau com < 16 anos com colesterol total >260 mg/dL*	2
História clínica	
- Paciente portador de doença arterial coronária prematura (homem < 55 anos, mulher < 65anos)	2
- Paciente portador de doença arterial cerebral ou periférica prematura (homem < 55 anos, mulher < 65anos)	1
Exame físico	
Xantoma tendinoso	6
Arco corneano < 45 anos	4
Nível de LDL-c (mg/dL)	
≥ 330 mg/dL	8
250 - 329 mg/dL	5
190 - 249 mg/dL	3
155 - 189 mg/dL	1
Análise do DNA	
Presença de mutação funcional do gene do receptor de LDL, da apo B100 ou da PCSK9*	8
Diagnóstico de HF	
Definitivo se	>8 pontos
provável se	6 – 8 pontos
possível se	3 – 5 pontos

* Modificado do *Dutch MEDPED* adotando um critério presente na proposta do *Simon Broome Register Group*.

2.2.2 Rastreamento universal

Baseia-se na indicação de análise de perfil lipídico, devendo ser feita em todas as pessoas acima dos 10 anos de idade, ficando reservada a análise a partir de

2 anos de idade nas seguintes situações: quando houver história de doença aterosclerótica prematura (homens com < 55 anos e mulheres com < 65 anos) e/ou dislipidemia grave em parentes de 1º grau; ou quando a própria criança apresentar sinais físicos como xantomas/arco córneo e presença de fatores de risco ou doença aterosclerótica (FALUDI et al., 2017).

O diagnóstico para HF deve ser suspeitado em adultos quando apresentar dosagens de LDLc \geq 190 mg/dL (WILLIAMS et al., 1993). No Brasil, foram adotados *cutoffs* sugestivos para HF, sendo CT \geq 310 mg/dL em adultos e \geq 230 mg/dL para crianças e adolescentes (FALUDI et al., 2017).

2.2.3 Rastreamento em cascata

Essa metodologia diagnóstica consiste na determinação do perfil lipídico de parentes de 1º grau (pai, mãe e irmãos) dos pacientes diagnosticados com HF a partir de um caso-índice (CI), quando há chance de identificação de outros portadores da doença, com uma probabilidade de 50% em familiares de 1º grau e 25% nos parentes de 2º grau (HOPKINS et al., 2011).

2.2.3.1 Rastreamento genético em cascata

O rastreamento genético em cascata, sendo uma estratégia custo-efetivo melhor para o diagnóstico de HF, pode ser realizado partindo do mesmo princípio de rastreamento em cascata, quando será realizada a pesquisa em familiares de 1º grau de pessoas com diagnóstico genético da HF, onde a variante causadora da doença foi identificada no CI (LEREN et al., 2004; HOPKINS et al., 2011; KLOSE et al., 2014).

O custo dos testes tem caído drasticamente nas últimas décadas, devido aos grandes avanços na tecnologia de sequenciamento, especialmente a introdução do *next generation sequencing* (NGS) (VRABLIK et al., 2020). Esta tecnologia oferece a possibilidade de sequenciar todo o genoma ou exoma (FARHAN e HEGELE, 2014), em um tempo relativamente curto produzindo uma grande quantidade de dados, e possibilitando a monta de milhões de fragmentos

sequenciados de forma contígua e sobrepostos, com a identificação de variantes potencialmente úteis clinicamente (HEGELE et al., 2015). Com a evolução destas técnicas moleculares, muitas variantes foram identificadas como causalmente ligados à HF, o que levou o ClinVar (arquivo público que reporta a relação entre variantes genéticas e fenótipos, hospedado no site do *National Center for Biotechnology Information* - NCBI) a tomar a iniciativa de classificar estas variantes quanto à sua patogenicidade, em especial nos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*, baseando no consenso da *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (RICHARDS et al. 2015, IACOCCA et al., 2018). As classificações incluem: “definitivamente não patogênica”, “provavelmente não patogênica”, “variante de significado incerto”, “provavelmente patogênica” e “definitivamente patogênica”. Nesse contexto, mais de 70% das variantes do *gene LDLR* publicadas são classificadas como prováveis e definitivamente patogênicas, enquanto que apenas 10% de variantes do *gene APOB* e 13% do *gene PCSK9* são classificadas como tal (IACOCCA et al., 2018).

Atualmente no Brasil, o custo para o teste genético ainda é alto e relativamente inacessível para a grande maioria dos pacientes. No laboratório de cardiologia molecular do InCor, o teste genético é gratuito, porém dependente de fomento para a realização. Alguns laboratórios no país fazem o teste genético a um custo que varia de R\$1.400,00 a R\$ 2.000,00 a depender da quantidade de genes a serem pesquisados e o tempo de entrega do resultado está em torno de 30-40 dias. Em caso de encontro de variante genética no indivíduo, alguns laboratórios oferecem 3-4 testes de forma gratuita para familiares.

2.3 Genes envolvidos na HF de herança autossômica dominante

A HF é causada principalmente por variantes genéticas capazes de codificar proteínas defeituosas que provocam a perda de função e modificação no metabolismo lipídico, tornando-o ineficiente e tendo como consequência a elevação dos níveis da LDLc, levando ao aumento de depósito de colesterol nos

tecidos (IZAR et al., 2010; CHORA et al., 2018; VRABLIK et al., 2020). Independente dos genes que regulam o metabolismo da LDL (LDLR, APOB e PCSK9), o fenótipo clínico será sempre de valores elevados da fração LDLc (PEREIRA et al., 2012; CHORA et al., 2018). No entanto, o diagnóstico clínico tem baixa especificidade e sensibilidade, e apenas o diagnóstico genético poderá confirmar quais indivíduos têm um risco cardiovascular aumentado ao longo da vida (HENDERSON et al., 2016; SANTOS, 2017; CHORA et al., 2018).

Em certas populações, a frequência de HFHe pode ser marcadamente maior que a proporção média mundial de 1:200 a 1:300, em decorrência de descenderem de um pequeno número de ancestrais colonizadores, entre os quais a prevalência da doença era alta, ocorrendo o chamado efeito fundador (HENDERSON et al., 2016). Acredita-se que tais efeitos fundadores sejam responsáveis pela maior prevalência de variantes associadas à HF entre finlandeses, islandeses, cristãos libaneses, tunisianos, gujarati sul-africanos indianos, judeus Ashkenazie franco-canadenses (AUSTIN et al., 2004; HU et al., 2020). A HFHo também foi registrada como dez vezes maior em populações com efeito fundador, principalmente devido a casamentos consanguíneos (IZAR et al., 2010).

No Brasil, no início da década de 1990, uma variante comum no *gene LDLR* foi encontrada em probandos de pacientes com HF e foi denominada de “alelo libanês” (exon 14 Cys681*) causadora de HF em populações árabes (DOS SANTOS, 2003). Posteriormente, foi identificada a mesma variante em 18 famílias com HF, sendo 10 famílias não aparentadas que viviam na cidade de Ribeirão Preto–SP, sendo encontrada em nove indivíduos de 5 famílias que confirmaram ascendência libanesa (FIGUEIREDO et al., 1992). Outro estudo de HF no Brasil descreveu sete novas variantes no *gene LDLR* em famílias que viviam em São Paulo, no entanto, a variante libanesa não foi encontrada. Foi hipotetizado que a frequência de variantes para HF pode variar de estado para estado, dependendo da origem étnica dos habitantes (SALAZAR et al., 2002). Em 2015, em um estudo com 248 CI, foram encontradas variantes em 125 indivíduos e após analisar os CI e seus parentes carreadores de variantes, foram encontradas 70 diferentes variantes causais no *gene LDLR* (97,2%) e 2 no *gene*

APOB (2,8%), sendo 8,5% dessa população carregando o alelo libanês (JANNES et al., 2015).

Com estas constatações acerca da HF no Brasil e no mundo, seria necessário criar registros nacionais, não só para acompanhamento dos pacientes, mas também para estimular a colaboração com comunidades internacionais para mais estudos (MEHTA et al., 2016).

2.3.1 Gene do LDLR

O gene que codifica o receptor humano para LDL compreende aproximadamente 45 mil pares de bases de DNA e localiza-se no cromossomo 19 (RUSSELL et al., 1983). A HF é mais comumente atribuível às variantes no gene LDLR, resultando em redução da sua função (parcial ou completa), com incapacidade de remoção da LDLc circulante (HOBBS et al., 1990; HOBBS et al., 1992). Moltuski et al. (1989) detectaram pela primeira vez uma variante no braço curto do cromossoma 19, sendo determinado como gene de defeito, nos LDLR dos hepatócitos. O receptor pode ser negativo ou defeituoso, dependendo do impacto da variante sobre a proteína codificada. O receptor negativo expressa pouca ou nenhuma função. O receptor defeituoso expressa isoformas de LDLR com afinidade reduzida ao LDLc na superfície dos hepatócitos (CIVEIRA et al., 2004, CHORA et al., 2018). Mais de 2.200 variantes nesse gene LDLR foram descritas, o que representa 85-90% dos casos de HF em todo mundo, sendo no Brasil, descritas 201 variantes até o momento (IACOCCA et al., 2018). Recentes avanços na tecnologia de sequenciamento genético resultaram em melhorias notáveis na identificação de variantes do LDLR que ocorrem em indivíduos com HF, porém apenas uma minoria delas tem sido validada funcionalmente para provar serem essas variantes patogênicas as causadoras da doença (BENITO-VICENTE et al., 2018).

2.3.2 Gene APOB

O gene *APOB* possui 42 Kb e é formado por 29 éxons e 28 íntrons originando duas isoformas de proteínas: uma pequena, denominada de APOB-48, e uma

maior denominada APOB-100. A APOB-48 é produzida no intestino e faz parte dos quilomícrons. A APOB-100 é sintetizada no fígado e, constitui a apolipoproteína das várias lipoproteínas VLDL, IDL e LDL. O segundo defeito genético descrito, que provoca a HF, foi relacionado à sequência que codifica a APOB-100. Variantes no *gene APOB* que modificam a estrutura da APOB-100 alteram a conformação terciária do terminal carboxi do domínio de ligação ao LDLR (WHITFIELD et al., 2004). Com isso, o LDLR não reconhece a APOB-100 como ligante e o LDL não é captado, acumulando-se na corrente sanguínea, levando a um fenótipo de HF muito semelhante ao produzido por variantes em outros genes, referida como defeito familiar da APOB (FDB, *Familial Defective APOB*). A variante mais comum do *gene APOB* descrita até então, a Arg3500Gln, representa 5-10% das causas de HF no norte europeu, tendo uma baixa frequência em outras populações em todo o mundo (EJARQUE et al., 2008; BRUIKMAN et al., 2017). Foram descritas 353 variantes no *gene APOB* em todo o mundo, sendo no Brasil, 63 variantes já descritas (IACOCCA et al., 2018).

2.3.3 Gene da PCSK9

O terceiro defeito a ser descrito para a HF é a variante do gene que expressa a PCSK9, com ganho de função, também conhecido como HF-3, representa 1% das causas de HF. Variantes no gene que codifica a PCSK9, a qual participa do catabolismo do LDLR, ocasionam uma degradação acelerada do receptor, impedindo a captação adequada do LDL da corrente sanguínea (URBAN et al., 2013; AWAN et al., 2014; BRUIKMAN et al., 2017). A partir desta descoberta, muitas outras alterações genéticas de ganho de função foram identificadas, sendo 216 diferentes variantes identificadas em todo o mundo e, destas, 16 foram descritas no Brasil (IACOCCA et al, 2018).

2.3.4 Gene envolvido na HF de herança autossômica recessiva

As variantes do gene da proteína adaptadora do receptor de LDL1 (*gene LDLRAP1*), originalmente chamado de gene da hipercolesterolemia autossômica recessiva (HRA), não deve formalmente ser considerada causadora de HF, pois o modo de transmissão é recessivo, porém, não se distingue clinicamente da

forma homozigótica autossômica de HF, pois suas consequências são semelhantes às da clássica forma da doença (GARCIA et al., 2001).

2.3.5 Outros genes potencialmente associados com HF

Dentro do fenótipo de hipercolesterolemia, surgem ainda outros genes candidatos, como: gene da apolipoproteína E (*gene APOE*), gene do degradador induzível do LDLR (*gene IDOL*), gene do quarto locus para mapa de hipercolesterolemia autossômica dominante, chamado HCHOLA4 (*gene HCHOLA4*), gene do membro da família de adaptadores de sinal 1 (*gene STAP1*) e gene da lipase ácida lisossomal A (*gene LIPA*) (IZAR et al., 2021).

Formas raras incluem ainda a sitosterolemia ou fitosterolemia, sendo uma hipercolesterolemia herdada de forma autossômica recessiva, como resultado de variantes no gene da proteína de ligação à adenosina transportadora da família *ATP-binding cassette* (ABC) G5 e G8 (*gene ABCG5* e *gene ABCG8*) (BHATTACHARYYA e CONNOR, 1974; PATEL et al., 1998), a qual está envolvida na eliminação dos esteróis de plantas.

2.4 Tratamento Farmacológico

A indicação do tratamento farmacológico para HF ocorre quando as concentrações de LDLc são maiores que 190 mg/dL, mais duas condições de alto risco que seriam: idade maior que 40 anos sem tratamento prévio, tabagismo, sexo masculino, lipoproteína (a) [Lp(a)] > 50 mg/dL, HDL < 40 mg/dL e percentil do escore de cálcio calculado pelo critério do estudo *Multi Ethnic Study of Atherosclerosis* (MESA) (McCLELLAND et al., 2006). Considerando os altos níveis de colesterol basal em pacientes com HF, uma redução de 50% obtida com o tratamento medicamentoso é considerada de real valor terapêutico. Pacientes com HF e que apresentam maiores riscos necessitam de uma intensificação da terapêutica para alcançarem reduções significativas de LDLc, sendo ideal a meta de LDLc < 70 mg/dL (IZAR et al., 2021).

As estatinas são agentes hipolipemiantes que exercem os seus efeitos por meio da inibição da enzima HMG-CoA redutase que é fundamental na síntese do colesterol, levando a uma redução do colesterol intracelular e um aumento na expressão de LDLR, resultando no aumento da captação do LDL circulante. Existem diferenças entre as várias estatinas no mercado, no que tange às propriedades farmacodinâmicas, bem como coeficiente de hidrofiliabilidade, via hepática de metabolização (principalmente a via do citocromo-P450 e isoenzimas), meia-vida plasmática e eficácia na redução lipídica (FONSECA, 2005; FALUDI et al., 2017). As estatinas de maior potência em reduzir os níveis de LDLc são as de primeira escolha. Além do seu efeito hipolipemiante, efeitos pleiotrópicos também são descritos, como propriedades antiinflamatórias, melhora da função endotelial e benefícios na hemostasia (FONSECA, 2005; FALUDI et al., 2017).

A ezetimiba é outro fármaco que inibe a absorção de colesterol na borda em escova do intestino delgado, bloqueando “ou interagindo com” a proteína NPC1-L1, e inibindo o transporte de colesterol na forma de quilomícrons. A inibição da absorção de colesterol, em grande parte do colesterol biliar, leva à diminuição dos níveis de colesterol hepático e ao estímulo de síntese de LDLR, com conseqüente redução do nível plasmático de LDLc, de 10% a 25%. A adição da ezetimiba à estatina tem sido recomendada quando a meta de LDLc não é atingida com o tratamento com estatinas de forma isolada (FALUDI et al., 2017).

Já os sequestrantes de ácidos biliares são grandes polímeros que se ligam aos sais biliares no intestino delgado, reduzindo a absorção enteral de colesterol. Como resultado, ocorre depleção do colesterol celular hepático, estimulando a síntese de LDLR e colesterol endógeno. Como conseqüência desse estímulo à síntese, pode ocorrer aumento da produção da VLDL e dos TG plasmáticos (FALUDI et al., 2017).

A niacina atua no tecido adiposo periférico, leucócitos e células de Langerhans por meio de sua ligação com um receptor específico ligado à proteína G (GPR109A). A ativação do GPR109A inibe as lipases hormônios-sensíveis nos adipócitos, e diminui a liberação de ácidos graxos livres na circulação. Em

paralelo, a niacina inibe a atividade da enzima diacilglicerol aciltransferase-2 (DGAT-2) nos microsossomos dos hepatócitos e, assim, a síntese hepática de TG. Destas ações resulta uma menor disponibilidade de TG intra-hepático e, por consequência, o aumento no catabolismo de APOB e, menor secreção de VLDL e LDL. Porém, seus efeitos colaterais ocasionam abandono ao tratamento (em torno de 25%), ainda assim, não há evidência de benefício com esse fármaco em indivíduos com LDLc controlado (FALUDI et al., 2017).

A funcionalidade e o número de LDLR expressos na superfície dos hepatócitos são primordiais para a captação adequada de LDL, e, após internalização do LDL pelo endossomo, o LDLR tem a capacidade de retornar à superfície celular para mais captação de LDL, por 150 vezes, até que ocorra a sua degradação através da ligação com a PCSK9 sintetizada pelo núcleo celular e secretada pelos hepatócitos. Variantes cujo efeito sobre a proteína PCSK9 é de ganho de função podem ocasionar hipercolesterolemia e, em contrapartida, variantes com perda de função desta proteína podem ocasionar o oposto, a hipocolesterolemia e redução de DCV. Foram então desenvolvidos os inibidores da PCSK9 (iPCSK9), que previnem a ligação desta proteína ao LDLR e subsequente degradação lisossomal do receptor, aumentando a quantidade de LDLR funcionantes na superfície dos hepatócitos e maior depuração das partículas circulantes de LDLc no plasma (WIGGINGS et al., 2018). No Brasil, dois inibidores de PCSK9 totalmente humanizados - o evolocumabe e alirocumabe- foram aprovados para comercialização em 2016 na forma de injeções subcutâneas a cada 02 semanas ou 01 vez por mês. Esta classe de fármacos apresenta redução intensa nas concentrações de LDLc em relação ao placebo, em média de 60%. Esses fármacos apresentaram benefícios em diminuir também outras lipoproteínas pró-aterogênicas, como a Lp(a), além da APOB, TG, bem como em aumentar a HDL e a apolipoproteína A1 (APOA1) (SABATINE et al., 2015; ROBINSON et al., 2015, FALUDI et al., 2017).

Como nova terapêutica já aprovado na Europa e recentemente também pela ANVISA, o Inclisiran é uma pequena molécula de RNA interferente (siRNA) que bloqueia a produção hepática de PCSK9, reduzindo o LDLc em 50% em pacientes com HF, tendo como vantagem em comparação aos inibidores

monoclonais a sua dosagem, necessitando de apenas 2 a 3 injeções ao ano (ROCHA e SANTOS, 2021).

O tratamento da HF homozigótica é o maior desafio, especialmente naqueles pacientes carreadores de variantes em dois alelos no *gene de LDLR*, refratários aos inibidores da PCSK9, sendo necessário o uso de fármacos que bloqueiam a síntese de lipoproteínas como a Lomitapida ou aférese de LDL (ROCHA e SANTOS, 2021). Mas recentemente, aprovada para HFHo, o Evinacumabe será um enorme benefício para esses pacientes como também para os HFHe refratários (ROSENSON et al., 2020), sendo um anticorpo monoclonal contra proteína semelhante à angiopoietina 3 (ANGPTL3) que tem como papel inibir a lipase lipoprotéica endotelial, e demonstrou reduzir LDLc em 50% em homozigotos, incluindo aqueles com variantes nulas de LDLR (RAAL et al., 2020). Terapias de edição genética como CRISPR/Cas9 ou transfecção de gene poderá mudar a história natural da HF (RODRIGUEZ-CALVO e MASANA, 2019), tendo como um dos objetivos dessa terapia, ocasionar o *knockout* seletivo da proteína ANGPTL3 (BINI et al., 2023)

2.5 Alterações cardiovasculares na HF

2.5.1 Epidemiologia das doenças ateroscleróticas cardiovasculares

As doenças ateroscleróticas cardiovasculares (DASCV) são as principais causas de morte no nosso país, correspondendo a 27,65% do total de óbitos, sendo que dentre a mortalidade específica por doenças do aparelho circulatório, as afecções isquêmicas do coração correspondem a 32% das mortes (RIBEIRO et al., 2016; DATASUS-MS, 2019). No mundo, as doenças isquêmicas do coração e o acidente vascular encefálico (AVE) ocupam o primeiro e segundo lugar nas principais causas de morte, respectivamente, totalizando juntas mais de 15,2 milhões de óbitos (WHO, 2016). Apesar de vários fatores de risco cardiovascular sejam conhecidos e responsáveis pela maioria dos casos de DASCV e suas complicações (YUSUF et al., 2004; LANAS et al., 2007; O'DONNELL et al., 2010),

a HF é uma condição que poderá aumentar e antecipar a sua ocorrência (BENN et al., 2012; VALLEJO-VAZ et al., 2018, HU et al., 2020).

2.5.2 Doenças cardiovasculares ateroscleróticas e o impacto da HF

A HF ocasiona uma exposição de elevadas concentrações de LDLc desde o nascimento e ao longo de toda a vida do indivíduo portador da doença, e se não tratados, homens e mulheres desenvolverão DAC antes dos 55 e 60 anos, respectivamente (GOLDSTEIN et al., 2001; AUSTIN et al, 2004, ALONSO et al., 2020).

Portadores de HF são considerados pacientes de alto e muito alto risco cardiovascular, entretanto, um número considerável não apresenta eventos cardiovasculares, independentemente dessa exposição aos elevados níveis de LDLc, enquanto que outros evoluem para estas complicações apesar da terapia hipolipemiante, sugerindo que o risco de DASCV também é variável nesta população (ALONSO et al., 2020). Esta variabilidade pode ser devida, em parte, às diferenças no tratamento de redução dos lipídios, levando a um risco amplamente variável em pacientes com HF pertencentes à mesma família ou compartilhando a mesma variante genética (MATA et al., 2018), sugerindo que outros fatores como tabagismo, colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDLc) baixo, hipertensão arterial sistêmica (HAS), obesidade e diabetes mellitus (DM) (SANTOS et al., 2016; SANTOS, 2019) podem modular o risco (ALONSO et al., 2020).

Indivíduos com HF definida geneticamente têm risco quatro vezes maior de DAC em comparação com indivíduos sem variantes genéticas conhecidas (KHERA et al, 2016). A análise de diferentes coortes mostrou um risco de DAC e DASCV prematura de 3 a 13 vezes maior na família de indivíduos com HF em comparação com seus parentes não afetados ou com a população em geral (PÉREZ DE ISLA et al., 2016; BENN et al., 2016; VILLA et al., 2017). No entanto, quando diagnosticados e tratados, poderá ocorrer uma modificação da história natural da doença aterosclerótica (VERSMISSEN et al., 2008).

Apesar de não existirem muitos dados prospectivos a respeito do risco de DASCV com o tratamento hipolipemiante na HF, estudos mostraram que o risco de DAC aumentou 13 vezes em portadores da doença que não recebiam estatinas (BENN et al., 2012, LUIRINK et al., 2019), e quando tratados desde a infância, a mortalidade por DAC caiu significativamente em 37%, enfatizando a importância da identificação precoce da HF e tratamento hipolipemiante adequado (NEIL et al., 2008, LUIRINK et al., 2019).

2.5.3 Perfil lipídico na HF além do LDLc

Apesar da função de LDLR prejudicada e consequente redução de depuração de LDL da circulação ser a principal característica da dislipidemia da HF, a diversidade de variantes genéticas pode determinar a heterogeneidade dos níveis de LDLc (CHEMELLO et al., 2021). Comparando com LDLc, o nível circulante de outras lipoproteínas não é ou é levemente afetado na HF, com algumas exceções, em particular, quando coexiste uma síndrome metabólica (SM). No entanto, existe algumas particularidades na HF (CHEMELLO et al., 2021), que discursaremos a seguir.

2.5.3.1 Lipoproteína (a) [Lp(a)]

A Lp(a) é uma lipoproteína aterogênica que contém na sua estrutura a apo(a) que é ligada covalentemente à apoB100 da LDL. A apo(a) é uma glicoproteína polimórfica sintetizada e secretada quase exclusivamente pelo fígado e tem uma homologia de sequência significativa (78-100%) com o plasminogênio pela presença de estruturas semelhantes que são as alças chamadas *kringles* (KRATZIN et al., 1987). A apo(a) é codificada pelo gene da Lp(a) e apresenta uma estrutura altamente repetitiva, o domínio kringles IV2 presente em 1 a mais de 40 cópias (LANGSTED et al., 2019). O tamanho da apo(a) explica até 70% da variância de Lp(a) em humanos (CHEMELLO et al., 2021). Em adição, as partículas de Lp(a) contêm fosfolípidos oxidados fortemente pró-inflamatórios que promovem o crescimento do trombo arterial (VUORIO et al., 2020). A carga acumulada de duas lipoproteínas pró-aterogênicas geneticamente determinadas,

LDL e Lp(a), é um potente condutor de DASCV em pacientes com HF (VUORIO et al, 2020).

Os primeiros estudos que investigaram a Lp(a) em HF não produziram resultados conclusivos devido à grande variabilidade de tamanho resultante do polimorfismo de apo(a) (LINGENHEL et al, 1998). No entanto, a avaliação de irmãos com HF, comparados com não-HF com isoformas de apo(a) idênticas por descendência, demonstrou claramente que a Lp(a) é aproximadamente duas vezes maior em pacientes com HF do que em seus familiares não afetados (LINGENHEL et al, 1998). Em pacientes com HFHo com dois alelos de LDLR afetados e não funcionais, também exibem níveis de Lp(a) duas vezes mais altos que seus parentes heterozigotos (KRAFT et al, 2000). O mesmo foi observado em pacientes HF com alelos de risco de DAC no *gene APOB* e *gene PCSK9*, comparado com familiares não-afetados (VAN DER HOEK et al, 1997; TADA et al., 2016). Mesmo após estes resultados que parecem apoiar um papel direto do LDLR na mediação da depuração plasmática da Lp(a), esta relação ainda não está clara (CHEMELLO et al, 2021). No entanto, de acordo com evidências acumuladas ao longo dos estudos em HF, os níveis de Lp(a) consistem em um fator de risco adicional que se torna de grande relevância nesse grupo de pacientes, considerando-se o potencial para níveis elevados de Lp(a) nessa população (IZAR et al., 2021).

2.5.3.2 Lipoproteína de alta densidade (HDL)

O tamanho da HDL tem sido amplamente explorado na HF, que mostrou-se estar menor e, portanto, mais aterogênico (HOGUE et al., 2007). Esse fato se deve ao transporte reverso do colesterol estar prejudicado, aumentando o risco cardiovascular tanto em HFHe quanto em HFHo, não pelo teor de colesterol do HDL em si, mas pela sua funcionalidade ateroprotetora (GUERIN, 2012). Em pacientes com HF há uma redução da esterificação pela lecitina colesterol acil-transferase (LCAT), responsável pela transferência do colesterol nos tecidos periféricos para o HDL (MARTINEZ et al., 2013). As propriedades antioxidantes e antiinflamatórias estabelecidas do HDL também parecem estar prejudicadas

na HF (GANJALI et al., 2017). Além disso, o tamanho e a composição do HDL aparecem alterados na HF paralelamente a um aumento de transferência de éster de colesterol para o LDL (CHEMELLO et al., 2021).

2.5.3.3 Triglicérides (TG)

Defeitos na função do LDLR parecem também alterar a interação destes receptores com a APOB e a APOE, presentes em lipoproteínas ricas em triglicérides, predispondo também à hiperlipidemia pós-prandial na HF (CHAN et al., 2012). O comprometimento da expressão de LDLR parece influenciar a secreção hepática de lipoproteínas contendo APOB, pois pacientes com HF ou modelos animais sem atividade do LDLR exibem maiores níveis de VLDL, IDL e produção de APOB em comparação com indivíduos não-HF (DIETSCHY et al., 1993). O mesmo foi constatado em indivíduos com variantes com ganho de função no *gene PCSK9* que exibiram aumento nas taxas de produção de lipoproteínas contendo APOB (OUGUERRAM et al., 2004).

Tendo em vista os aspectos importantes do metabolismo prejudicado de lipoproteínas, além do aumento de LDLc, pacientes com HF devem ser claramente monitorados quanto aos níveis do colesterol na lipoproteína de alta densidade (HDLc), TG, além de APOA1 e APOB-100 (CHEMELLO et al., 2021).

2.5.4 Biomarcadores relacionados à doença aterosclerótica

Biomarcadores plasmáticos são ferramentas úteis no diagnóstico e prognóstico de numerosos processos como a doença aterosclerótica, os quais, sozinhos ou em combinação, podem desempenhar um papel importante na previsão de riscos e *status* de morbidade. Além disso, podem ser usados para detectar um estágio mais precoce da doença a tempo de iniciar um tratamento (ZERNECKE et al., 2008, PIEK et al., 2018), evitando desfechos fatais. O uso de biomarcadores para predição de doenças e prognóstico tem mostrado potencial importância para identificar grupos de maior risco que podem se beneficiar de mais prevenção e tratamento intensivo (LIPPI et al., 2013; CERVELLIN et al., 2016). Biomarcadores podem ajudar ainda na estratificação de risco e orientar o uso de recursos e terapias direcionadas (SALVAGNO e PAVAN, 2016). Assim, a

identificação de biomarcadores que possam ajudar a prever o risco de doença coronariana aguda e complicações relacionadas tem direcionado vários estudos na área (LIPPI et al., 2014).

Alguns desses novos marcadores no contexto das complicações ateroscleróticas e DAC serão detalhados a seguir.

2.5.4.1 Growth differential factor-15 (GDF-15)

O GDF-15 foi descoberto como uma proteína derivada do fator transformador de crescimento beta (TGF- β), pertencente à família das citocinas. É uma proteína relacionada à inflamação e estresse oxidativo altamente expressa no miocárdio e células endoteliais (BEREZIN e BEREZIN, 2020), e está envolvida na hipertrofia e apoptose cardíaca (AGO e SADOSHIMA, 2006). O GDF-15 foi significativamente relacionado com distúrbios metabólicos de glicolipídios e doenças cardiovasculares (XIAO et al., 2022). O TGF constitui uma superfamília de citocinas que exercem funções na homeostasia de tecidos adultos e adaptação para regulação na sobrevivência, proliferação e diferenciação celular, e o aumento ou diminuição na produção de TGFs, tem sido associada com numerosas doenças, incluindo a aterosclerose (KEMPF et al., 2006).

Em condições fisiológicas, o GDF-15 é expresso principalmente na próstata e na placenta (camada trofoblástica) e uma pequena quantidade também é detectado no fígado, pulmão, rim, músculo esquelético, pâncreas, coração e cólon (FAIRLIE et al., 1999; MOORE et al., 2000; XIAO et al., 2022), podendo ser expresso em baixo a moderados níveis na maioria dos tecidos. No entanto, valores de GDF-15 podem aumentar em resposta ao estresse patológico associado à inflamação e danos teciduais (AGO e SADOSHIMA, 2006; KEMPF et al., 2006; EK et al., 2016; XIAO et al., 2022).

Vários dados têm contribuído para aumentar o interesse a respeito do uso de GDF-15 como biomarcador para diagnóstico, prognóstico e/ou estratificação de risco de SCA (SALVAGNO e PAVAN, 2016; TZIKAS et al., 2019). Está bem estabelecido que os TGFs inibem a proliferação e migração de músculo liso

endotelial e baixos níveis de TGF- β são comuns em pacientes com aterosclerose (BLOBE et al., 2000, SALVAGNO e PAVAN, 2016). O GDF-15 tem-se mostrado um biomarcador promissor, uma vez que foram observados valores aumentados na doença subclínica precoce, sendo de utilidade prognóstica para eventos cardiovasculares e mortalidade (SALVAGNO e PAVAN, 2016). Adicionalmente, em alguns estudos, níveis de GDF-15 mostraram serem melhores no prognóstico e previsão de mortalidade à longo prazo na insuficiência cardíaca (IC), comparados aos níveis de N-terminal do peptídeo natriurético tipo B (NT-proBNP), proteína-C-reativa ultrasensível (PCRus) e Troponina T ultrasensível (TnTus) (LOK et al., 2013; HO et al., 2018; MAY et al., 2021), mas ainda sem validação na prática clínica e nas diretrizes.

2.5.4.2 Chemokine ligand 16 (CXCL-16)

As citocinas, os receptores *scavenger* e as moléculas de adesão são conhecidas há muito tempo como participantes importantes na patogênese do processo aterosclerótico. Uma série de estudos realizados descreveu o receptor *scavenger* fosfatidilserina da lipoproteína oxidada (CXCL-16/SR-PSOX) como uma nova molécula que combina essas três funções (citocina, molécula de adesão e receptor *scavenger*) e sugeriram que possa ser um marcador potencial na aterogênese (SHEIKINE e SIRSJO, 2008), por estar relacionado à formação da placa de aterosclerose e desenvolvimento da DAC (XING et al., 2018).

O CXCL16 pertence ao grupo de quimiocinas que são expressas em placas ateroscleróticas (WUTTGE et al., 2004). A proteína CXCL16 humana tem 254 aminoácidos, com dois diferentes transcritos, sendo um de 1,8 Kb e outra com 2,5 Kb de comprimento. Podem ser formadas por *splicing* alternativo, diferindo uma da outra pela região não codificante e a fonte da expressão. A proteína de 1,8 Kb é encontrada no baço, timo, testículos, enquanto a proteína de 2,5 Kb é expressa no coração, rim, fígado, pulmão, leucócitos em sangue periférico, pâncreas e próstata (SHIMAOKA et al., 2000; KORBECKI et al., 2021). São as únicas quimiocinas conhecidas que existem na forma solúvel, bem como na forma ancorada em membrana (KORBECKI et al., 2021). A forma presa à

membrana funciona como receptor de eliminação da fosfatidilserina da LDLox. Além disso, medeia a adesão célula-célula por meio do receptor exclusivo, o C-X-chemokine-receptor 6 (CXCR6) (LUDWIG e WEBER, 2007; LINKE et al., 2019). Já a forma solúvel de CXCL16 funciona como um quimioatraente para promover a migração de células que expressam o CXCR6 (CHEN et al., 2020, KORBECKI et al., 2021). CXCL16 e CXCR6 são expressos em macrófagos, células dendríticas, células T, plaquetas, bem como em células do músculo liso estimulado e células endoteliais (LINKE et al., 2019, CHEN et al., 2020).

Estudos *ex vivo* iniciais mostraram que CXCL16 é abundante em lesões ateroscleróticas humanas e murinas (MINAME et al., 2001). Estudos *in vitro* sugeriram que essa quimiocina pode mediar adesão de células T ao endotélio, impulsionando a migração de células T, estimulando a proliferação celular e a inflamação em células musculares lisas. E finalmente, como receptor *scavenger*, pode mediar a captação de lipoproteínas aterogênicas por macrófagos e células musculares lisas. Todos esses efeitos são conhecidos por serem pró-aterogênicos. Surpreendentemente, estudos *in vivo* em modelos murinos de aterosclerose sugeriram que o CXCL16 é ateroprotetor, enquanto que o seu receptor, o CXCR6, é prejudicial (WUTTGE et al., 2004). Além disso, estudos que investigaram a associação das concentrações plasmáticas circulantes de CXCL16 com a presença e extensão de DAC em humanos são controversos, sugerindo associação positiva, negativa ou ausente (SHEIKINE e SIRSIJO, 2008).

Um estudo sobre células mononucleares do sangue periférico mostrou que os monócitos não expressam CXCR6, o que significa que na patogênese da aterosclerose, os monócitos podem não ser recrutados diretamente pela conexão CXCL16 e CXCR6, sugerindo que esse efeito pode ser indireto ao recrutar células T que expressam o CXCR6 (KORBECKI et al., 2021).

O CXCL16 pode desempenhar um importante papel nos estágios posteriores da aterosclerose, pois uma alta expressão desta quimiocina foi encontrada em macrófagos na lesão da íntima na doença aterosclerótica (MINAME et al., 2001; KORBECKI et al., 2021). Também pode causar proliferação de células

musculares lisas e aumentar a expressão de fator de necrose tumoral (TNF) nestas células que associa-se com DASCV (CHANDRASEKAR et al.,2004; KOBERCKI et al., 2021).

Um estudo feito para avaliar a expressão de CXCL16 em pacientes portadores de HF que estavam em uso de iPCSK9 demonstraram redução da expressão deste marcador após 8 semanas de tratamento com Alirocumab (MARQUES et al., 2022).

2.5.4.3 Fatty acid binding protein 3 (FABP3)

A proteína de ligação de ácidos graxos 3 é uma das nove FABPs citosólicas conhecidas, mais ubiquamente expressa no coração e músculo esquelético, envolvida na manutenção de suprimento de energia para o coração e regulando o transporte de ácidos graxos em cardiomiócitos (TSUKAHARA et al.,2014; MOON et al., 2021). O gene FABP3 codifica uma proteína de baixo peso molecular no citosol dos cardiomiócitos, a *Heart-type fatty acid binding protein* (H-FABP) que é amplamente distribuída em altos níveis no coração e menores quantidades no músculo esquelético, testículos, cérebro, rim, pulmão, glândula adrenal e linfócitos (ZHANG et al., 2013). Essa proteína é rapidamente liberada na circulação, diante de um dano no tecido cardíaco, através de poros na membrana do miocárdio lesado, tornando um indicador de eventos cardiovasculares e um marcador para detectar dano miocárdico em curso, podendo ser usado para estratificar o risco de várias doenças cardíacas (OTAKI et al., 2014; GOEL et al., 2020; MOON et al., 2021).

O FABP3 é expresso em resposta ao gene de receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ) que é um membro da superfamília de receptores de hormônios nucleares, os quais funcionam por fatores de transcrição ativada por lipídios como ácidos graxos de cadeia longa (TSUKAHARA et al., 2014). Esses fatores regulatórios gênicos têm um impacto direto nas doenças humanas como a aterosclerose, obesidade, DM e câncer (TSKAHARA et al.,2014, ZHUANG et al., 2021).

Aumento nos níveis de FABP3 foi observado em pessoas com alto risco cardiovascular que desenvolvem doenças estruturais cardíacas (estágio B de insuficiência cardíaca), podendo predizer mortalidade por causas cardiovasculares numa população geral aparentemente saudável, sugerindo ser um marcador promissor para estratificação de risco cardiovascular (GLATZ et al., 1985; ZHANG et al., 2013; OTAKI et al., 2014; JONES et al., 2017). Além disso, observou-se um aumento nos níveis de FABP3 em indivíduos que apresentavam fatores de risco cardiovascular, como HAS, DM, obesidade e SM (OTAKI et al., 2014), sendo proporcional ao dano latente no miocárdio, que por sua vez era mais grave em pessoas com maior número de fatores de risco cardiovascular (ZHANG et al., 2013; OTAKI et al., 2014; MOON et al., 2021).

2.5.4.4 Fatty acid binding protein 4 (FABP4)

A FABP4, também conhecida como a FABP do adipócito (A-FABP) ou adipócito P2 (aP2), é altamente expressa nos adipócitos, macrófagos e células dendríticas e consiste em 1% de todas as proteínas solúveis no tecido adiposo (FURUHASHI et al., 2014; TAN et al., 2019). A expressão dessa proteína é altamente induzida durante a diferenciação dos adipócitos e controlada transcricionalmente por agonistas do PPAR γ (FURUHASHI et al., 2014).

É liberada principalmente durante a diferenciação dos monócitos em macrófagos, processo onde a LDLox é englobada para a formação de células espumosas, aumentando o acúmulo de éster de colesterol e induzindo resposta inflamatória (MAKOWSKI et al., 2005; HUI et al., 2010). Este processo faz parte do desenvolvimento da aterosclerose, uma vez que as células dendríticas e as células T estão envolvidas na patogênese da placa ateromatosa. Esta evidência foi demonstrada com a expressão aumentada de FABP4 em macrófagos presentes em amostras de placas instáveis de pacientes após endarterectomia de carótida (AGARDH et al., 2011; FURUHASHI et al., 2015).

O aumento dos níveis circulantes de FABP4 tem sido associado também à obesidade, SM, resistência insulínica e DM, atuando como uma adipocina, bem como à HAS e disfunção diastólica ventricular esquerda, além da dislipidemia (FURUHASHI, 2019; TAN et al., 2019). Tem sido relatado que o nível sérico de FABP4 está também associado à aterosclerose, avaliada pela espessura da camada íntima-média da carótida (YEUNG et al., 2007; MIROSHNIKOVA et al., 2021), se tornando um novo alvo terapêutico para essas comorbidades (FURUHASHI, 2019; MIROSHNIKOVA et al., 2021).

2.5.4.5 Tumor necrosis factor superfamily 14 (TNFSF14/LIGHT)

O TNFSF14 ou LIGHT foi identificado como um novo membro da superfamília TNF e como uma chave reguladora de fibrose, inicialmente descrito como uma molécula sintetizada por células T (MAURI et al., 1998; HARROP et al., 1998; HERRO e CROFT, 2016; HERRERO-CERVERA et al., 2021), e que possui dois receptores, o mediador de entrada de vírus herpes (HVEM ou TNFRSF14) e o receptor β de linfotóxina (LT β R ou TNFRSF3) (YUAN et al., 2017; HERRERO-CERVERA et al., 2021), os quais são ubiquamente expressos em vários tipos celulares inflamatórios e estruturais, como células do estroma e células hematopoiéticas, incluindo células endoteliais, células reticulares fibroblásticas, células dendríticas, macrófagos, mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos T, B e natural killer (NK), podendo ser ligado à membrana ou ser um produto solúvel como uma citocina (MAURI et al., 1998; HERRO e CROFT, 2016; AGOSTINO et al., 2021).

As células endoteliais desempenham um papel crítico no controle da função vascular, e adicionalmente, podem participar de reações inflamatórias e imunológicas. A ligação do LIGHT ao LT β R expresso em células endoteliais foi descrita por promover a adesão endotelial de células T pela regulação positiva de E-selectina, molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) (CHANG et al., 2005; CELIK et al., 2007; HERRERO-CERVERA et al., 2021). O LIGHT também pode induzir a expressão de interleucina 8 (IL-8) e quimiocina ligante 12 (CXCL12) (CHANG et

al., 2005; MADGE et al., 2010) nestas células que facilitam a migração de leucócitos para áreas de inflamação, e promovem indiretamente um ambiente propício para a promoção da fibrose tecidual (HERRO e CROFT, 2016).

A pesquisa básica e alguns estudos clínicos indicam que o TNFSF14 pode desempenhar um papel no desenvolvimento de várias doenças inflamatórias (WARE, 2009; LIN e HSIEH, 2011) e possivelmente está envolvido na patogênese da aterosclerose (LEE et al., 2001; SANDBERG et al., 2009; HSU et al., 2019).

2.5.4.6 Cluster de diferenciação 14 (sCD14)

A CD-14 é uma glicoproteína de membrana ancorada à glicosilfosfatidil-inositol (GPI) presente nas formas ligadas à membrana (mCD-14) e solúvel (sCD14). A forma mCD14 ancorada é expressa na superfície de monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas que se ligam aos lipopolissacárides (LPS), que são componentes de membranas na superfície celular de outros microrganismos, resultando em uma ativação de vários receptores *toll-like 4* (TRL4), os quais desencadeiam vias de sinalização pró-inflamatórias (REINER et al., 2013; OLSON et al., 2020). Na sua forma solúvel, a sCD-14 pode ser secretada por hepatócitos em resposta à interleucina 6 (IL6), sendo considerada um reagente de fase aguda (BAS et al., 2004; OLSON et al., 2020), ou ser derivado de clivagem enzimática de GPI ligada ao mCD-14 (DURIEUX et al., 1994; SU et al., 1999; PAN et al., 2000) com a liberação de vesículas intracelulares por processos que ocorrem durante ativação celular ou apoptose (OLSON et al. 2020).

Em resposta à inflamação/infecção, a IL6 induz a expressão hepática da sCD-14, como outras proteínas de fase aguda, ocorrendo aumento dos níveis no contexto de doenças infecciosas/inflamatórias agudas e crônicas, incluindo a aterosclerose (REINER et al., 2013). O sCD14 pode ter efeitos diferentes na sinalização inflamatória relacionada ao LPS, podendo potencializar a inflamação relacionada ao LPS nas células com e sem mCD14 (SHITOLE et al., 2019) e, por

outro lado, altos níveis de sCD14 podem tamponar o LPS promovendo a transferência para partículas de lipoproteína, impedindo a ligação do mCD14 na superfície de monócitos/macrófagos para consequente remoção (REINER et al., 2013; SHITOLE et al., 2019). Portanto, a sCD-14 é capaz de mediar a ativação de LPS de células que não expressam a mCD-14, como as células endoteliais e do músculo liso (PUGIN et al., 1993; JUAN et al., 1995, SHITOLE et al., 2019), pois o sCD14 desempenha um papel central ao transferir LPS para o complexo TRL4, aumentando a expressão de moléculas de adesão celular e atividade pró-coagulante, o que poderia servir como um potencial evento desencadeante para o desenvolvimento de aterosclerose e doenças cardiovasculares, além de aumentar a secreção de citocinas pró-inflamatórias com o TNF, interleucina 1- β (IL1- β) e IL-6 (REINER et al., 2013, OLSON et al., 2020).

Como um marcador de inflamação, ativador de células imunes e de translocação bacteriana, a sCD14 ganhou interesse como um potencial fator de risco para DCV, mas estudos sobre esta questão são limitados. Porém, maiores níveis de sCD14 foram associados com o risco aumentado de DAC incidente (OLSON et al., 2020).

O CD14 foi demonstrado ser um dos marcadores de estágio avançado da doença aterosclerótica em pacientes com HF e foi significativamente associado à DAC, independentemente da idade e do tabagismo, e consequentemente, associado a eventos coronarianos futuros em pacientes com HFHe. Assim, o CD14, pode ser uma nova ferramenta em potencial para investigação e previsão precisa de risco, sugerindo uma capacidade promissora de marcador a ser testado em populações com acompanhamento prospectivo (BOS et al., 2017; PRASONGSUKARN et al., 2021).

2.5.4.7 Proteína Gla de matriz não carboxilada circulante (ucMGP)

A proteína Gla de matriz (MGP) é um membro de proteínas da família de vitamina K-dependente, expresso por células musculares lisas vasculares de camada média arterial, fibroblastos, condrócitos e células endoteliais, podendo

também ser expresso em uma variedade de tecidos, incluindo a parede arterial, coração, pulmões e rins (GRIFFIN et al., 2019). A MGP é um marcador de calcificação vascular, pois é um potente inibidor deste processo, podendo estimar o risco cardiovascular (VAN DEN HEUVEL et al., 2014, GRIFFIN et al., 2019; SHIOI et al., 2020). A deficiência de MGP leva a uma maciça calcificação arterial e morte prematura por eventos vasculares (LUO et al., 1997; SHIOI et al., 2020; BILALIC et al., 2021).

A MGP para se tornar ativa, precisa sofrer carboxilação e fosforilação vitamina K-dependentes (ROUMELIOTIS et al., 2020). A vitamina K tem um papel crucial na síntese da MGP ativa, servindo como cofator para a enzima γ -glutamato carboxilase que catalisa a conversão da MGP desfosforilada não-carboxilada (dp-ucMGP), que é a forma totalmente inativa para formar a MGP desfosforilado-carboxilada (dp-cMGP), uma forma intermediária, seguido da fosforilação de serina para formar a MGP fosforilado-carboxilado ativa e madura (p-cMGP) que serve como grupos ligadores de cálcio (GRIFFIN et al., 2019; JESPERSEN et al., 2020). A carboxilação é essencial para a sua atividade inibitória da calcificação e sua secreção é aumentada pela fosforilação (CRANENBURG et al., 2010). A MGP desfosforilada não-carboxilada (dp-ucMGP) é considerada um melhor indicador do estado vascular da vitamina K do que outros componentes do sistema MGP e se correlaciona com a rigidez vascular na população em geral (GRIFFIN et al., 2019; SHIOI et al., 2020, ROUMELIOTIS et al., 2020).

Elevados níveis circulantes da forma inativa dp-ucMGP refletem a baixa ingestão de vitamina K, o que resulta em inibição menos eficiente de calcificação vascular. Em vários grupos de pacientes foi encontrada a associação entre dp-ucMGP circulante com morbidade e mortalidade cardiovasculares (VAN DEN HEUVEL et al., 2014; JAMINON et al., 2020; BILALIC et al., 2021). Em pacientes diabéticos com doença renal (DR), mostrou-se eficiente na avaliação do risco de desenvolver doença vascular manifestada como calcificação medial e intimal com patologias distintas, sendo um fator de risco comum na DR (GRIFFIN et al., 2019; JAMINON et al., 2020). Além disso, a deficiência de vitamina K em pacientes com DR associado à exposição da vasculatura a um meio urêmico tóxico demonstrou redução da atividade da carboxilase, causando uma

inatividade da MGP e consequente deficiência vascular da vitamina K e aumento da calcificação vascular (JAMINON et al., 2020; GRZEJSZCZAK e KURNATOWSKA, 2021; STEPIEN et al., 2022).

2.5.5 Micropartículas

As micropartículas (MPs) correspondem a um grupo distinto de pequenas vesículas anucleadas, que estão envolvidas em vários processos fisiológicos e fisiopatológicos. Podem advir de várias linhagens celulares ativadas ou pela morte celular. No contexto da cardiologia, podem estar envolvidas no desenvolvimento e manifestação de DCV, sendo que a presença em níveis elevados no plasma está associada à inflamação crônica, dano endotelial e trombose, já que evidências sugerem que MPs liberadas de plaquetas, leucócitos e endotélio podem ajudar a avaliar a saúde vascular. A constatação dessa forte correlação dos níveis de MPs com vários desfechos de DCV levou ao investimento em estudos avaliando a sua utilização como biomarcadores (VOUKALIS et al., 2019, LUGO-GAVIDIA et al., 2021).

As MPs são fragmentos submicrônicos que originam diretamente da membrana plasmática, liberadas a partir de células que estão em condições de estresse e/ou lesão. Sua formação inicia-se pela modificação na membrana da célula, seguida pela fissão e subsequente liberação no espaço extracelular, quando ocorre a externalização da fosfatidilserina (PS), sendo uma das principais características das MPs (BURGER et al., 2013; MINCIACCHI et al., 2015).

As MPs podem ser liberadas sob condições de estresse, morte celular ou apoptose, mas também poderá ocorrer durante um processo de ativação celular, como ocorre com as células endoteliais e plaquetas, contendo proteínas de superfície da célula originária, juntamente com conteúdo citosólico incluindo enzimas, RNA e possivelmente DNA, e se distinguem das outras microvesículas com base no tamanho, mecanismo de formação e conteúdo (BURGER et al., 2013; COCUCCI e MELDOLESI, 2015; ZABOROWSKI et al., 2015). Evidências emergentes sugerem que as MPs não são simplesmente uma consequência das doenças, mas podem contribuir para manutenção dos processos patológicos das

mesmas, sendo assim, consideradas marcadores e mediadores de doenças (BURGER et al., 2013). A liberação de MPs é um fenômeno compartilhado por muitos tipos celulares como forma de comunicação com outras células e, uma vez absorvidas por células vizinhas e/ou distais, as MPs podem transferir a carga funcional que poderá alterar o estado das células receptoras, contribuindo para processos fisiológicos e patológicos (ZABOROWSKI et al., 2015).

Devido às MPs serem muito pequenas e heterogêneas, houve a necessidade de se desenvolverem técnicas para medi-las e assegurar de maneira precisa e com alto rendimento, sendo a citometria de fluxo o método mais disponível para a sua abordagem de estudo, devido ao seu alto rendimento para quantificar e fenotipar um grande número de MPs, pois combina a alta sensibilidade da fluorescência (LANNIGAN e ERDBRUEGGER, 2017; SZATANEK et al., 2017). A identificação das MPs por citometria de fluxo baseia-se na ligação específica da anexina V à PS, esta última exposta na superfície da MP durante a sua formação (CONNOR et al., 2010; JEPPESEN et al., 2019).

2.5.5.1 Micropartículas de cardiomiócitos (CardioMPs)

As CardioMPs são liberadas durante condições de estresse, como hipóxia, inflamação ou lesão do músculo cardíaco e podem atuar como mediadores de comunicações intercelulares. Em condições de hipóxia, as MPs são enriquecidas com fatores angiogênicos, e no infarto agudo do miocárdio (IAM), as células cardíacas danificadas produzem MPs com aumento de conteúdo de fatores angiogênicos, anti-apoptóticos, mitogênicos e de crescimento para induzir reparo e cicatrização do miocárdio infartado (CHISTIYAKOV et al., 2016; GONZALO-CALVO et al., 2017; SIEGEL et al., 2020; WAGNER e RADISIC, 2021).

2.5.5.2 Micropartículas de células endoteliais (EMPs)

A homeostase vascular é um reflexo integral do endotélio quiescente, mas ao mesmo tempo competente (YONG et al., 2012). A disfunção endotelial é um evento precoce no desenvolvimento e progressão de uma ampla gama de

doenças cardiovasculares (LOVREN e VERMA, 2013) e é causado pela inflamação - evento inicial na formação da placa aterosclerótica, evento que pode não ser identificado e tratado de forma eficaz em pacientes com lesões vasculares assintomáticas ou frágeis, sendo necessário descobrir novos biomarcadores e desenvolver abordagens diagnósticas mais eficientes para estratificar pacientes com maior risco de eventos cardiovasculares que se beneficiariam de uma intervenção (SCHIRO et al., 2014).

As EMPs são liberadas na circulação após ativação das células endoteliais ou apoptose, atuando como efetores biológicos móveis capazes de mediar a fisiologia e a função vascular (YONG et al., 2012; CURTIS et al., 2013; SCHIRO et al., 2014). As EMPs têm atuado como mensageiros primários e secundários de inflamação vascular, trombose e resposta vasomotora, angiogênese e sobrevivência endotelial, e estão emergindo como indicadores potencialmente úteis de endotélio disfuncional, pelo qual a presença diferencial de EMPs está ligada à manifestação da doença vascular (YONG et al., 2012; CURTIS et al., 2013).

As EMPs podem ser classificadas como fisiológicas com efeitos anticoagulantes, ou patológicas com efeitos pró-inflamatórios (SCHIRO et al., 2014). Evidências crescentes sugerem que as EMPs desempenham um papel importante na patogênese da DCV, atuando como um marcador de dano, exacerbando a progressão da doença ou desencadeando uma resposta de reparo, e têm sido cada vez mais reconhecidas a desempenhar uma infinidade de papéis biológicos, refletindo a competência da função endotelial e da biologia vascular com potencial de atuar como biomarcadores do estado da doença (YONG et al., 2012, SCHIRO et al., 2014).

2.5.5.3 Micropartículas que expressam fator tissular (FTMPs)

A coagulação é iniciada pelo fator tissular (FT), que é expresso constitutivamente por células extravasculares, mas há evidências crescentes de que o FT pode estar presente no sangue exposto em vesículas derivadas de

células, sendo a sua presença associada a estados de hipercoagulação (KLEIJAN et al., 2012).

A hipercolesterolemia é um importante fator de risco para aterosclerose, mas também está associado à hiperatividade plaquetária que aumenta a morbimortalidade por doenças cardiovasculares, mas os mecanismos pelos quais a hipercolesterolemia produz um estado pró-coagulante permanecem indefinidos. Foi hipotetizado que a hipercolesterolemia com níveis elevados de LDLox no plasma induz a expressão de fator tissular em monócitos humanos, pois portadores de HF tiveram níveis elevados de atividade de FTMP (OWENS III et al., 2012). Devido a isso, houve intenso interesse na medição clínica das FTMPs em condições clínicas diversas. Este interesse foi impulsionado pela demonstração de seu papel em modelos animais de propagação de trombos com potencial pró-coagulante (KEY, 2010).

2.5.5.4 Micropartículas de Plaquetas (PMPs)

As plaquetas são conhecidas em desempenhar um papel central na hemostasia primária, bem como na fisiopatologia de distúrbios trombóticos. Além disso, estão envolvidas em vários processos fisiopatológicos incluindo respostas imunes, inflamação, angiogênese, regeneração tecidual e metástases de câncer (VARON e SHAI, 2015). Estudos revelaram um papel importante das PMPs na comunicação e envio de sinais para outras células, com mudança do fenótipo, durante a inflamação, miopatia, angiogênese e metástase tumoral (VARON e SHAI, 2015).

Diante do detalhamento desses marcadores cardiovasculares e das MPs que podem ser usados como sinalizadores de alterações endoteliais e vasculares precoces para a aterosclerose, e ainda por serem potenciais alvos terapêuticos para a prevenção de desfechos cardiovasculares, o presente estudo se justifica por existir, até o presente, poucos estudos que objetivam a avaliação desses marcadores numa população com HF.

2.6 Referências bibliográficas

ABIFADEL, M.; VARRET, M.; RABÈS, J.P.; ALLARD, D.; OUGUERRAM, K.; DEVILLERS, M.; CRUAUD, C.; BENJANNET, S.; WICKHAM, L.; ERLICH, D.; DERRÉ, A. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nature Genetics*, v. 34, p. 154-156, 2003.

AGARDH, H.E.; FOLKERSEN, L.; EKSTRAND, J., MARCUS, D.; SWEDENBORG, J.; HEDIN, U.; GABRIELSEN, A.; PAULSSON-BERNE, G. Expression of fatty acid-binding protein 4/aP2 is correlated with plaque instability in carotid atherosclerosis. *Journal of Internal Medicine*, v.269, n.2, p. 200-210, 2011.

AGO, T.; SADOSHIMA, J. GDF15, a cardioprotective TGF-beta superfamily protein. *Circulation Research*, v.98, p.294-297, 2006.

AGOSTINO, M.; ROONEY J.; HERAT L.; MATTHEWS J.; SIMONDS A.; NORTHFIELD S.E.; HOPPER, D.; SCHLAICH, M.P.; MATTHEWS, V.B. TNFSF14- Derived Molecules as a Novel Treatment for Obesity and Type 2 Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, v.22, n.10647, p. 1-20, 2021.

AKIOYAMEN, L.E.; GENEST, J.; SHAN, S.D.; REEL, R.L.; ALBAUM, J.M; CHU, A.; TU, J.V.; Estimating the prevalence of heterozygous familial hypercholesterolaemia: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*, v.7, e016461, p. 1-13, 2017.

ALONSO, R.; PEREZ DE ISLA L.; MUÑIZ-GRIJALVO O.; MATA P. Barriers to Early Diagnosis and Treatment of Familial Hypercholesterolemia: Current Perspectives on Improving Patient Care. *Vascular Health and Risk Management*, v.16, p. 11–25, 2020.

AUSTIN, M.A.; HUTTER, C.M.; ZIMMERN, R.L.; HUMPHRIES, S.E. Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGe prevalence review. *American Journal of Epidemiology*, v.160, n.5, p.407- 420, 2004.

AWAN, Z.; SEIDAH, N.G.; MBIKAY, M.C.M. PCSK9: A key modulator of cardiovascular health. *Circulation Research*, v.114, p.1022-1036, 2014

BAS, S.; GAUTHIER, B.R.; SPENATO, U.; STINGELIN, S.; GABAY, C. CD14 is an acute-phase protein. *Journal of Immunology Research*, v. 172, p.4470–4479, 2004.

BAYNES, J.W.; DOMINICZAK M.H., Lipídio e Lipoproteínas. *Bioquímica Médica*, Ed. Elsevier, 2ª edição, cap. 233, p. 233-249, 2005.

BEHESHTI, S.O.; MADSEN, C.M.; VARBO, A.; NORDESTGAARD B.G. Worldwide Prevalence of Familial Hypercholesterolemia: Meta-Analyses of 11 Million Subjects. *Journal of American College Cardiology*, v. 26, p.2553-2566, 2020.

BENITO-VICENTE, A.; URIBE, K.B.; JEBARI, S.; GALICIA-GARCIA, U.; OSTOLAZA, H.; MARTIN, C. Validation of LDLr Activity as a Tool to Improve Genetic Diagnosis of Familial Hypercholesterolemia: A Retrospective on Functional Characterization of LDLr Variants. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 1676 p. 1-18, 2018.

BENN, M.; WATTS, G.F.; TYBJAERG-HANSEN A.; NORDESTGAARD, B.G. Familial hypercholesterolemia in the danish general population: prevalence, coronary artery disease, and cholesterol-lowering medication. *Journal Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.97, n.11, p. 3956-3964, 2012.

BENN, M.; WATTS, G.F.; TYBJAERG-HANSEN, A.; NORDESTGAARD, B.G. Mutations causative of familial hypercholesterolemia: screening of 98 individuals

from the Copenhagen General Population Study estimated a prevalence of 1 in 217. *European Heart Journal*, v.37, n.17, p.1384-1394, 2016.

BEREZIN, A.E.; BERZIN, A.A. Adverse Cardiac Remodelling after Acute Myocardial Infarction: Old and New Biomarkers. *Disease Markers*, Article ID 1215802, p. 1-21, 2020.

BHATTACHARYYA, A.K.; CONNOR, W.E. Beta-sitosterolemia and xanthomatosis. A newly described lipid storage disease in two sisters. *Journal Clinical Investigation*, v.53, n.4, p.1033–1043, 1974.

BILALIC, A.; KURIR, T.T.; KUMRIC, M.; BOROVIAC, J.A.; MATETIC, A.; SUPEDOMIC, D.; BOZIC, J. Circulating Levels of Dephosphorylated-Uncarboxylated Matrix Gla Protein in Patients with Acute Coronary Syndrome. *Molecules*, v.26, n.1108, p. 1-12, 2021.

BINI, S.; TRAMONTANO, D.; MINICOCCI, I.; COSTANZO, A.; TAMBARO, F.; D'ERASMO, L.; ARCA, M. How ANGPTL3 Inhibition will help our clinical practice? *Current Atherosclerosis Reports*, v.24, n.1, p.19-29, 2023

BLOBE, G.C.; SCHIEMANN, W.P.; LODISH, H.F. Role of transforming growth factor beta in human disease. *New England Journal of Medicine*, v.342, p.1350-1358, 2000.

BOS, S.; PHILLIPS, M.; WATTS, G.F.; VERHOEVEN, A.J.M., SIJBRANDS, E. J.G.; WARD, N.C. Novel protein biomarkers associated with coronary artery disease in statin-treated patients with familial hypercholesterolemia. *Journal of Clinical Lipidology*, v.11, n. 3, p. 682-693, 2017.

BOTTS, S.R.; FISH, J.E.; HOWE, K.L. Dysfunctional Vascular Endothelium as a Driver of Atherosclerosis: Emerging Insights into Pathogenesis and Treatment. *Frontiers of Pharmacology*, v.12, n. 787541, p. 1-18, 2021.

BOUHAIRIE, V.E.; GOLDBERG, A.C. Familial Hypercholesterolemia. *Cardiology Clinics*, v.33, n.2, p.169-179, 2015.

BRUIKMAN, C.S.; HOVINGH, G.K.; KASTELEIN, J.J.P. Molecular basis of familial hypercholesterolemia. *Current Opinion of Cardiology*, v. 32, n.3 p.262-266, 2017.

BURGER, D.; SCHOCK, S.; THOMPSON, C.S.; MONTEZANO, A.C.; HAKIM, A.M.; TOUYZ, R.M. Microparticles: Biomarkers and beyond. *Clinical Science*, v. 124, n. 7, p. 423–441, 2013.

BURTIS, C.A.; BRUNS D.E. Lipídeos, Lipoproteínas, Apolipoproteínas e Outros Fatores de Risco Cardíaco. *Tietz Fundamentos de Química Clínica e Diagnóstico Molecular*, Ed. Elsevier, 7ª edição, cap. 23; p. 388 – 408, 2016.

CAHILL, P.A.; REDMOND, E.M. Vascular Endothelium – Gatekeeper of Vessel Health. *Atherosclerosis*, v.248, p.97–109, 2016.

CATAPANO, A.L.; PIRILLO, A.; NORATA, G.D. Anti-PCSK9 antibodies for the treatment of heterozygous familial hypercholesterolemia: patient selection and perspectives. *Vascular Health and Risk Management*, v.13, p.343-351, 2017.

CELIK, S.; LANGER, H.; STELLOS, K.; MAY, A.E.; SHANKAR, V.; KURZ, K.; KATUS, H.A.; GAWAZ, M.P.; DENGLER, T.J. Platelet-associated LIGHT (TNFSF14) mediates adhesion of platelets to human vascular endothelium. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 98, p.798–805, 2007.

CERVELLIN, G.; MATTIUZZI, C.; BOVO, C.; LIPPI, G. Diagnostic algorithms for acute coronary syndrome-is one better than another? *Annals of Translational Medicine*, v.4, n.193, p.1-6, 2016.

CHAN, D.C.; WATTS, G.F. Postprandial lipoprotein metabolism in familial hypercholesterolemia: thinking outside the box. *Metabolism*, v.61, p.3–11, 2012.

CHANDRASEKAR, B.; BYSANI, S.; MUMMIDI, S. CXCL16 signals via Gi, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, I kappa B kinase, and nuclear factor-kappa B and induces cell-cell adhesion and aortic smooth muscle cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, v.279, p. 3188–3196, 2004.

CHANG, Y.H.; HSIEH, S.L.; CHAO, Y.; CHOU, Y.C.; LIN, W.W. Proinflammatory effects of LIGHT through HVEM and LTbetaR interactions in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Biomedical Science*, v. 12, p.363–375, 2005.

CHEMELLO, K.; GARCÍA-NAFRÍA, J.; GALLO, A.; MARTÍN, C.; LAMBERT, G.; BLOM, D. Lipoprotein metabolism in familial hypercholesterolemia. *Journal of Lipid Research*, v. 62, n.100062, p.1-16, 2021.

CHEN, Y.; WANG, Z.; LI, Q.; YU, L.; ZHU, Y.; WANG, J.; SUN, S. oxLDL promotes podocyte migration by regulating CXCL16, ADAM10 and ACTN4. *Molecular Medicine Reports*, v. 22, p. 1976-1984, 2020.

CHISTIYAKOV, D.A.; OREKHOV, A.N.; BOBRYSEV, Y.V. Cardiac Extracellular Vesicles in Normal and Infarcted Heart. *International Journal of Molecular Sciences*, v.17, p.1-8, 2016.

CHORA, J.R.; MEDEIROS, A. M.; ALVES, A.C.; BOURBON, M. Analysis of publicly available LDLR, APOB, and PCSK9 variants associated with familial hypercholesterolemia: application of ACMG guidelines and implications for familial hypercholesterolemia diagnosis. *Genetics in Medicine*, v.20, n.6, p. 591-598, 2018.

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

COCUCCI, E.; MELDOLESI, J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in cell biology*, v. 25, n. 6, p. 364–372, 2015.

CONNOR, D.E.; EXNER, T.; MA, D.D.F.; JOSEPH, J.E. The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thrombosis and haemostasis*, v. 103, n. 5, p. 1044–1052, 2010.

CORRAL, P. De volta ao básico: PCSK9 como novo alvo para o receptor LDL. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.102, n.1, p. 5-8, 2014.

CRANENBURG, E.C.; KOOS, R.; SCHURGERS, L.J.; MAGDELEYNS, E.J.; SCHOONBROOD, T.H.; LANDEWÉ, R.B.; BRANDENBURG, V.M.; BEKERS, O.; VERMEER, C. Characterisation and potential diagnostic value of circulating matrix Gla protein (MGP) species. *Thrombosis and Haemostasis*, v.104, p.811-822, 2010.

CURTIS, A.M.; EDELBERG, J.; JONAS, R.; ROGERS, W.T.; MOORE, J.S.; SYED, W.; MOHLER III, E.R. Endothelial microparticles: Sophisticated vesicles modulating vascular function. *Vascular Medicine*, v.18, n.4, p. 204-214, 2013.

DA LUZ, P.L.; CHAGAS, A.C.P.; DOURADO, P.M.M.; LAURINDO, F.R.M. “Endothelium in Atherosclerosis: Plaque Formation and its Complications,” in *Endothelium and Cardiovascular Diseases*. Editors P.L. DaLuz, P. Libby, A.C.P. Chagas, and F.R.M. Laurindo. *Academic Press*, cap. 33, p. 493–512, 2018.

DATASUS - Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>. Acesso em: 8 fev 2019.

DIETSCHY, J.M.; TURLEY, S.D.; SPADY, D.K. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *Journal of Lipid Research*, v.34, p.1637–1659, 1993.

DOS SANTOS, J.E.; ZAGO, M.A. Familial hypercholesterolemia in Brazil. *Atherosclerosis*, v.4, n.3, p. 1–2, 2003.

DURIEUX, J.J.; VITAO, N.; POPESCU, O.; GUETTE, F.; CALZADA-WACK, J.; MUNKER, R.; SCHMIDT, R.E.; LUPKER, J.; FERRARA, P.; ZIEGLER-HEITBROCK, H.W.L.; LABETA, M.O. The two soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14: characterization and release by normal human monocytes. *European Journal of Immunology*, v.24, p. 2006–2012, 1994.

EJARQUE, I.; REAL, J.T.; MARTINEZ-HERVAS, S.; CHAVES, F.J.; BLESA, S.; GARCIA-GARCIA, A.B.; MILLAN, E.; ASCASO, J.F.; CARMENA, R. Evaluation of clinical diagnosis criteria of familial ligand defective apoB 100 and lipoprotein phenotype comparison between LDL receptor gene mutations affecting ligand-binding domain and the R3500Q mutation of the apoB gene in patients from a South European population. *Translational Research*, v.151, p.162–167, 2008.

EK, W.E.; HEDMAN, A.K.; ENROTH, S.; MORRIS, A.P.; LINDGREN, C.M.; MAHAJAN, A.; GUSTAFSSON, S.; GYLLENSTEN, U.; LIND, L.; JOHANSSON, A. Genome-wide DNA methylation study identifies genes associated with the cardiovascular biomarker GDF-15. *Human Molecular Genetics*, v.25, p.817-827, 2016.

FAIRLIE, W.D.; MOORE, A.G.; BAUSKIN, A.R.; RUSSELL, P.K.; ZHANG, H.P.; BREIT, S.N. MIC1 is a novel TGF- β superfamily cytokine associated with macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology*, v.65, n.1, p. 2–5, 1999.

FALUDI, A.A.; IZAR, M.C.O.; SARAIVA, J.F.K.; CHACRA, A.P.M.; BIANCO, H.T.; NETO, A.A.; BERTOLAMI, A.; PEREIRA, A.C.; LOTTENBERG, A.M.; SPOSITO, A.C.; CHAGAS, A.C.P.; FILHO, A.C.; SIMÃO, A.F.; FILHO, A.C.A.; et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da

Atherosclerose. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.109, n.2, Supl 1, p.1-76, 2017.

FARHAN, S.M.; HEGELE, R.A. Exomesequencing: new insights into lipoprotein disorders. *Current Cardiology Reports*, v.16, n.507, p. 1-10, 2014.

FIGUEIREDO, M.S.; DOS SANTOS, J.E.; ALBERTO, F.L.; ZAGO, M.A. High frequency of the Lebanese allele of the LDLr gene among Brazilian patients with familial hypercholesterolaemia. *Journal of Medical Genetics*, v.29, p.813-815, 1992.

FONSECA, F.A.H. Farmacocinética das Estatinas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.85, n.5, p. 9-14, 2005.

FURUHASHI, M. Fatty Acid-Binding Protein 4 in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, v.26, p. 216-232, 2019.

FURUHASHI, M.; SAITOH, S.; SHIMAMOTO, K.; MIURA, T. Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clinical Medicine Insights: Cardiology*, v.8, suppl.3, p.23-33, 2015.

GANJALI, S.; MOMTAZI, A.A.; BANACH, M.; KOVANEN, P.T.; STEIN, E.A.; SAHEBKAR, A. HDL abnormalities in familial hypercholesterolemia: Focus on biological functions. *Progress in Lipid Research*, v. 67, p.16–26, 2017.

GARCIA, C.K.; WIKLUND, K.; ARCA, M.; ZULIANI, G.; FELLIN, R.; MAIOLI, M.; CALANDRA, S.; BERTOLINI, S.; COSSU, F.; GRISHIN, N.; BARNES, R.; COHEN, J.C.; HOBBS, H.H. Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science*, v.292, p.1394-1398, 2001.

GLATZ, J.F.; PAULUSSEN, R.J.; VEERKAMP, J.H. Fatty acid binding proteins from heart. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 38, p. 115–129, 1985.

GOEL, H.; MELOT, J.; KRINOCK, M.D.; KUMAR A.; NADARD, S.K.; LIPE G.Y. H. Heart-type fatty acid-binding protein: an overlooked cardiac biomarker. *Annals of Medicine*, v.52, n.8, 444–461, 2020.

GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds.). *The metabolic basis of inherited disease*. New York (NY): McGraw-Hill, p.1195-1250, 1989

GOLDSTEIN, J.K.; HOBBS, H.H.; BROWN, M.S. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds.). *The metabolic & molecular basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, ed.8, p. 2863-2913, 2001.

GONZALO-CALVO, D.; CENARRO, A.; GARLASCHELLI, K.; PELLEGATTA, F.; VILADES, D.; NASARRE, L.; CAMINO-LOPEZ, S.; CRESPO, J.; CARRERAS, F.; LETA, R.; CATAPANO, A. L.; NORATA, G. D.; CIVEIRA, F.; LLORENTE-CORTES, V. Translating the microRNA signature of microvesicles derived from human coronary artery smooth muscle cells in patients with familial hypercholesterolemia and coronary artery disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v.106, p. 55-67, 2017.

GRIFFIN, T.P. ISLAM, N.; WALL D.; FERGUSON, J.; GRIFFIN, D.G.; GRIFFIN, M.D.; O'SHEA, P.M.. Plasma dephosphorylated uncarboxylated Matrix Gla-Protein (dp-ucMGP): reference intervals in Caucasian adults and diabetic kidney disease biomarker potential. *Scientific Reports*, v.9, n.18452, p.1-13, 2019.

GRZEJSZCZAK, P.; KURNATOWSKA, I. Role of Vitamin K in CKD: Is Its Supplementation Advisable in CKD Patients? *Blood Pressure Research*, v.46, n.5, p.523-530, 2021.

GUERIN, M. Reverse cholesterol transport in familial hypercholesterolemia. *Current Opinion in Lipidology*, v.23, n.4, p.377- 385, 2012.

HAASE, A; GOLDBERG, A.C. Identification of people with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Current Opinion of Lipidology*, v. 23, p. 282-289, 2012.

HARADA, P.; MINAME, M.H.; BENSEÑORA I.M.; SANTOS, R.D.; LOTUFO, P.A. Familial hypercholesterolemia prevalence in an admixed racial society: Sex and race matter. The ELSA-Brazil. *Atherosclerosis*, v.277, p. 273-277, 2018.

HARROP, J.A.; MCDONNELL, P.C.; BRIGHAM-BURKE, M.; LYN, S.D.; MINTON, J.; TAN, K.B.; DEDE, K.; SPAMPANATO, J.; SILVERMAN, C.; HENSLEY, P.; DIPRINZO, R.; EMERY, J.G.; DEEN, K.; EICHMAN, C.; CHABOT-FLETCHER, M.; TRUNEH, A.; YOUNG, P.R. Herpes virus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells and inhibits HT29 cell growth. *Journal of Biological Chemistry*, v.273, p.27548–27556, 1998.

HEGELE, R.A.; BAN, M.R.; CAO, H.; MCINTYRE, A.D.; ROBINSON, J.F.; WANG, J. Targeted next-generation sequencing in monogenic dyslipidemias. *Current Opinion Lipidology*, v. 26, p.103-113, 2015.

HENDERSON, R.; O'KANE, M.; MCGILLIGAN, V.; WATTERSON, S. The genetics and screening of familial hypercholesterolaemia. *Journal of Biomedical Science*, v.23, n.39, p. 1-12, 2016.

HERRERO-CERVERA, A.; ESPINÓS-ESTÉVEZ, C.; MARTÍN-VAÑÓ, S.; TABERNER-CORTÉS, A.; AGUILAR-BALLESTER, M.; VINUÉ A.; PIQUERAS, L.; MARTÍNEZ-HERVÁS, S.; GONZÁLEZ-NAVARRO, H. Dissecting Abdominal Aortic Aneurysm Is Aggravated by Genetic Inactivation of LIGHT (TNFSF14). *Biomedicines*, v. 9, n.1518, p. 1-17, 2021.

HERRO, R.; CROFT, M. The Control of Tissue Fibrosis by the Inflammatory Molecule LIGHT (TNF Superfamily member 14). *Pharmacological Research*, v.104, p.151-155, 2016.

HO, J.E.; LYASS, A; COURCHESNE, P.; CHEN, G.; LIU, C.; YIN, X.; HWANG, S.; MASSARO, J.M.; LARSON, M.G.; LEVY, D. Protein biomarkers of cardiovascular disease and mortality in the community. *Journal of American Heart Association*, v.7, n.14, p.1-11, 2018.

HOBBS, H.H.; RUSSELL, D.W.; BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. The LDL receptors locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annual Review of Genetics*, v.24, p. 133-170, 1990.

HOBBS, H.H.; BROWN, M.; GOLDSTEIN, J.L. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Human Mutation*, v.1, n.6, p. 445-466, 1992.

HOGUE, J.C.; LAMARCHE, B.; GAUDET, D.; TREMBLAY, A.J.; DESPRES, J.P.; BERGERON, J.; GAGNE, C.; COUTURE, P. Association of heterozygous familial hypercholesterolemia with smaller HDL particle size. *Atherosclerosis*, v.190, p.429–435, 2007.

HOPKINS, P.N.; TOTH P.P.; BALLANTYNE, C.M.; RADER, D.J. National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. Familial hypercholesterolemias: prevalence, genetics, diagnosis and screening recommendations from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. *Journal Clinical Lipidology*, v.5, n.3 Suppl, p.9-17, 2011.

HORTON, J.D.; COHEN, J.C.; HOBBS, H.H. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, v.32, n.2, p.71-77, 2007.

HSU, C.Y.; TSENG, W.K.; WU, Y.W.; LIN, T.H.; YEH, H.I.; CHANG, K.C.; WANG, J.H.; CHOU, R.H.; HUANG, C.Y.; HUANG, P.H.; LEU, H.B.; YIN, W.H.; WU, C.C.; LIN, S.J.; CHEN, J.W. Circulating TNFSF14 (Tumor Necrosis Factor Superfamily 14) Predicts Clinical Outcome in Patients With Stable Coronary Artery Disease. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, v.39, p.1240-1252, 2019.

HU, P.; DHARMAYAT, K.I.; STEVENS, C.A. T.; SHARABIANI, M.T.A.; JONES, R.S.; WATTS, G.F.; GENEST, J.; RAY, K.K.; VALLEJO-VAZ, A.J. Prevalence of Familial Hypercholesterolemia among the general population and patients with atherosclerotic cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*, v.141, p.1742–1759, 2020.

HUI, X.; LI, H.; ZHOU, Z.; LAM, K.S.L.; XIAO, Y.; WU, D.; DING, K.; WANG, Y.; VANHOUTTE, P.M.; XU, A. Adipocyte fatty acid-binding protein modulates inflammatory responses in macrophages through a positive feedback loop involving c-Jun NH2-terminal kinases and activator protein-1. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285,n.14, p.10273-10280, 2010.

IACocca, M.A.; CHORA, J.R.; CARRIE, A.; FREIBERGER, T.; LEIGH, S.E.; DEFESCHE, J.C.; KURTZ, C.L.; DISTEFANO, M.T.; SANTOS, R.D.; et al. ClinVar database of global familial hypercholesterolemia-associated DNA variants. *Human Mutation*, v.39, n.11, p.1631-1640, 2018.

IZAR, M.C.; MACHADO, V.A.; FONSECA, F.A. Genetic screening for homozygous and heterozygous familial hypercholesterolemia. *Application of Clinical Genetics*, v.3, p.147-157, 2010.

IZAR, M.C.O.; GIRALDEZ, V.Z.R.; BERTOLAMI, A.; SANTOS, R.D.; LOTTENBERG, A.M.; ASSAD, M.H.V.; SARAIVA, J.F.K.; CHACRA, A.P.M.; MARTINEZ, T.L.R.; BAHIA, L.R.; FONSECA, F.A.H.; FALUDI, A.A.; SPOSITO, A.C.; et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar – 2021. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.117, n.4, p. 782-844, 2021.

JAMINON, A.M.G.; DAI, L.; QURESHI A.R.; EVENEPOEL, P.; RIPSWEDE, J.; SÖDERBERG, M.; WITASP, A.; OLAUSON, H.; SCHURGERS, L.J.; STENVINKEL, P. Matrix Gla protein is an independent predictor of both intimal and medial vascular calcification in chronic kidney disease. *Scientific Reports*, v.10, n.6586, p.1-8, 2020.

JANNES, C.E.; DIAS, R.S.; SILVA, P.R.S.; TUROLLA, L.; GAGLIARDI, A.C.M.; MARSIGLIA, J.D.C.; CHACRA, A.P.; MINAME, M.H.; ROCHA, V.Z.; SALGADOFILHO, W.; KRIEGER, J.E.; PEREIRA, A.C. Familial hypercholesterolemia in Brazil: cascade screening program, clinical and genetic aspects. *Atherosclerosis*, v. 238, p. 101-107, 2015

JEPPESEN, D.K.; FENIX, A.M.; FRANKLIN, J.L.; HIGGINBOTHAM, J.N.; ZHANG, Q.; ZIMMERMAN, L.J.; LIEBLER, D.C.; et al. Reassessment of Exosome Composition. *Cell*, v. 177, n. 2, p. 428- 445, 2019.

JESPERSEN, T.; MOLLEHAVE, L.T.; THUESEN, B.H.; SKAABY, T.; ROSSING, P.; TOFT, U.; JORGENSEN, N.R.; CORFIXEN, B.L.; JAKOBSEN, J.; FRIMODT-MOLLER, M.; LINNEBERG, A. Uncarboxylated Matrix Gla-Protein: A Biomarker of Vitamin K Status and Cardiovascular Risk. *Clinical Biochemistry*, v.83, p. 49-56, 2020.

JONES, J.D.; CHEW, P.G.; DOBSON, R.; WOOTTON, A.; ASHRAFI, R.; KHAND, A. The Prognostic Value of Heart Type Fatty Acid Binding Protein in Patients with Suspected Acute Coronary Syndrome: A Systematic Review. *Current Cardiology Reviews*, v.13,p.189-198, 2017.

JUAN, T.S.; KELLEY, M.J.; JOHNSON, D.A.; BUSSE, L.A.; HAILMAN, E.; WRIGHT, S.D.; LICHENSTEIN, H.S. Soluble CD14 truncated at amino acid 152 binds lipopolysaccharide (LPS) and enables cellular response to LPS. *Journal of Biological Chemistry*, v.270, p.1382–1387, 1995.

KEMPF, T.; EDEN, M.; STRELAU, J.; NAGUIB, M.; WILLENBOCKEL, C.; TONGERS, J.; HEINEKE, J.; KOTLARZ, D.; XU,J.; MOLKENTIN, J.D.; NIESSEN, H.W.; DREXLER, H.; WOLLERT, K.C. The transforming growth factor-beta superfamily member growth differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/ reperfusion injury. *Circulation Research*, v.98, n.3, p.351-360, 2006.

KHERA, A.V.; WON, H.H.; PELOSO, G.M.; LAWSON, K.S.; BARTZ, T.M.; DENG, X.; LEEUWEN, E.M.; NATARAJAN, P.; EMDIN, C.A.; BICK, A.G.; MORRISON, A.C.; BRODY, J.A.; GUPTA, N.; NOMURA, A.; KESSLER, T.; et al. Diagnostic yield and clinical utility of sequencing familial hypercholesterolemia genes in patients with severe hypercholesterolemia. *Journal of American College Cardiology*, v. 67, n.22, p. 2578-2589, 2016.

KLEINJAN, A.; BÖING, A.N.; STURK, A.; NIEUWLAND, R. Microparticles in vascular disorders: How tissue factor-exposing vesicles contribute to pathology and physiology. *Thrombosis Research*, v.130, p.S71–S73, 2012.

KLOSE, G.; LAUFS, U.; MÄRZ, W.; WINDLER, E. Familial Hypercholesterolemia: Developments in Diagnosis and Treatment. *Deutsches Ärzteblatt International*, v. 111, p. 523-529, 2014.

KORBECKI, J.; BAJDAK-RUSINEK, K.; KUPNICKA, P.; KAPCZUK, P.; SIMINSKA, D.; CHLUBEK, D.; BARANOWSKA-BOSIACKA, I. The Role of CXCL16 in the Pathogenesis of Cancer and Other Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 3490, p.1-27, 2021.

KRAFT, H.G.; LINGENHEL, A.; RAAL, F.J.; HOHENEGGER, M.; UTERMANN, G. Lipoprotein(a) in homozygous familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, v.20, 522–528, 2000.

KRATZIN H.; ARMSTRONG, V.W.; NIEHAUS, M.; HILSCHMANN, N.; SEIDEL D. Structural relationship of an apolipoprotein(a) phenotype (570 kDa) to plasminogen: homologous kringle domains are linked by carbohydrate-rich regions. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, v.368, n.12, p. 1533–1544, 1987.

LAMBERT, G.; SJOUKE, B.; CHOQUE, B.; KASTELEIN, J. J. P.; HOVINGH, G. K. The PCSK9 decade. *Journal of Lipid Research*, v.53, p. 2515-2524, 2012.

LANAS, F.; AVEZUM, A.; BAUTISTA, L.E.; DIAZ, R.; LUNA, M.; ISLAM, S.; YUSUF, S.; INTERHEART Investigators in Latin America. Risk factors for acute

myocardial infarction in Latin America: the Interheart Latin American Study. *Circulation*, v.115, n.9, p.1067-74, 2007.

LANGSTED, A.; KAMSTRUP, P.R.; NORDESTGAARD, B.G. High lipoprotein(a) and high risk of mortality. *European Heart Journal*, v.40, p. 2760–277, 2019.

LANNIGAN, J.; ERDBRUEGGER, U. Imaging flow cytometry for the characterization of extracellular vesicles. *Methods*, v. 112, p. 55–67, 2017.

LEE, W.H.; KIM S.H.; LEE, Y.; LEE, B.B.; KWON, B.; SONG, H.; KWON, B.S.; PARK, J.E. Tumor necrosis factor receptor superfamily 14 is involved in atherogenesis by inducing proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, v.21, p.2004–2010, 2001.

LEREN, T.P.; MANSHAUS, T.; SKOVHOLT, U.; SKODJE, T.; NOSSEN, I.E.; TEIE, C.; SORENSEN, S.; BAKKEN, K.S. Application of molecular genetics for diagnosing familial hypercholesterolemia in Norway: results from a family-based screening program. *Seminars in Vascular Medicine*, v.4, n.1, p. 75-85, 2004.

LEREN, T.P. Sorting an LDL receptor with bound PCSK9 to intracellular degradation. *Atherosclerosis*, v.237, n.1, p.76-81, 2014.

LIN, W.W.; HSIEH, S.L. Decoy receptor 3: a pleiotropic immunomodulator and biomarker for inflammatory diseases, autoimmune diseases and cancer. *Biochemical Pharmacology*, v.81, p.838–847, 2011.

LINGENHEL, A.; KRAFT, H.G.; KOTZE, M.; PEETERS, A.V.; KRONENBERG, F.; KRUSE, R.; UTERMANN, G. Concentrations of the atherogenic Lp(a) are elevated in familial hypercholesterolaemia: a sib pair and family analysis. *European Journal of Human Genetics*, v.6, p.50–60, 1998.

LINKE, B.; DOS SANTOS, S.M.; PICARD-WILLEMS, B.; KEESE, M.; HARDER, S.; GEISSLINGER, G.; SCHOLICH, K. CXCL16/CXCR6-mediated adhesion of

human peripheral blood mononuclear cells to inflamed endothelium. *Cytokine*, v.122, p. 1-9, 2019.

LIPPI, G.; FRANCHINI, M.; CERVELLIN, G. Diagnosis and management of ischemic heart disease. *Seminars in Thrombosis Hemostasis*, v. 39, p.202-213, 2013.

LIPPI, G.; CERVELLIN, G. Risk assessment of post-infarction heart failure. Systematic review on the role of emerging biomarkers. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, v.51, p.13-29, 2014.

LOK, D.J.; KLIP, I.J.T.; LOK S.I.; PORTE, P.W.B.; BADINGS E.; WIJNGAARDEN, J.; VOORS, A.A.; BOER, R.A.; VELDHUISEN, D.J.; MEER, P. "Incremental Prognostic Power of Novel Biomarkers (Growth-Differentiation Factor15, High-Sensitivity C-Reactive Protein, Galectin-3, and High-Sensitivity Troponin-T) in Patients With Advanced Chronic Heart Failure," *The American Journal of Cardiology*, v.112, n.6, p. 831–837, 2013.

LOVREN, F.; VERMA, S. Evolving Role of Microparticles in the Pathophysiology of Endothelial Dysfunction. *Clinical Chemistry*, v.59, n.8 1166–1174, 2013.

LUDWIG, A.; WEBER, C. Transmembrane chemokines: versatile 'special agents' in vascular inflammation. *Thrombosis and Haemostasis*, v.97, p.694–703, 2007.

LUGO-GAVIDIA, L.M.; BURGER, D.; MATTHEWS, V.B.; NOLDE, J.M.; KIUCHI M.G. ; CARNAGARIN, R. ; KANNENKERIL, D.; CHAN, J.; JOYSON, A.; HERAT, L.Y.; AZZAM, O.; SCHLAIC, M.P. Role of Microparticles in Cardiovascular Disease Implications for Endothelial Dysfunction, Thrombosis, and Inflammation. *Hypertension*, v.77, p.1825–1844, 2021.

LUIRINK, I.K.; WIEGMAN,A.;KUSTERS,D.M.; HOF,M.H.; GROOTHOFF,J.W.; GROOT, E.M.D.; KASTELEIN,J.J.P.; HUTTEN,B. A.20-Year Follow-up of Statins

in Children with Familial Hypercholesterolemia. *The New England Journal of Medicine*, v.17, p. 1547- 1556, 2019.

LUO, G.; DUCY, P.; MCKEE, M.D.; PINERO, G.J.; LOYER, E.; BEHRINGER, R.R. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*, v.386, p.78-81, 1997.

MADGE, L.A.; MAY, M.J. Classical NF-kappaB activation negatively regulates noncanonical NFkappaB-dependent CXCL12 expression. *Journal of Biological Chemistry*, v.285, p.38069–38077, 2010.

MAKOWSKI, L.; BRITTINGHAM, K.C.; REYNOLDS, J.M.; SUTTLES, J.; HOTAMISLIGIL, G.S. The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and IkappaB kinase activities. *Journal of Biological Chemistry*, v.280, n.13, p.12888–12895, 2005.

MARQUES, P.; DOMINGO, E.; RUBIO, A.; MARTINEZ-HERVÁS, S.; ASCASO, J.F.; PIQUERAS, L.; REAL, J.T.; SANZ, M. Beneficial effects of PCSK9 inhibition with alirocumab in familialhypercholesterolemia involve modulation of new immune players. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 145, p. 1-14, 2022.

MARTINEZ, L.R.C.; SANTOS, R.D.; MINAME, M.H.; DEUS, D.F.; LIMA, E.S.; MARANHÃO, R.C. Transfer of lipids to high-density lipoprotein (HDL) is altered in patients with familial hypercholesterolemia. *Metabolism*, v. 62, p.1061–1064, 2013.

MATA, P.; ALONSO, R.; PÉREZ DE ISLA, L. Atherosclerotic cardiovascular disease risk assessment in familial hypercholesterolemia: does one size fit all? *Current Opinion of Lipidology* v.29, p. 445–452, 2018.

MAURI, D.N.; EBNER, R.; MONTGOMERY, R.I.; KOCHER, K.D.; CHEUNG, T.C.; YU, G.L.; RUBEN, S.; MURPHY, M.; EISENBERG, R.J.; COHEN, G.H.; SPEAR, P.G.; WARE, C.F. LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity*, v. 8, p. 21–30, 1998.

MAY, B.M.; PIMENTEL, M.; ZIMMERMAN, L.I.; ROHDE L.E. GDF-15 as a Biomarker in Cardiovascular Disease. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.116, n.3, p.494-500, 2021

MCCLELLAND, R.L.; CHUNG, H.; DETRANO, R.; POST, W.; KRONMAL, R.A. Distribution of coronary artery calcium by race, gender, and age: results from the Multi Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Circulation*, v.113, p. 30–7, 2006.

MCKENNEY, J.M.; FAHA, F.N.L.A. Understanding PCSK9 and anti-PCSK9 therapies. *Journal of Clinical Lipidology*, v.9, p.170-186, 2015.

MEHTA, R.; ZUBIRÁN, R.; MARTAGÓN, A.J.; VAZQUEZ-CÁRDENAS, A.; SEGURA-KATO, Y.; TUSIÉ-LUNA, M.T.; AGUILAR-SALINAS, C.A. The panorama of familial hypercholesterolemia in Latin America: a systematic review. *Journal of Lipid Research*, v. 57, p.2115-2129, 2016.

MINAMI, M.; KUME, N.; SHIMAOKA, T.; KATAOKA, H.; HAYASHIDA, K.; AKIYAMA, Y.; NAGATA, I.; ANDO, K.; NOBUYOSHI, M.; HANYUU, M.; KOMEDA, M.; YONEHARA, S.; KITA, T. Expression of SR-PSOX, a novel cell-surface scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized LDL in human atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis Thrombosis of Vascular Biology*, v.21, p.1796–1800, 2001.

MINCIACCHI, V.R.; FREEMAN, M.R.; DI VIZIO, D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 40, p. 41–51, 2015.

MIROSHNIKOVA, V.V.; POLYAKOVA, E.A.; POBOZHEVA, I.A.; PANTELEEVA, A.A.; RAZGILDINA, N.D. ; KOLODINA, D.A. ; BELYAEVA, O.D.; BERKOVICH, O.A.; PCHELINA, S.N.; BARANOVA, E.I. FABP4 and omentin-1 gene expression in epicardial adipose tissue from coronary artery disease patients. *Genetics and Molecular Biology*, v.44, n.4, e20200441, p. 1-8, 2021.

MOTULSKI, A.G. Genetic Familial Hypercholesterolemia and its diagnosis. *Atherosclerosis*, v.9, n.1, p.13-7, 1989.

MOON, M.G.; YOON, C.H.; LEE, K.; KANG, S.H.; YOUN, T.J.; CHAE, I.H. Evaluation of Heart-type Fatty Acidbinding Protein in Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *Journal of Korean Medicine Science*, v.36, n.8, p. 1-12, 2021.

MOORE, A.G.; BROWN, D.A.; FAIRLIE, W.D.; BAUSKIN, A.R.; BROWN, P.K.; MUNIER, M.L.; RUSSELL, P.K.; SALAMONSEN, L.A.; WALLACE, E.M.; BREIT, S.N. The transforming growth factor- α superfamily cytokine macrophage inhibitory cytokine-1 is present in high concentrations in the serum of pregnant women. *Journal Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 85, n.12, p.4781–4788, 2000.

MUNDI, S.; MASSARO, M.; SCODITTI, E.; CARLUCCIO, M.A.; VAN HINSBERGH, V.W.M.; IRUELA-ARISPE, M.L.; CATERINA R. Endothelial Permeability, LDL Deposition, and Cardiovascular Risk Factors - A Review. *Cardiovascular Research*, v.114, n.1, p. 35–52, 2018.

NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR PRIMARY CARE - NCCPC (UK). Identification and management of familial hypercholesterolemia (FH). *London: Royal College of General Practitioners (UK)*, 2008. Disponível em: <http://www.nice.org.uk/CG71>. 29 abr 2018.

NEIL, A.; COOPER, J.; BETTERIDGE, J.; CAPPS, N.; MCDOWELL, I.; DURRINGTON, P.; SEED, M.; HUMPHRIES, S.E. Reductions in all-cause, cancer, and coronary mortality in statin-treated patients with heterozygous

familial hypercholesterolaemia: a prospective registry study. *European Heart Journal*, v.29, p. 2625–2633, 2008.

NORDESTGAARD, B.G.; CHAPMAN, M.J.; HUMPHRIES, S.E.; GINSBERG, H.N.; MASANA, L.; DESCAMPS, O.S.; WIKLUND, O.; HEGELE, R.A.; RAAL, F.J.; DESFECHE, J.C.; WIEGMAN, A.; SANTOS, R.D.; WATTS, G.F.; et al. Familial hypercholesterolemia is underdiagnosed and undertreated in general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease. European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *European Heart Journal*, v.34, n.45, p. 3478- 3490, 2013.

O'DONNELL, M.J.; XAVIER, D.; LIU, L.; ZHANG, H.; CHIN, S.L.; RAO-MELACINI, P.; RANGARJAN, S.; ISLAM, S.; PAIS, P.; MCQUEEN, M.J.; MONDO, C.; DAMASCENO, A.; LOPEZ-JARAMILLO, P.; HANKEY, G.J.; et al. Investigators. Risk factors for ischemic and intracerebral hemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet*, v.376, n.9735, p.112-123, 2010.

OLSON, N.C.; KOH, I.; REINER, A. P.; JUDD, S.E.; IRVIN, M.R.; HOWARD, G.; ZAKAI, N.A.; CUSHMAN, M. Soluble CD1, Ischemic Stroke, and Coronary Heart Disease Risk in a Prospective Study: The REGARDS Cohort. *Journal of American Heart Association*, v.9, e014241, p.1-9, 2020.

OTAKI, Y.; WATANABE, T.; TAKAHASHI, H.; HIRAYAMA, A.; NARUMI, T.; KADOWAKI, S.; HONDA, Y.; ARIMOTO, T.; SHISHIDO, T.; MIYAMOTO, T.; KONTA, T.; SHIBATA, Y.; FUKAO A.; DAIMON, M.; UENO, Y.; KATO, T.; KAYAMA, T.; KUBOTA, I. Association of Heart-Type Fatty Acid-Binding Protein with Cardiovascular Risk Factors and All-Cause Mortality in the General Population: The Takahata Study. *PLOS ONE*, v.9, n.5, e94834, p.1-10, 2014.

OUGUERRAM, K.; CHETIVEAUX, M.; ZAIR, Y.; COSTET, P.; ABIFADEL, M.; VARRET, M.; BOILEAU, C.; MAGOT, T.; KREMPF, M. Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in

PCSK9. *Arteriosclerosis Thrombosis of Vascular Biology*, v. 24, p.1448–1453, 2004.

OWENS III, P.; PASSAM, F.H.; ANTONIAK, S.; MARSHALL, S.M.; MCDANIEL, A.L.; RUDEL, L.; WILLIAMS, J.C.; HUBBARD, B.K.; DUTTON, J.; WANG, J.; TOBIAS, P.S.; CURTISS, L.K.; DAUGHERTY, A.; et al. Monocyte tissue factor–dependent activation of coagulation in hypercholesterolemic mice and monkeys is inhibited by simvastatin. *Journal Clinical Investigation*, v.122, n.2, p.558–568, 2012.

PAN, Z.; ZHOU, L.; HETHERINGTON, C.J.; ZHANG, D.E. Hepatocytes contribute to soluble CD14 production, and CD14 expression is differentially regulated in hepatocytes and monocytes. *Journal of Biological Chemistry*, v.275, p. 36430–36435, 2000.

PATEL, S.B.; SALEN, G.; HIDAKA, H.; KWITEROVICH, P.O.; STALENHOF, A.F.; MIETTINEN, T.A.; GRUNDY, S.M.; LEE, M.H.; RUBENSTEIN, J.S.; POLYMERPOULOS, M.H.; BROWNSTEIN, M.J. Mapping a gene involved in regulating dietary cholesterol absorption. The sitosterolemia locus is found at chromosome 2p21. *Journal of Clinical Investigation*, v.102, n.5, p.1041–1044, 1998.

PEREIRA, A.C.; GAGLIARDI, A.C.M.; LOTTENBERG, A.M.; CHACRA, A.P.M.; FALUDI, A.A.; SPOSITO, A.C.; CASELLA-FILHO, A.; ARAÚJO, D.B.; CESENA, F.H.Y.; et al. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.99, n.2, p.1-44, 2012.

PÉREZ DE ISLA, L.; ALONSO, R.; MATA, N.; SAFEHEART Investigators, et al. Coronary & heart disease, peripheral arterial disease, and stroke in familial hypercholesterolaemia: insights from the SAFEHEART registry (Spanish familial hypercholesterolaemia Cohort Study). *Arteriosclerosis Thrombosis of Vascular Biology*, v. 36, p.2004–2016, 2016.

PIEK, A.; DUA, W.; BOERA, R.A.; SILLJ, H.H.W. Novel heart failure biomarkers: why do we fail to exploit their potential? *Critical Reviews In Clinical Laboratory Sciences*, v.55, n.4, 246–263, 2018.

PRASONGSUKARN K.; DECHKHAJORN, W.; BENJATHUMMARAK, S.; MANEERAT, Y. TRPM2, PDLIM5, BCL3, CD14, GBA genes as feasible markers for premature coronary heart disease risk. *Frontiers in Genetics*, v.12, 598296, p.1 – 14, 2021.

PUGIN, J.; SCHÜRER-MALY, C.C.; LETURCQ, D.; MORIARTY, A.; ULEVITCH, R.J.; TOBIAS, P.S. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, v.90, p.2744–2748, 1993.

RAAL, F.J.; ROSENSON, R.S.; REESKAMP, L.F.; et al. Evinacumab for Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *New England Journal of Medicine*, v.383, n.8, p.711-720, 2020.

REINER, A.P.; LANGE, E.M.; JENNY, N.S.; CHAVES, P.H.M.; ELLIS, J.; LI, J.; WALSTON, J.; LANGE, L.A.; CUSHMAN, M.; TRACY, R.P. Soluble CD14: genome-wide association analysis and relationship to cardiovascular risk and mortality in the older adults. *Arteriosclerosis Thrombosis of Vascular Biology*, v.33, n.1, p. 1-18, 2013.

RIBEIRO, A.L.; DUNCAN, B.B.; BRANT, L.C.C.; LOTUFO, P.A.; MILL, J.G.; BARRETO, S.M. Cardiovascular health in Brazil: trends and perspectives. *Circulation*, v.133, n.4, p.422-33, 2016.

RICARD, N.; BAILLY, S.; GUIGNABERT, C.; SIMONS, M. The Quiescent Endothelium: Signalling Pathways Regulating Organ-specific Endothelial Normalcy. *Nature Reviews Cardiology*, v.18, p. 565–580, 2021.

RICHARDS, S.; AZIZ, N.; BALE, S.; BICK, D.; DAS, S.; GASTIER-FOSTER, J.; GRODY, W.W.; HEGDE, M.; LYON, E.; SPECTOR, E.; VOELKERDING, K.; REHM, H.L.; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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. *Genetics in Medicine*, v. 17, n.5, p. 405 - 424, 2015.

ROBINSON, J.G.; FARNIER, M.; KREMPF, M; BERGERON, J.; LUC, G.; AVERNA, M.; STROES, E.S.; LANGSLET, G.; RAAL, F.J.; SHAHAWY, M.E.;KOREN, M.J.; LEPOR, N.E. et al. of the ODISSEY LONG TERM Investigators. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *New England Journal of Medicine*, v.372, n.16, p. 1489-99, 2015.

ROCHA, V.Z.; SANTOS, R.D. Past, Present, and Future of Familial Hypercholesterolemia Management. *Methodist Debakey Cardiovascular Journal*, v.17, n.4, p. 28-35, 2021.

RODRIGUEZ-CALVO, R.; MASANA, L. Review of the scientific evolution of gene therapy for the treatment of homozygous familial hypercholesterolaemia: past, present and future perspectives. *Journal of Medical Genetics*, v.56, n.11, p.711-717, 2019.

ROSENSON, R.S.; BURGESS, L.J.; EBENBICHER, C.F.; BAUM, S.J.; STROES, E.S.G.; ALI, S.; KHILLA, N.; HAMLIN, R.; PORDY, R.; DOMG, Y.; SON, V.; GAUDET, D. Evinacumab in patients with refractory hypercholesterolemia. *New England Journal of Medicine*, v.383, p.2307-2319, 2020.

ROUMELIOTIS, S.; MALLAMACI, F.; ZOCCALI, C. Endothelial Dysfunction in Chronic Kidney Disease, from Biology Clinical Outcomes: A 2020 Update. *Journal of Clinical Medicine*, v.9, n.8, p.1-27, 2020.

RUSSELL, D.W.; YAMAMOTO, T.; SCHNEIDER, W.J.; SLAUGHTER, C.J.; BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. c-DNA cloning of the bovine low density lipoprotein receptor: feedback regulation of a receptor mRNA. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, v.80, n.24, p.7501–7505, 1983.

SABATINE, M.S.; GIULIANO, R.P.; WIVIOTT, S.D.; RAAL, F.J.; BLOM, D. J.; ROBINSON, J.; BALLANTY, N.E.; SOMARANTE, R.; LEGG, J.; WASSERMAN, S; SCOTT, R.; KOREN, M.J. et al. of Open-Label Study of Long-Term Evaluation against LDL-Cholesterol 84 (OSLER) Investigators. Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *New England Journal of Medicine*, v.372, n.16, p. 1500-1509, 2015.

SALAZAR, L.; HIRATA M.; CAVALLI, S.; NAKANDAKARE, E.; FORTI, N.; DIAMENT, J.; GIANNINI, S.; BERTOLAMI M.; HIRATA, R. Molecular basis of familial hypercholesterolemia in Brazil: identification of seven novel LDLR gene mutations. *Human Mutation*, v.19, p. 462–463, 2002.

SALVAGNO, G.L.; PAVAN, C. Prognostic biomarkers in acute coronary syndrome. *Annals of Translational Medicine*, v.4, n.13, p.1-8, 2016.

SANDBERG, W.J.; HALVORSEN, B.; YNDESTAD, A.; SMITH, C.; OTTERDAL, K.; BROSSTAD, F.R.; FROLAND, S.S.; OLOFSSON, P.S.; DAMÅS, J.K.; GULLESTAD, L.; HANSSON, G.K.; OIE, E.; AUKRUST, P. Inflammatory interaction between LIGHT and proteinase-activated receptor-2 in endothelial cells: potential role in atherogenesis. *Circulation Research*, v.104, p.60–68, 2009.

SANTOS, R.D.; GIDDING, S.S.; HEGELE, R.A.; CUCHEL, M.A.; BARTER, P.J.; WATTS, G.F.; BAUM, S.J.; CATAPANO, A.L.; CHAPMAN, M.J.; DEFESCHE, J.C.; et al. International Atherosclerosis Society Severe Familial Hypercholesterolemia Panel. Defining severe familial hypercholesterolaemia and the implications for clinical management: a consensus statement from the International Atherosclerosis Society Severe Familial Hypercholesterolemia Panel. *Lancet Diabetes Endocrinology*, v.4, p.850–861, 2016.

SANTOS, R.D. Phenotype vs. genotype in severe familial hypercholesterolemia. *Current Opinion Lipidology*, v.28, p.130–135, 2017.

SANTOS, R.D. Screening and management of familial hypercholesterolemia. *Current Opinion of Cardiology*, v.34, p.526–530, 2019.

SBC - SOCIEDADE BRASIELIRA DE CARDIOLOGIA- Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 99, n.2, p.1-44,2012.

SBC - SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA- Departamento de aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia - Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.109, n.2, p.1-62, 2017.

SCHIRO, A.; WILKINSON, F.; WESTON, R.; SMYTH, J.V.; SERRACINO-INGLOTT, F.; ALEXANDER, M.Y. Endothelial microparticles as conveyors of information in atherosclerotic disease. *Atherosclerosis*, v.234, p. 295-302, 2014.

SCHULZ, R.; SCHLÜTER, K. D. PCSK9 targets important for lipid metabolism. *Clinical Research in Cardiology Supplements*, v.12, p.: 2–11, 2017.

SCICALI, R.; DI PINO, A.; PLATANIA, R.; PURRAZZO, G.; FERRARA, V.; GIANNONE, A.; URBANO, F.; FILIPPELLO, A.; RAPISARDA, V.; FARRUGGIA, E.; PIRO, S.; RABUAZZO, A.M.; PURRELLO, F. Detecting familial hypercholesterolemia by serum lipid profile screening in a hospital setting: Clinical, genetic and atherosclerotic burden profile. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, v.28, p.35-43, 2018.

SEIDAH, N.G.; BENJANNET, S.; WICKHAM, L.; MARCINKIEWICZ, J.; JASMIN, S.B.; STIFANI, S.; BASAK, A.; PRAT, A.; CHRÉTIENET, M. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver

regeneration and neuronal differentiation. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America*, v.100, p.928-933, 2003.

SHEIKINE Y.; SIRSIJO A..CXCL16/SR-PSOX—A friend or a foe in atherosclerosis? *Atherosclerosis*,v. 197, p. 487- 495, 2008.

SHIMAOKA, T.; KUME, N.; MINAMI, M.; HAYASHIDA, K.; KATAOKA, H.; KITA, T.; YONEHARA, S. Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, 40663-40666, 2000.

SHIOI, A.; MORIOKA, T.; SHOJI, T.; EMOTO M. The Inhibitory Roles of Vitamin K in Progression of Vascular Calcification. *Nutrients*, v.12, n.583, p. 1-13, 2020.

SHITOLE, S.G.; BIGGS, M.; REINER, A.P.; MUKAMA, K.J.; DIOUSSÉ, L.; IX, J.H.; BARZILAY, J.I.; TRACY, R.P.; SISCOVICK, D.; KIZER, J.R. Soluble CD14 and CD14 Variants, Other Inflammatory Markers, and Glucose Dysregulation in Older Adults: The Cardiovascular Health Study. *Diabetes Care*, v.42, p.2075–2082, 2019.

SIEGEL, P.M.; SCHMICH, J.; BARINOV, G.; BOJTI I.; VEDECNIK, C.; SIMANJUNTAK, N.R.; BODE, C.; MOSER, M.; PETER, K.; DIEHL, P. Cardiomyocyte microvesicles: proinflammatory mediators after myocardial ischemia. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, v.50, p.533-542, 2020.

SILVA, P.R.S.; JANNES, C.E.; MARSIGLIA, J.D.C.; KRIEGER, J.E.; SANTOS, R.D.; PEREIRA A.C. Predictors of cardiovascular events after one year of molecular screening for Familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, v.250, p.144-150, 2016.

STEIN, E.A.; RAAL, F.J. New Terapies for Reducing Low-Density Lipoprotein Cholesterol. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, v.43, p.1007-1033, 2014.

STEPIEN, A.; KOZIARSKA-ROSCISZEWSKA, M.; RYSZ, J.; STEPIEN, M. Biological Role of Vitamin K- With Particular Emphasis on Cardiovascular and Renal Aspects. *Nutrients*, v. 14, n.262, p.1-17, 2022.

STURM, A.C; KNOWLES, J.W.; GIDDING, S.S; AHMAD Z.S.; AHMED, C.D.; BALLANTYNE, C.M.; BAUM, S.J.; BOURBON M.; CARRIÉ A.; CUCHEL, M.; FERRANTI S.D.; DEFESCHE, J.C.; FREIBERGER, T.; HERSHBERGER, R.E.; et al. Convened by the Familial Hypercholesterolemia Foundation. Clinical Genetic Testing for Familial Hypercholesterolemia: JACC Scientific Expert Panel. *Journal of American College Cardiology*, v.72, n.6, p.662-680, 2018.

SU, G.L.; DORKO, K.; STROM, S.C.; NÜSSLER, A.K.; WANG, S.C. CD14 expression and production by human hepatocytes. *Journal of Hepatology*, v.31, p.435-442, 1999.

SZATANEK, R.; BAJ-KRZYWORZEKA, M.; ZIMOCZ, J.; LEKKA, M.; SIEDLAR, M.; BARAN, J. The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, v.18, n.6, 2017.

TADA, H.; KAWASHIRI, M.; YOSHIDA, T.; TERAMOTO, R.; NOHARA, A.; KONNO, T.; INAZU, A.; MABUCHI, H.; YAMAGISHI, M.; HAYASHI, K. Lipoprotein(a) in familial hypercholesterolemia with proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) gain-of-function mutations. *Circulation Journal*, v. 80, p.512–51, 2016.

TAN M.; KORKMAZ H.; AYDIN H.; KUMBUL D.D. FABP4 levels in hypothyroidism and its relationship with subclinical atherosclerosis. *Turkish Journal of Medical Science*, v.49,p.1490-1497, 2019.

TANAKA, T.; BIANCOTTO, A.; MOADDEL, R.; MOORE, A.Z.; GONZALEZ-FREIRE, M.; AON, M.A.; CANDIA, J.; ZHANG, P.; CHEUNG, F.; FANTONI, G.; SEMBA, R.D.; FERRUCCI, L. Plasma proteomic signature of age in healthy humans. *Aging Cell*, v.17, n.5, e12799, p.1-13, 2018.

TSUKAHARA, R.; HANIU, H.; MATSUDA, Y.; TSUKAHARA, T. Heart-type fatty-acid-binding protein (FABP3) is a lysophosphatidic acid-binding protein in human coronary artery endothelial cells. *FEBS Open Bio*, v.4, p. 947-951, 2014.

TURGEON, R.D.; BARRY, A.R.; PEARSON, G.J. Familial hypercholesterolemia. Review of diagnosis, screening and treatment. *Clinical Review*, v.62, p.:32-37, 2016.

TZIKAS, S.; VASSILIKOS, V.; KELLER T. GDF-15 as a risk stratification biomarker for cardiovascular disease. *International Journal of Cardiology*, v.292, p. 246-247, 2019.

URBAN, D.; PÖS, J.; BÖHM, M.; LAUFS, U. Targeting the Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 for the treatment of dyslipidemia and atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 62, n.16, p.1401-1408, 2013.

VALLEJO-VAZ, A.J.; DE MARCO M.; STEVENS, C.A.T.; AKRAM, A.; FREIBERG, T.; HOVINGH, G.K.; KASTELEIN, J.J.P.; MATA, P.; RAAL, F.J.; SANTOS, R.D.; SORAN, H.; WATTS, G.F.; ABIFADEL, M.; AGUILAR-SALINAS, C.A.; AL-KHNIFSAWI, M.; ALKINDI, F.A.; ALNOURI, F.; et al. Overview of the current status of familial hypercholesterolemia care in over 60 countries - the EAS Familial Hypercholesterolemia Studies Collaboration (FHSC). *Atherosclerosis*, v.277, p.234-255, 2018.

VAN DEN HEUVEL, E.G.H.M.; VAN SCHOOR, N.M.; LIPS, P.; MAGDELEYNS, E.J.P.; DEEGA D.J.H.; VERMEER C.; HEIJER, M. Circulating uncarboxylated matrix Gla protein, a marker of vitamin K status, as a risk factor of cardiovascular disease. *Maturitas*, v.77, p.137-141, 2014.

VAN DER HOEK, Y.Y.; LINGENHEL, A.; KRAFT, H.G.; DEFESCHE, J.C.; KASTELEIN, J.J.; UTERMANN, G. Sib-pair analysis detects elevated Lp(a) levels and large variation of Lp(a) concentration in subjects with familial defective ApoB. *Journal Clinical Investigation*, v. 99, p.2269–2273, 1997.

VARON, D.; SHAI, E. Platelets and their microparticles as key players in pathophysiological responses. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v.13, n.1, p.40–46, 2015.

VERSMISSEN, J.; OOSTERVEER, D.M.; YAZDANPANA, M.; DEFESCHE, J.C.; BASART, D.C.G.; LIEM, A.H.; HEERINGA, J.; WITTEMAN, J.C.; LANSBERG, P.J.; KASTELEIN, J.J.P.; SIJBRANDS, E.J.G. Efficacy of statins in familial hypercholesterolemia: a long-term cohort. *BMJ*, v.337, a2423, p. 1-6, 2008.

VILLA, G.; WONG, B.; KUTIKOVA, L.; RAY, K.K.; MATA, P.; BRUCKERT, E. Prediction of cardiovascular risk in patients with familial hypercholesterolaemia. *European Heart Journal – Quality of Care and Clinical Outcomes*, v.3, p.274–280, 2017.

VOUKALIS C.; SHANTSILA, E.; LIP, G.Y.H. Microparticles and cardiovascular diseases. *Annals of Medicine*, v.51, p.193–223, 2019.

VRABLIK, M.; TICHÝ, L.; FREIBERGER, T.; BLAHA, V.; SATNY, M.; HUBACEK, J.A. Genetics of Familial Hypercholesterolemia: New Insights. *Frontiers in Genetics*, v.11, p.1-10, 2020.

VUORIO, A.; WATTS, G.F.; SCHNEIDER, W.J.; TSIMIKAS, S.; KOVANEN, P.T. Familial hypercholesterolemia and elevated lipoprotein (a): double heritable risk and new therapeutic opportunities. *Journal of Internal Medicine*, v. 287, p.2–18, 2020.

WAGNER K.T.; RADISIC, M. A New Role for Extracellular Vesicles in Cardiac Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Advanced Nanobiomed Research*, v.1, n.11, p. 1-45, 2021.

WARE, C.F. Targeting the light-hvem pathway. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.647, p.146–155, 2009.

WHITFIELD, A.J.; BARRET, P.H.; VAN BOCKXMEER, F.M.; BURNETT, J.R. Lipid disorders and mutations in the APOB gene. *Clinical Chemistry*, v.50, n.10, p. 1725- 32, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). An update on familial hypercholesterolaemia. Oslo; 1999

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The top 10 causes of death. Geneva; 2016.

WIGGINS, S.W.; SENFIELD, J.; KASSAHUN, H.; LIRA, A.; SOMARATNE, R. Evolocumab: Considerations for the Management of Hyperlipidemia. *Current Atherosclerosis Reports*, 2018.

WILLIAMS, R.R.; HUNT, S.C.; SCHUMACHER, M.C.; LEPPERT, M.F.; LUDWIG, E.H.; HOPKINS, P.N. Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *American Journal of Cardiology*, v.72, n.2, p.171-6, 1993.

WUTTGE, D.M.; ZHOU, X.; SHEIKINE, Y.; WAGSATER, D.; STEMME, V.; HEDIN, U.; STEMME, S.; HANSSON, G.K.; SIRSSJO, A. CXCL16/SR-PSOX is an interferon-gamma-regulated chemokine and scavenger receptor expressed in atherosclerotic lesions. *Artherosclerosis Thrombosis of Vascular Biology*, v. 24, p.750–755, 2004.

XIAO, Q.; HE, Q.; ZENG, J.; XIA, X. GDF-15, a future therapeutic target of glucolipid metabolic disorders and cardiovascular disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v.146, n.112582, p. 1-13, 2022.

XING, J.; LIU, Y.; CHEN, T. Correlations of chemokine CXCL16 and TNF- α with coronary atherosclerotic heart disease. *Experimental and Therapeutic Medicine*, v.15, p. 773-776, 2018.

YEUNG, D.C. ; XU, A. ; CHEUNG, C.W., WAT, N.M.S. ; YAU, M.H. ; FONG, C.H.Y. ; CHAU, M.T. ; LAM, K.S.L. Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels were independently associated with carotid atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis of Vascular Biology*, v.27, n.8, p.1796–802, 2007.

YONG, P.J.A.; KOH, C.H.; WINSTON, S.N.; SHIM, E. Endothelial microparticles: missing link in endothelial dysfunction? *European Journal of Preventive Cardiology*, v.20, n.3, p. 496–512, 2012.

YUAN, X.; GU, Y.; LAI, X.; GU, Q. LIGHT is increased in patients with coronary disease and regulates inflammatory response and lipid metabolism in oxLDL-induced THP-1 macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.490, n.3, p.732-738, 2017.

YUSUF, S.; HAWKEN, S.; OUNPUU, S.; DANS, T.; AVEZUM, A.; LANAS, F.; MCQUEEN, M.; BUDAJ, A.; PAIS, P.; VARIGOS, J.; LISHENG, L. INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (Interheart Study): case control study. *Lancet*, v.364, n.9438, p.937-952, 2004.

ZABOROWSKI, M.P.; BALAJ, L.; BREAKFIELD, X.O.; LAI, C.P. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience*, v. 65, n. 8, p. 783–797, 2015.

ZERNECKE, A.; SHAGDARSUREN, E.; WEBER, C. Chemokines in Atherosclerosis an Update. *Arteriosclerosis Thrombosis of Vascular Biology*, v.28, p.1897-1908, 2008.

ZHANG, Y.; KENT JR, J.W.; LEE, A.; CERJAK, D.; ALI, O.; DIASIO, R.; OLIVIER, M.; BLANGERO, J.; CARLESS, M.A.; KISSEBAH, A.H. Fatty acid binding protein 3 (fabp3) is associated with insulin, lipids and cardiovascular phenotypes of the metabolic syndrome through epigenetic modifications in a northern european family population. *BMC Medical Genomics*, v.6, n.9, p. 2-14, 2013.

ZHUANG, L.; MAO, Y.; LIU, Z.; LI, C.; JIN, Q.; LU, L.; TAO, R.; YAN, X.; CHEN, K. FABP3 Deficiency Exacerbates Metabolic Derangement in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure via PPAR α Pathway. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, v. 8,n.722908, p.1-18, 2021

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterização clínica e genética de casos-índices com HF e seus familiares, bem como a avaliação de novos marcadores de risco cardiovascular e micropartículas nesta população.

3.2 Objetivos específicos

- Seleção de pacientes (casos-índices) com HF de acordo com os critérios de Dutch;
- Captação de familiares dos casos-índice;
- Caracterização clínica e laboratorial (perfil lipídico) dos indivíduos selecionados;
- Caracterização genética dos indivíduos;
- Avaliação da relação entre as variantes genéticas e as características clínico-laboratoriais;
- Avaliação dos novos marcadores de risco cardiovascular GDF-15, CXCL16, FABP3, FABP4, LIGHT, sCD14 e ucMGP de acordo com a presença ou ausência de variantes genéticas;
- Avaliação de micropartículas de cardiomiócitos, células endoteliais, fator tissular e plaquetas de acordo com a presença ou ausência de variantes genéticas.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP-UFMG) (Projeto CAAE- 76387417.6.0000.5149) (Anexo I). Os participantes selecionados tiveram o esclarecimento sobre a pesquisa e os que estavam de acordo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B). Os TCLEs dos menores de 18 anos foram assinados pelos pais ou responsáveis legais que responderam também a um questionário clínico com perguntas de interesse da pesquisa.

4.2 Caracterização do estudo

Trata-se de um estudo transversal observacional para caracterização clínica e molecular de carreadores de variantes genéticas relacionadas à HF e avaliação de marcadores de DCV nesses pacientes, em comparação com grupo controle selecionado com familiares não carreadores das variantes genéticas relacionadas à HF.

4.3 Tamanho amostral

Este estudo foi dividido em 3 etapas a seguir: caracterização molecular, avaliação de novos marcadores cardiovasculares, avaliação de micropartículas; sendo que, em cada uma delas, foram selecionados diferentes grupos à medida

que as avaliações foram realizadas. Todos os participantes foram selecionados pelo programa Hipercol Brasil Itinerante do Instituto do Coração (InCor), onde os CI apresentavam valores de LDLc ≥ 210 mg/dL para adultos e ≥ 190 mg/dL para crianças; ou pela busca ativa por CI a partir de resultados de perfil lipídico de laboratórios de análises clínicas, utilizando os mesmos critérios. Após a identificação das variantes genéticas dos CI, houve a convocação para a participação voluntária de familiares de 1º e 2º graus para rastreamento genético em cascata para análise genética e de biomarcadores. O total de participantes para cada etapa estão representadas de acordo com as **Figuras 4, 5 e 6**.

Figura 4 – Fluxograma da seleção dos participantes para caracterização molecular

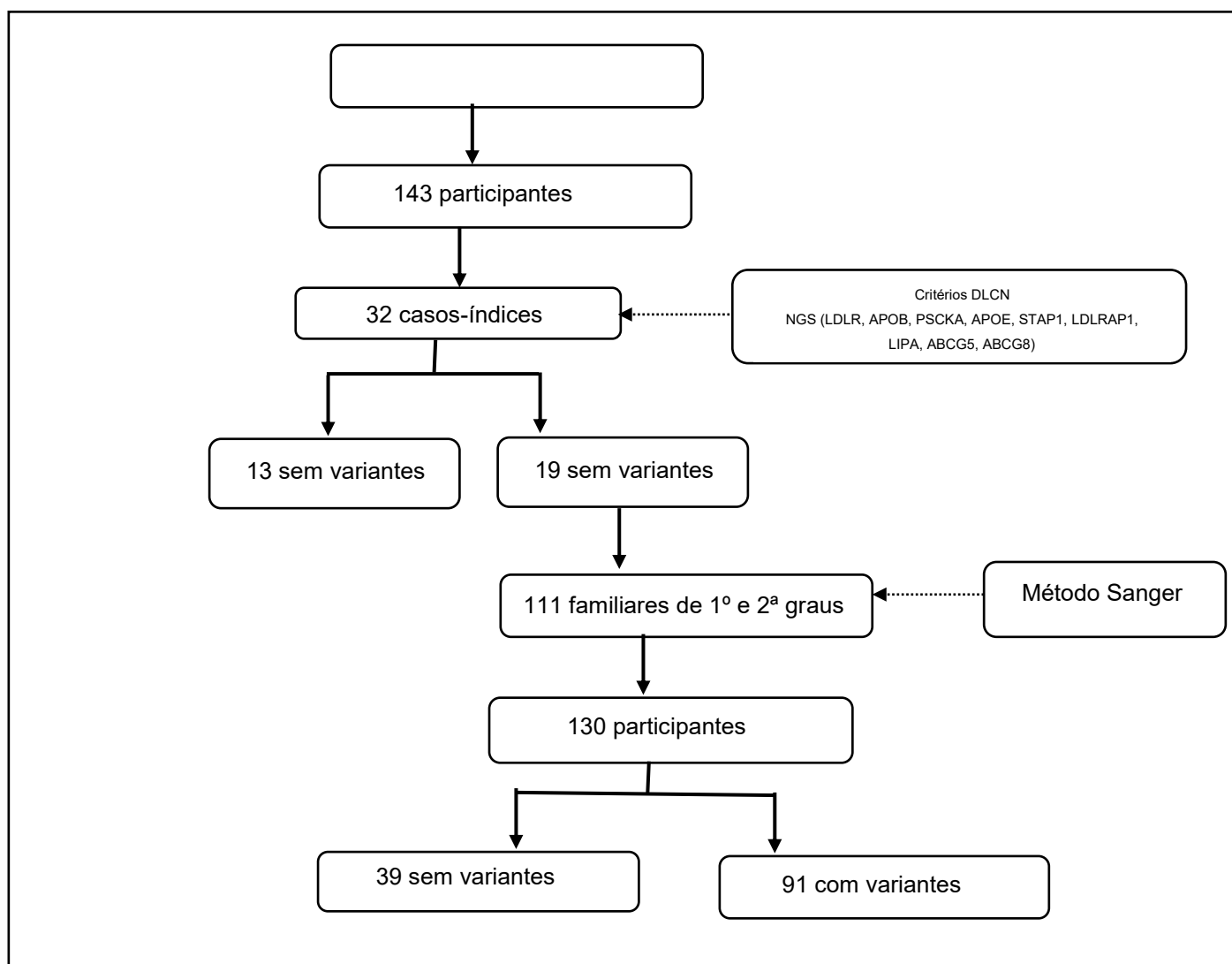


Figura 5 – Fluxograma da seleção dos participantes para avaliação dos novos marcadores cardiovasculares

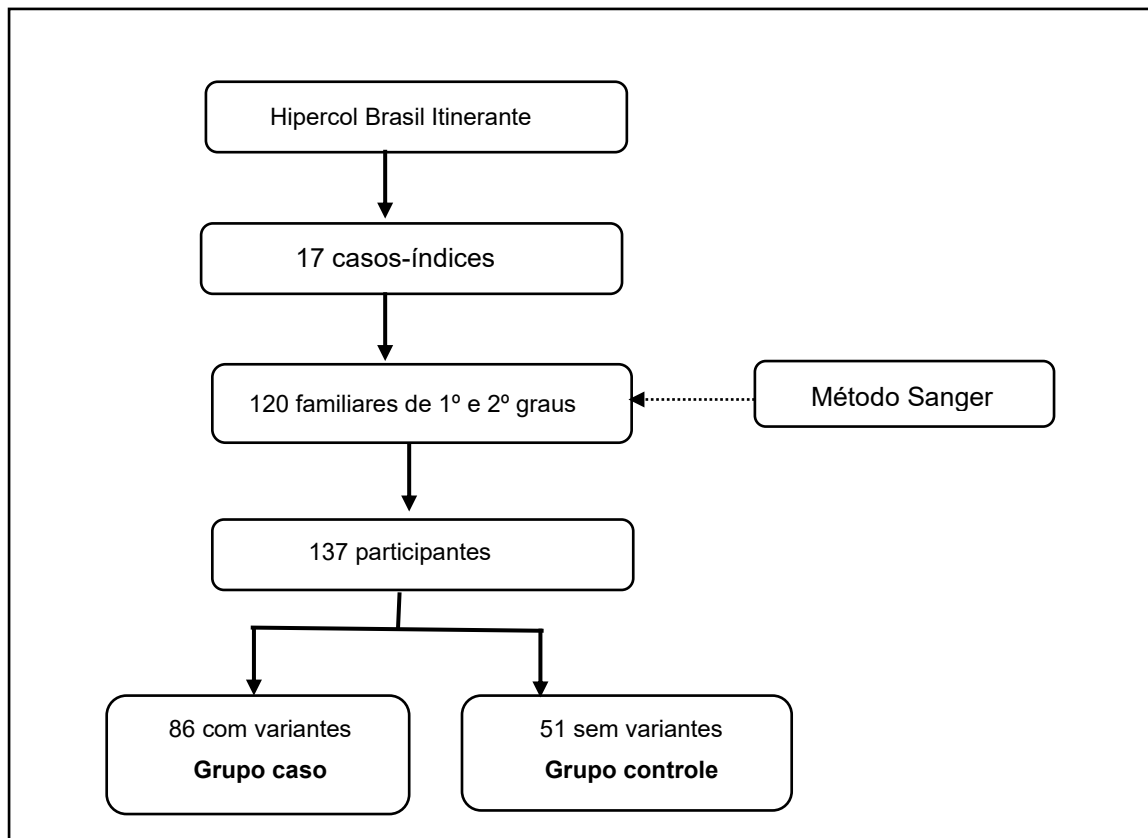
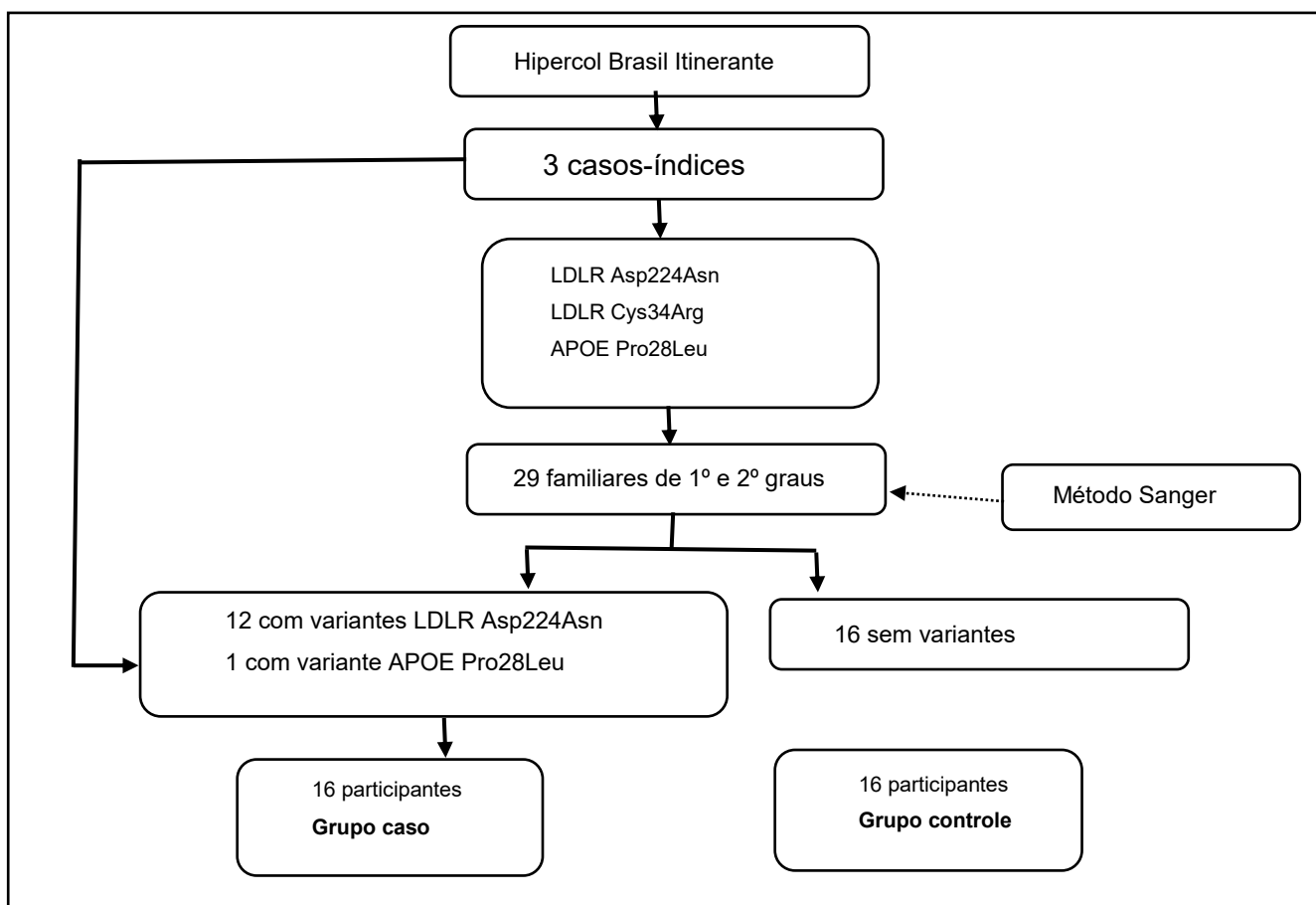


Figura 6 – Fluxograma da seleção dos participantes para avaliação das micropartículas



4.4 Critérios de inclusão

CI com suspeita clínica de HF e seus familiares, de qualquer faixa etária, de ambos os sexos, sendo permitido tratamento com redutores de colesterol (estatinas, ezetimiba ou ambas).

4.5 Critérios de não-inclusão

Doenças hepáticas, hematológicas (incluindo histórico de trombose venosa e TEP), doenças renais (RGF < 60 mL/min calculado por Cockcroft Gault), doenças inflamatórias (incluindo artrite reumatóide e doenças auto-imunes), diabetes mellitus descompensado (HbA1c > 7,0%), obesidade (IMC > 30 Kg/m² para adultos e Z score de IMC > +2 para crianças), doenças tireoideanas descompensadas (TSH ultrasensível > 5,33 UI/mL), triglicérides > 400 mg/dL, portadores de HIV. As informações necessárias para a exclusão foram obtidas por meio de exames de laboratório recentes na época da coleta de material para o estudo e as informações foram registradas em uma ficha clínica da pesquisa.

4.6 Coleta das amostras

O programa Hipercol Brasil Itinerante deu início ao processo de coleta do material para caracterização molecular dos participantes por meio de mutirão com busca ativa pelo sistema de atendimento público de saúde e por resultados alterados de LDLc nos laboratórios de análises clínicas. Todos os valores de LDLc foram reavaliados no InCor pelo método de dosagem direta e aqueles indivíduos com valores de LDLc ≥ 210 mg/dL nos adultos e ≥ 190 mg/dL foram genotipados. O restante que não revelou o valor de corte de LDLc foram excluídos.

Para a coleta de material para avaliação dos marcadores cardiovasculares e micropartículas, foram agendados em datas específicas em meses subsequentes (Agosto, Setembro, Outubro e Novembro/2021) a medida que os participantes eram avaliados clinicamente. Na data marcada, os participantes se dirigiam ao laboratório, ou o laboratório se dirigia ao participante (os que moravam em zona rural) e o material era coletado e processado. No mesmo dia, esse material era levado em condições de refrigeração adequada para serem trazidos para o armazenamento a -80°C na Faculdade de Medicina da UFMG.

Para a obtenção do DNA, foi coletada amostra deswab bucal usando Oragene® OG-500 DNA Genotek dos CI, ou sangue total coletado em Whatman® FTA® card (Sigma-Aldrich) dos parentes de 1º e 2º graus para a análise em cascata.

As amostras de sangue para avaliação de lipoproteína(a) e dos marcadores de risco cardiovascular, foram obtidas por meio de parcerias com laboratórios das cidades de Bom Despacho (Laboratório Márcio Jardim) e Moema (Laboratório Moema) para facilitar o acesso dos participantes à coleta. Foi coletado sangue venoso (sem anticoagulante – 1 tubo; em EDTA – 1 tubo e em Citrato de Sódio – 1 tubo) após jejum de 12 horas, em tubos de Sistema Vacutainer® (Becton-Dickinson). A ordem da coleta seguiu a recomendação do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) a fim de eliminar possíveis interferências. As amostras foram centrifugadas a 1.500 RPM por 15 minutos. O soro e o plasma foram estocados a - 80°C para posterior análise. O tubo de plasma em Citrato de sódio foi centrifugado a 3.000 rotações por minuto (RPM) por 15 minutos, dois terços superiores do sobrenadante foram transferidos para tubo de ensaio e uma nova centrifugação foi realizada a 3.000 RPM por mais 15 minutos para que 2/3 do plasma sobrenadante, pobre em plaquetas, fosse utilizado para avaliação das micropartículas.

4.7 Delineamento experimental

Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Teste genético para detecção de variantes genéticas nos genes *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *APOE*, *STAP1*, *PDLRAP1*, *LIPA*, *ABCG5* e *ABCG8*.
- Dosagem da lipoproteína (a) para avaliação de perfil lipídico não convencional.
- Dosagem dos novos marcadores GDF-15, CXCL16, FABP3, FABP4, LIGHT, sCD14 e ucMGP para avaliação de risco cardiovascular.
- Quantificação de micropartículas oriundas de cardiomiócitos, células endoteliais, plaquetas e fator tissular.

4.7.1 Teste genético

4.7.1.1 Extração de DNA

A extração de DNA genômico a partir da saliva foi realizada usando o kit comercial prepIT-L2P (DNA Genotek®), conforme descrito pelo fabricante. A extração de DNA genômico a partir do sangue total seco foi realizada usando o kit de extração comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN®) de acordo com o fabricante. A quantificação da amostra foi utilizada em espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 e, para verificação de sua integridade, foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% (exceto para amostras de mancha de sangue seco). Todas as amostras de DNA foram armazenadas a -80°C até a análise. Esta etapa, bem como o sequenciamento do DNA descrito a seguir, foi realizado no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração de São Paulo (INCOR), Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, sob a coordenação da Dra Cinthia Elim Jannes.

4.7.1.2 Sequenciamento do DNA

O sequenciamento do DNA foi realizado por técnica de NGS (*next generation sequencing*), com biblioteca preparada de acordo com as recomendações do fabricante. Esta preparação consiste na captura e enriquecimento de regiões-alvo por Sure Select QXT (Agilent Technologies), incluído neste kit um conjunto de reagentes de sequenciamento e um conjunto de sondas de captura

personalizadas para os genes a serem analisados: *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *LIPA*, *STAP1*, *APOE*, *ABCG5* e *ABCG8*. A análise foi realizada na plataforma Illumina MiSeq Platform com uma extremidade emparelhada de 150 pb. As leituras de extremidade emparelhada de sequenciamento foram mapeadas para a referência do genoma NCBI Build (hg19) usando software CLC Genomics Workbench 9.0 (QIAGEN®). Os critérios mínimos de detecção para chamadas de variantes foram cobertura de 10x e qualidade de Phred \geq Q30. MLPA (*Multiplex Lobe Depend Probe Amplification*) no gene *LDLR* foi usado para rastrear variantes de número de cópias (CNVs) em CI sem nenhuma mutação do tipo *missense*, *nonsense* ou *frameshift* identificada no NGS.

O sequenciamento dos familiares, após caracterização da variante genética do CI, foi realizado pelo método de Sanger. Para isto, reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas usando *primers* projetados pelo software Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer304.0/>). Os fragmentos amplificados foram sequenciados usando o kit de sequenciamento BigDye 3.1 (Applied Biosystems) em um sequenciador ABI 3500 automatizado (Applied Biosystems).

As variantes encontradas foram classificadas de acordo com as diretrizes do *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG). Foram utilizados os programas *Mutation Taster*, *Provean*, *SIFT* e *PolyPhen-2* para predição de efeitos funcionais. Os dados de frequência dos bancos de dados Kaviar (KnownVARiants), ABraOM (Online Archive of Brazilian Mutations) e gnomAD (Genome Aggregation Database) foram utilizados para comparação. As variantes encontradas também foram pesquisadas em bancos de dados da literatura médica, como ClinVAR (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), LOVD (<https://databases.lovd.nl/>) e PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

4.7.2 Lipoproteína(a) e LDLc

A quantificação da Lp(a) foi realizada no soro utilizando o conjunto diagnóstico Atellica CH® cujo princípio analítico é o método de turbidimetria. O ensaio foi realizado pelo Laboratório Márcio Jardim, localizado em Bom Despacho, em

parceria com o Laboratório Hermes Pardini, localizado em Belo Horizonte, utilizando-se o analisador Atellica Siemens Healthineers ®.

Os valores LDLc, obtidos dos prontuários, foram avaliados em condições basais dos pacientes, ou seja, sem tratamento. No entanto, nos pacientes que estavam recebendo tratamento hipolipemiante, foi estimado o LDLc basal usando fatores de conversão relatados na literatura conforme Foody et al. (2013)¹ e Ballantyne et al. (2014)², seguindo as seguintes formulações de acordo com os tratamentos em uso pelos participantes :

Uso de Sinvastatina 20 mg: LDLc basal = LDLc medido ÷ 0,64

Sinvastatina 40 mg: LDLc basal = LDLc medido ÷ 0,59

Sinvastatina 20 mg + Ezetimiba 10 mg: LDLc basal = LDLc medido ÷ 0,48

Sinvastatina 40 mg + Ezetimiba 10 mg: LDLc basal = LDLc medido ÷ 0,44

Atorvastatina 20 mg: LDLc basal = LDLc medido ÷ 0,56

Atorvastatina 40 mg: LDLc basal = LDLc medido ÷ 0,51

Atorvastatina 80 mg: LDLc basal = LDLc medido ÷ 0,45

Atorvastatina 20 mg + Ezetimiba 10 mg: LDLc basal = LDLc medido ÷ 0,46

Atorvastatina 40 mg + Ezetimiba 10 mg: LDLc basal = LDLc medido ÷ 0,44

Atorvastatina 80 mg + Ezetimiba 10 mg: LDLc basal = LDLc medido ÷ 0,39

Rosuvastatina 10 mg: LDLc basal = LDLc medido ÷ 0,67

Rosuvastatina 20 mg: LDLc basal = LDLc medido ÷ 0,52

Rosuvastatina 40 mg: LDLc basal = LDLc medido ÷ 0,40

Rosuvastatina 20 mg + Ezetimiba 10 mg: LDLc basal = LDLc medido ÷ 0,36

Rosuvastatina 40 mg + Ezetimiba 10 mg: LDLc basal = LDLc medido ÷ 0,30

¹FOODY, J.M.; TOTH, P.P.; TOMASSINI, J.E.; SAJJAN, S.; RAMEY, D.R.; NEFF, D.; TERSHAKOVEC, A.M.; HU, H.; TUNCELI, K. Changes in LDL-C levels and goal attainment associated with addition of ezetimibe to simvastatin, atorvastatin, or rosuvastatin compared with titrating statin monotherapy. *Vascular Health and Risk Management*, v.9, p.719–727,2013

²BALLANTYNE, C.M.; HOOGEVEEN, R.C.; RAYA, J.L.; CAIN, V.A.; PALMER, M.K.; KARLSON, B.W. GRAVITY Study Investigators. Efficacy, safety and effect on biomarkers related to cholesterol and lipoprotein metabolism of rosuvastatin 10 or 20 mg plus ezetimibe 10 mg vs. simvastatin 40 or 80 mg plus ezetimibe 10 mg in high risk patients: results of the GRAVITY randomized study. *Atherosclerosis*, v.232, p.86–93,2014

4.7.3 Dosagem dos novos marcadores de risco cardiovascular

A quantificação dos marcadores GDF-15, CXCL16, FABP3, FABP4, LIGHT, sCD14 e ucMGP foi realizada em amostras de plasma colhidas em EDTA, utilizando kit de ensaio multiplex para Luminex (MILLIPLEX®MAP Human Cardiovascular Disease, EMD Millipore®), em um equipamento MAGPIX® Multiplexing System (Millipore Sigma®) seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, a tecnologia baseia-se na utilização de microesferas de poliestireno que são carregadas com fluorocromos. Usando-se uma proporção precisa de fluorocromos, até 100 esferas diferentes podem ser geradas de modo que cada uma contenha uma assinatura codificada por cores exclusivas. Cada placa é executada com 3 níveis de QCs (baixo, médio e alto) para cada analito.

4.7.4 Análise das micropartículas por citometria de fluxo

As amostras de plasma pobre plaquetas (PPP) foram descongeladas a 37°C e centrifugadas a 13.000 x g por 3 min. O sobrenadante foi aspirado e diluído 1:3 em solução salina tamponada com citrato fosfato (PBS) contendo heparina. A amostra diluída foi centrifugada a 15.000 x g por 90 min a 15°C. O pellet de MPs foi então ressuspenso em tampão de ligação 10^xanexina V Thermo Fisher Scientific® (San Diego, EUA). O procedimento experimental para o isolamento/purificação das MPs foi feito segundo Campos et al. (2010)³.

Dessa forma, os anticorpos e fluorocromos utilizados foram compreendidossem um painel conforme o objetivo de se proceder uma análise multiplex, realizando a análise das MPs em tubo único, incluindo o marcador geral para MPs, anexina V, capaz de se ligar à PS, conforme explicado anteriormente. O painel utilizado encontra-se na **Tabela 2**.

³ CAMPOS, F. M. F. et al. Augmented Plasma Microparticles During Acute Plasmodium Vivax Infection. *Malaria Journal*, v. 9, p. 327, nov. 2010.

Tabela 2 - Painel definido para análise multiplex de micropartículas por citometria de fluxo

Filtro	530/30	575/26	780/60	670/14	450/50
Anticorpo	CD51/61	Anti-CD142	Anti-CD41a	Anti-caveolina 3	Anexina V
Fluorocromo	FITC	PE	PE-Cy7	AlexaFluor 647	eFluor 450
Especificidade	endotélio	Fator tissular	plaqueta	cardiomiócito	fosfatidilserina

As análises foram realizadas no citômetro CytoFLEX (Beckman Coulter Life Sciences®) na plataforma de Citometria de Fluxo do Instituto René Rachou (IRR/FIOCRUZ-Minas) no mesmo dia da marcação dos fluorocromos. O citômetro foi programado para operar em uma configuração de alta taxa de fluxo, 60 segundos para cada amostra (50.000 eventos, cada). O número de MPs/ μ L de plasma foi calculado conforme descrito por Campos et al. (2010)³ sendo:

$$\text{MPs } (/ \mu\text{L}) = \frac{N \times 400}{60 \times 100}$$

Em que N é o número de eventos, 400 é o volume total do tubo antes da análise, 60 é o volume da amostra analisada e 100 é o volume original desuspensão de MPs utilizado para realizar o protocolo de fenotipagem.

Os *gates* de tamanho foram determinados com base na distribuição de dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) de microesferas (beads) de fluorescência verde de poliestireno de 0,1 μ m, 0,2 μ m, 0,5 μ m, 1,0 μ m e 2,0 μ m de diâmetros (Flow Cytometry Sub-micron Particle Size Reference Kit, ThermoFisherScientific®).

4.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando-se o programa R Platform versão 4.2.2. Foi aplicado o teste de *Shapiro-Wilk* para avaliar a distribuição de normalidade, onde nenhum assumiu distribuição normal. As variáveis

qualitativas foram descritas como frequências absolutas e relativas de suas categorias, e as variáveis quantitativas como medidas de tendência central (mediana) e variabilidade (intervalo interquartil -QI). A associação entre variáveis qualitativas foi testada por meio do teste qui-quadrado, com simulação de Monte Carlo quando necessário. A comparação de tendência central das variáveis quantitativas entre os grupos foi realizada por meio dos testes não-paramétricos de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Foram consideradas significativas as diferenças com valor de $p < 0,05$.

5 CAPÍTULO 1

Artigo publicado no periódico *Molecular Biology Reports*Molecular Biology Reports (2020) 47:9279–9288
https://doi.org/10.1007/s11033-020-06014-0

ORIGINAL ARTICLE

**Cascade screening and genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia in clusters of the Southeastern region from Brazil**Júnea Paolucci de Paiva Silvino¹ · Cinthia Elim Jannes² · Mauricio Teruo Tada² · Isabella Ramos Lima² · Iêda de Fátima Oliveira Silva² · Alexandre Costa Pereira² · Karina Braga Gomes^{1,3} Received: 14 September 2020 / Accepted: 16 November 2020 / Published online: 24 November 2020
© Springer Nature B.V. 2020**Abstract**

Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant genetic disease characterized by high levels of low-density lipoprotein-cholesterol (LDLc), associated to premature cardiovascular disease. The detection of the variants related to FH is important to improve the early diagnosis in probands / index-cases (ICs) and their relatives. We included ICs with FH and their relatives, living in a small region of Minas Gerais state-Brazil, which were classified according to Dutch Lipid Clinic Network Criteria (DLCNC) and submitted to sequencing of genes related to FH (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *LIPA*, *STAP1*, *APOE*, *ABCG5* e *ABCG8*). In a total of 143 subjects (32 ICs and 111 relatives), eight variants were identified in 91 individuals. From these variants, five were in *LDLR* [p.(Asp224Asn), p.(Ser854Gly), p.(Cys34Arg), p.(Asp601His), deletion of exon15 in *LDLR*], one in *APOB* [p.(Met499Val)], one in *PCSK9* [p.(Arg237Trp)] and one in *APOE* [p.(Pro28Leu)] genes. The variants were detected in 100% of those subjects classified as definitive, 87% as probable and 69% as possible FH cases based on DLCNC. The LDLc level was higher in individuals with corneal arch and xanthomas or xanthelasmas, as well as in pathogenic or probably pathogenic variants carriers. This study showed higher frequency of *LDLR* gene variants compared to other genes related to LDL metabolism in individuals with FH in Minas Gerais – Brazil and the presence of FH in relatives without previous diagnosis. Our data reinforce the importance of molecular and clinical evaluation of FH relatives in order to early diagnosis the FH, as well as cardiovascular diseases prevention.

Keywords Familial hypercholesterolemia · Genetic variants · LDL · Cardiovascular disease**Introduction**

Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant genetic disorder that affects low-density lipoprotein cholesterol (LDLc) metabolism. Most of the variants are in the LDL receptor (*LDLR*) gene [1], and less commonly in the Apolipoprotein B (*APOB*) [2] and the proprotein convertase subtilisin/Kexina 9 (*PCSK9*) genes, being the last one variants with gain-of-function [3]. The Apolipoprotein E (*APOE*) gene is also related to FH by modulating highly atherogenic lipoproteins, with the E3/E4 genotype being reported as the most frequent in individuals with hypercholesterolemia [4]. Almost 2100 variants in the *LDLR* gene have been described and can be divided into classes based on biochemical and functional studies of the variants, related to abnormal protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus, defective

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11033-020-06014-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Karina Braga Gomes
karinabg@ufmg.br

¹ Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

² Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração de São Paulo (INCOR), Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

³ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627 Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ligand connection or internalization/endocytosis of LDLc, and impaired LDLR recycling [5, 6].

Patients with genetic variants have elevated LDLc levels, which may result in an increased risk to develop atherosclerotic disease since childhood [7]. The diagnosis is based on the clinical criteria of Simon Broome Register (SBR), which is defined as FH probable or definitive, or Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) [8, 9], in which individuals are classified in scores from 3 to 8 points: the FH definitive are the ones who score > 8 points, probable between 6–8 points and possible between 3 and 5 points. DLCN criteria also include the assessment of signs such as tendon xanthomatosis and corneal arch; personal or family history in relatives of 1st and 2nd degrees of early atherosclerotic disease (men < 55 years and women < 60 years); and LDLc levels > 190 mg/dL (4.9 mmol/L) in adults and > 160 mg/dL (4.1 mmol/L) in children [9].

The prevalence of heterozygous FH is about 1:220 individuals based on large genetic studies [10, 11], while homozygous FH present a proportion of 1:300,000 individuals [10, 11]. In certain regions of the world, a higher heterozygous frequency of 1:80 individuals may occur, as in populations of South Africa [12], which has been related to founder effect and inbreeding [5, 13]. The overall FH prevalence per 1000 individuals in Brazil was estimated 1 in 263 [14].

Genetic testing is considered the gold standard for the diagnosis of FH. However, several variants remain unknown and their absence does not exclude the diagnosis, especially when there is strong phenotypic evidence, which can be explained by the accumulation of common alleles of small effect on the LDLc or due to the presence of variants in genes that until now have not been associated with FH [15]. In addition, there is wide phenotypic heterogeneity in FH, mainly associated with variants of null alleles, which are related to high levels of LDLc and higher cardiovascular risk [16].

Despite of the relatively frequent diagnosis of individuals with FH (index case – IC), the identification of affected relatives is important, since the disease is underdiagnosed. The cascade screening of affected family members contributes to the early diagnosis of FH, with identification of individuals at higher risk to develop atherosclerotic disease, leading to a 75% reduction of the death rates due to cardiovascular complications [17].

This study aimed to perform a cascade screening by molecular testing at *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *LIPA*, *STAP1*, *APOE*, *ABCG5* and *ABCG8* genes and to evaluate the DLCN criteria application for FH diagnosis in 143 individuals belonging to 31 family clusters living in southeastern region from Brazil.

Material and methods

Patients and samples

This observational study included 32 ICs, without age restriction, attended sequentially at the Medical Specialties Center (MSC), a public healthy reference for the micro-region in Bom Despacho city, in Minas Gerais state, a small region of 1,415.66 Km² in the southeastern from Brazil.

Patients sought the MSC from 2013 to 2019 for FH diagnosis and treatment, due to a previous laboratory test with high LDLc levels. After the FH molecular diagnosis of these patients, all available family members of 1st and 2nd degrees of those patients carrying genetic variants were requested for clinical and laboratory evaluation. The DLCN criteria was used for FH diagnosis, considering the scores: > 8 points – definitive; 6–8 points – probable; and 3–5 points – possible FH. Those with score < 3 were considered FH absent. All ICs presented LDLc levels \geq 210 mg/dL (adults) or \geq 190 mg/dL (children). The exclusion criteria were: triglycerides (TG) \geq 400 mg/dL (limitation of Friedewald formula used to estimate the LDLc levels), HIV positive, uncontrolled hypothyroidism, Cushing disease, cancer, and kidney or liver disease.

Blood samples were collected from all participants after 12 to 14 h of fasting, in a Vacutainer® tube without anticoagulant to quantify LDLc. To obtain the DNA, saliva was collected using Oragene® OG-500 DNA Genotek from the ICs, or whole blood collected on Whatman® FTA® card (Sigma-Aldrich) from relatives of 1st and 2nd degrees for cascade analysis.

Ethical aspects

All subjects participating in the study and/or their respective legal representatives were informed about the objectives and signed the Free and Informed Consent Form. The study was approved by the Ethics Committee of Federal University of Minas Gerais (CAAE- 76,387,417.6.0000.5149) and by the Ethics Committee of the University of São Paulo (CAPPesprotocol00594212.1001.0068). The project was carried out in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki.

Laboratory analysis

Determination of LDLc levels

The LDLc levels were obtained using the equation [LDLc = CT – HDLc – (TG/5)], being applied only when

TG < 400 mg/dL [18]. In patients who were receiving lipid-lowering treatment, the baseline of LDL was estimated using conversion factors as described in other studies [19, 20].

DNA extraction

The extraction of genomic DNA from saliva was performed using the commercial kit prepIT-L2P (DNA Genotek®), as described by the manufacturer. The extraction of genomic DNA from dried whole blood was performed according to the manufacturer. The quantification of the sample was performed in a NanoDrop™1000 spectrophotometer. In order to check its integrity, it was subjected to electrophoresis in 1% agarose gel (except for samples of dried blood spot). All DNA samples were stored at –20 °C until analysis.

DNA sequencing

DNA sequencing in ICs was performed using the Next-Generation Sequencing (NGS) technique, with a library prepared according to the manufacturer's recommendations. This preparation consists of the capture and enrichment of target regions by Sure Select QXT (Agilent Technologies®), included in this kit a set of sequencing reagents and a set of customized capture probes for the genes to be analyzed *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *LIPA*, *STAP1*, *APOE*, *ABCG5* and *ABCG8*. DNA sequencing was performed on the Illumina MiSeq® platform with 150 bp paired-end. The reads were mapped to the NCBI Build genome reference (hg19) using CLC Genomics Workbench 9.0 software (QIAGEN®). The minimum detection criteria for variant calls were 10× coverage and Phred quality ≥ Q30. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) in the *LDLR* gene was used to track copy number variants (CNVs) in ICs without any point variant identified in the NGS.

The sequencing of family members, after characterization of the genetic variant of the ICs, was performed using the Sanger method. For this, polymerase chain reaction (PCR) was performed using primers designed by the Primer3 software (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/0/>). The amplified fragments were sequenced using the Big Dye 3.1 sequencing Kit (Applied Biosystems®) in an automated ABI 3500 sequencer (Applied Biosystems®).

The variants found were classified according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) guidelines. The softwares Mutation Taster, Provean, SIFT and PolyPhen-2 were used to predict functional effects. Frequency data from the Kaviar (KnownVARIants), AbraOM (Archive of Brazilian Mutation) and gnomAD (Genome Aggregation Database) databases were used for comparison. The variants found were also searched in medical literature databases, such as ClinVAR (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), LOVD (<https://databases.lovd.nl>) and PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

Statistical analysis

Statistical analysis were performed using SPSS v.21 software. The *Shapiro–Wilk* test was applied to assess the distribution of normality. All continuous variables presented a non-parametric distribution, which were expressed as median (interquartile range). The *Mann–Whitney* test was used to compare two groups and the *Kruskal–Wallis* test was used to compare three groups. Categorical variables were compared using the χ^2 test or *Fisher's* test, when applicable. The correlation between variables was assessed using *Spearman's* test. Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

In this study, 143 subjects were evaluated, including 32 (22.4%) ICs and 111 (77.6%) relatives, distributed in 31 family clusters. Two ICs and their relatives were treated and evaluated independently, but later, in the study of the heretogram, it was observed that they had the same ancestry; therefore, they were included in the same cluster.

All ICs were submitted to genomic sequencing – 19 (59.4%) presented genetic variants in one of the nine genes evaluated, and 13 (40.6%) did not have the genetic variant identified. These 13 individuals presented median LDLc levels = 233 (28) mg/dL, TG levels = 119 (120) mg/dL, and three (23.1%) presented cardiovascular diseases (CVD) and only one (7.7%) presented xanthomas. According to DLCN criteria, five (38.5%) were classified as FH absent and 8 (62.5%) as FH possible. Because the genetic variant was not identified in these individuals, cascade screening was not performed on their family members. Consequently, the analysis was conducted only in ICs that presented genetic variants identified and their relatives.

The clinical and demographic characterization of this population is summarized in Table 1. Both groups were mainly composed by women, without CVD, but with a higher frequency of family history of CVD. Although all ICs had one identified variant, it was found in 70% of relatives. Low frequency of smoking, diabetes and systemic arterial hypertension were observed in both groups. Few individuals presented clinical signs of FH, characterized by the presence of corneal arch, xanthomas and xanthelasmas (Table 1).

According to the DLCN criteria, individuals were classified as follows: (1) absent – no IC and 22 relatives (19.8%); (2) possible – 6 ICs (31.6%) and 33 relatives (29.7%); (3) probable – 5 ICs (26.3%) and 41 relatives

Table 1 Clinical and demographic characterization of index cases and their relatives

Variables	ICs (n = 19)	Relatives (n = 111)
Age (years)	49 (25)	34 (33)
BMI (kg/m ²)	24.48(7)	22.59 (7)
LDLc (mg/dL)	243(40)	217 (129)
Sex		
Men	4 (21%)	47 (42%)
Women	15 (79%)	64 (58%)
CVD		
No	18 (95%)	106 (96%)
Yes	1 (5%)	4 (4%)
Family history of CVD		
No	7 (37%)	37 (33%)
Yes	12 (63%)	74 (67%)
Diabetes		
No	19 (100%)	102 (93%)
Yes	0 (0%)	7 (7%)
Hypertension		
No	15 (79%)	89 (82%)
Yes	4 (21%)	20 (18%)
Smoking		
No	17 (90%)	93 (85%)
Ex-smoker (minimum 2 years)	1 (5%)	10 (8%)
Smoker	1 (5%)	7 (7%)
Presence of variant		
Absent	0 (0%)	35 (33%)
Present	19 (100%)	72 (67%)
Lowering-lipid treatment		
No	3 (10%)	70 (63%)
Yes	17 (90%)	41 (37%)
Corneal arch		
No	15 (79%)	100 (90%)
Yes	4 (21%)	11 (10%)
Xanthomas/xanthelasmas		
No	16 (84%)	101 (91%)
Yes	3 (16%)	10 (9%)

Continuous variables expressed as median (interquartile range), categorical variables expressed as absolute number (frequency %)

IC index case, BMI Body mass index, LDLc low density lipoprotein-cholesterol, CVD cardiovascular disease

Missing data: 1 for CVD; 2 for diabetes; 2 for hypertension; 1 for smoking

(36.9%); and (4) definitive – 8 ICs (42.1%) and 15 relatives (13.6%). Among the 85 (65.3%) subjects classified as possible or probable FH by the DLCN criteria, 17 (20%) individuals did not carry genetic variants, while all individuals classified as definitive FH had genetic variants. Interestingly, among the 22 relatives classified as FH absent, 1 (4.5%) individual was a carrier of variant (p.Asp224Asn in *LDLR* gene). In the assessment of the presence of corneal

arch, 3(15.7%) ICs and 11 (9.9%) relatives presented this sign. For the presence of xanthomas/xanthelasmas, 3 (15.8%) IC and 10 (9.0%) relatives showed these signs. The frequencies of genetic variants, corneal arch and xanthomas/xanthelasmas according to the DLCN classification are presented in Fig. 1.

The LDLc levels were compared with the variables smoking ($p = 0.536$), occurrence of CVD ($p = 0.920$), diabetes mellitus ($p = 0.258$) and arterial hypertension ($p = 0.209$), but there was no difference between the groups regarding the presence or absence of these events. However, higher levels of LDLc were observed in the group that had corneal arch, xanthoma or xanthelasma ($p = 0.018$ and 0.002 , respectively) as expected (Table 2).

The following variants with the respective pathogenic potentials were found in heterozygosis form in the 19 ICs: (1) *LDLR* gene- pathogenic variants: p.(Asp224Asn) and deletion of exon 15; probably pathogenic: p.(Ser854Gly), p.(Cys34Arg), p.(Asp601His); (2) *APOB* gene- variant of uncertain significance (VUS): p.(Met499Val); (3) *PCSK9* gene -VUS p.(Arg237Trp); (4) *APOE* gene- VUS p.(Pro28Leu). In the relatives' genomic sequencing, the variants in the *LDLR* gene p.(Asp224Asn), p.(Ser854Gly), p.(Cys34Arg) and p.(Asp601His) were found, as well as the p.(Arg237Trp) variant in the *PCSK9* gene (Supplementary material 1). The other variants were observed only in ICs (Table 3).

Higher LDLc concentrations were observed in the group of individuals carriers of variants [254 (73) mg/dL] compared to those without identified variant [114 (45) mg/dL, $p < 0.001$]. There was no difference in body mass index (BMI) ($p = 0.148$) and frequency of cardiovascular events ($p = 0.613$) between the groups regarding the presence or not of variants. The occurrence of corneal arch and xanthomas/xanthelasmas was observed only in the group with identified variants ($p = 0.011$ and $p = 0.019$, respectively) (Supplementary material 2).

There was a positive and significant correlation between LDLc levels and age ($r = 0.249$; $p = 0.005$) when the ICs and relatives were evaluated together, regardless of the presence of genetic variants. However, when this same analysis was performed only in the group of individuals carrying variants, this correlation was not observed ($r = 0.177$; $p = 0.106$). Interestingly, higher levels of LDLc were observed in groups of pathogenic and probably pathogenic variants when compared to levels observed in carriers of VUS variants ($p < 0.05$ for both comparisons) (Fig. 2).

Due to the small number of individuals carrying variants in the *APOB* and *APOE* genes, it was not possible to compare LDLc levels between the different genes. However, subjects with variants in the *LDLR* gene had higher levels of LDLc [255.5(77) mg/dL], when compared to those who had variants in *PCSK9* gene [150.0 (1) mg/dL, $p = 0.015$].

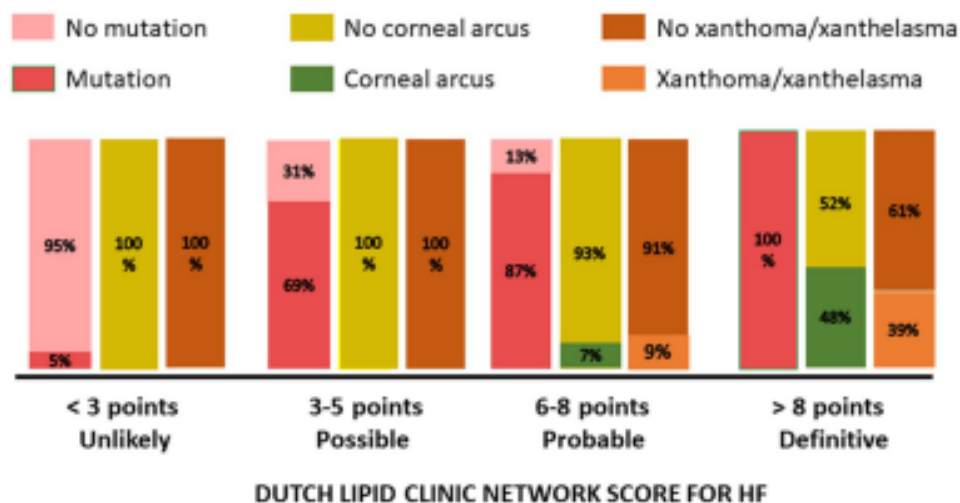


Fig. 1 Frequency of clinical and biochemical variables involved in Dutch Lipid Clinic Network Score for Familial Hypercholesterolemia

Table 2 LDLc levels according to clinical characteristics in individuals studied

Variables	LDLc (mg/dL)	p
Smoking		
No	226 (117)	
Ex-smoker (minimum 2 years)	252(214)	0.536
Smoker	261 (93)	
CVD		
No	227 (119)	0.920
Yes	230 (170)	
Diabetes		
No	233 (120)	0.258
Yes	193 (100)	
Hypertension		
No	219.5 (121)	0.209
Yes	240 (137)	
Corneal arch		
No	219 (119)	0.018 *
Yes	262 (70)	
Xanthomas/xanthelasmas		
No	218 (117)	
Xanthomas	264 (166)	0.002**
Xanthelasmas	325 (84)	

Continuous variables expressed as median (interquartile range)

LDLc low density lipoprotein-cholesterol, CVD cardiovascular disease

*Significant $p < 0.05$

**Significant for all comparisons. Missing data: 1 for CVD; 2 for diabetes; 2 for hypertension; 1 for smoking

Discussion

The present study characterized genetically and clinically 18 family clusters from a small region in Minas Gerais state, southeastern from Brazil, in which individuals with high levels of LDLc were identified, FH diagnosis was performed and cascade screening applied in family members. Considering that this is the first genetic study carried out in this population, the characterization was proceeded by LDLc levels, personal and family history of cardiovascular events, presence of clinical signs of the disease (corneal arch, xanthelasmas and xanthomas) and FH classification according to the criteria of DLCN, with the sequencing of genes most often associated to the disease.

Considering the population in which the familial genetic variant was identified, it was characterized by median LDLc levels ≥ 210 mg/dL regardless of mutational status. Few individuals had a history of CVD, hypertension, presence of corneal arch and xanthomas/xanthelasmas, in agreement with previous studies in the Brazilian population [21, 22], what differs from studies carried out in other populations, in which the personal history of CVD, presence of corneal arch and xanthomas were more frequent in the casuistry of individuals with FH [13, 23]. A low frequency of individuals with diabetes and smoking was also observed, corroborating with other studies made in our population [21, 22].

Most patients were eutrophic, what contradicts the data by Ferranti et al. (2016) [24], which observed, in a cohort evaluating the prevalence of FH in the USA, that the classification of probable or definitive FH according to the DLCN

Table 3 Genetic variants found in index cases and their relatives

Variant	Gene	Exon	Variant type	Variant sequence	ACMG classification	IC/Relatives frequency
p.(Asp224Asn)	<i>LDLR</i>	4	Missense	c.670G>A	Pathogenic	IC 11 (58%) Rel 66(88%)
p.(Ser854Gly)	<i>LDLR</i>	18	Missense	c.2560A>G	Probably Pathogenic	IC 2(12%) Rel 1(2%)
p.(Cys34Arg)	<i>LDLR</i>	2	Missense	c.100 T>C	Probably Pathogenic	IC 1 (5%) Rel 1 (2%)
p.(Asp601His)	<i>LDLR</i>	12	Missense	c.1801G>C	Probably Pathogenic	IC 1 (5%) Rel 1 (2%)
Deletion of exon15	<i>LDLR</i>	15	Gross deletion	Deletion of exon 15	Pathogenic	IC 1(5%) Rel 0(0%)
p.(Arg237Trp)	<i>PCSK9</i>	5	Missense	c.709C>T	VUS	IC 1 (5%) Rel 4(6%)
p.(Met499Val)	<i>APOB</i>	12	Missense	c.1495A>G	VUS	IC 1(5%) Rel 0 (0%)
p.(Pro28Leu)	<i>APOE</i>	3	Missense	c.83C>T	VUS	IC 1(5%) Rel 0 (0%)

ACMG American College of Medical Genetics and Genomics, IC index case, Rel relatives

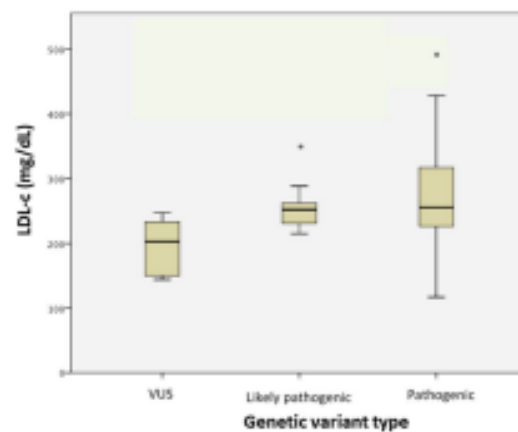


Fig. 2 LDL-c levels according to genetic variant type in *LDLR*, *PCSK9*, *APOB* and *APOE* genes related to Familial Hypercholesterolemia. * $p < 0.05$ when compared to VUS variants

criteria was presented with higher frequency in obese individuals (0.58%) than in non-obese individuals (0.31%).

As higher levels of LDLc are related to the presence of genetic variants associated with FH, its quantification is still considered the most used parameter for FH monitoring, especially in regions where the NGS technique is not available, which is observed in a large part of the world population residing in developing countries [25, 26]. As expected, individuals with clinical signs of FH, characterized by the presence of corneal arch and xanthoma/xanthelasma, had higher levels of LDLc. The LDLc concentration was positively correlated with age when all individuals were

evaluated regardless of the presence of variants. In fact, the increase in LDLc levels is expected with advancing age [27], but the same correlation was not observed when analysis was performed only in the group of genetic variants carriers, which suggests that in the presence of these variants, the increase in LDLc levels occurs even in younger individuals [22, 23].

In this study, the individuals were categorized according to the DLCN score, in which the LDLc values, the presence of corneal arch and xanthomas were variables considered in these criteria. The indication of definitive FH suggests the presence of genetic variants with a greater effect on LDLc levels, with the molecular study being the gold standard for the FH diagnosis [28, 29]. The DLCN score increased progressively as the LDLc levels got higher, as expected, but the presence of corneal arch or xanthomas was not observed in individuals classified as possible FH, as well as being present in only 7% and 9% in probable, and 48% and 39% in individuals classified as definitive FH, respectively (Fig. 1). All the genetic variants identified firstly in ICs were in genes related to LDLc metabolism, but only 8 ICs (44.4%) reached a definitive score according to the DLCN criteria, the rest being classified as FH probable or possible (55.5%). In relatives, the definitive score was observed in 13.5% and probable or possible in 66.6% of the individuals, although 79% of the relatives showed to be carriers of genetic variants in the group classified as possible/probable FH. These data suggest that LDLc levels, contrary to genetic variants, are the most determinant variable in the DLCN score [29].

In agreement with the data in the present study, Grenkowitz et al. (2016) [30] used the DLCN criteria in a study carried out in Germany to characterize FH and observed that in the group classified as possible FH, only 22.7% of

individuals were carriers of genetic variants, whereas in the group classified as definitive, only 77.1% had variant identified. It suggests that the DLCN criteria are not the best predictors of variants in genes that determine greater phenotypic effect, reinforcing the need for genetic sequencing in suspected cases of FH. Interestingly, in the present study, one individual classified as absent FH by the DLCN score, was carrier of a variant known to be pathogenic in the *LDLR* gene.

In another study, SBR criteria was used to characterize FH in the North American population [23] and it was observed that 40% of individuals carrying variants were classified as definitive and 60% as probable FH. In a study conducted in Brazil by Jannes et al. (2015) [22], a total of 248 ICs were classified by the both criteria SBR and DLCN, as a way to assess the performance of these criteria for diagnosis of FH in Brazilian population. The presence of genetic variants was found in 45.2% of the individuals classified as FH definitive by the DLCN score and 10% in individuals classified as definitive FH by SBR, showing the low sensitivity of these criteria for FH diagnosis [28]. Although in the present study, all individuals classified as definitive FH by the DLCN score had their genetic variants identified, the different studies suggest that other criteria should be validated in order to be more reliable to clinical characteristics and the presence of variants that regulate the LDLc metabolism, even when genetic sequencing is not possible.

Variants in heterozygous form were identified in four genes involved in LDLc metabolism and already known to be related to FH: *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* and *APOE*, with five variants in *LDLR* gene (four missense and one deletion), one missense variant in *APOB* gene, one missense variant in *PCSK9* gene and another missense in *APOE* gene. The higher frequency of variants in *LDLR* gene is in line with other studies in patients with FH [10, 23].

The most frequent variant in this studied population was the pathogenic variant p.(Asp224Asn) (c.670G > A), identified in 77 individuals. This variant was reported to be the second most common in patients with FH in Portugal [31] and in other European populations with FH phenotype, such as France, Spain and the Netherlands [32], but it had not yet been described in the Brazilian population. The resulting amino acid alteration from this variant is located in the protein ligand binding domain, what consequently compromises the binding of LDLR to APOB of LDL particles [33].

The pathogenic variant corresponding to the deletion of exon 15 in *LDLR* gene was found in only one IC, as it was not possible to collect samples from relatives, especially parents, for confirmation. The exon 15 encodes a domain that serves as an attachment site for O-linked carbohydrate chains [34]. The deletion of exon 15 has already been found in FH patients in the Japanese population [35], but has not yet been described in the Brazilian population.

The other variants p.(Ser854Gly), p.(Cys34Arg) and p.(Asp601His), found in the *LDLR* gene, were classified as probably pathogenic by ACMG. The variant p.(Ser854Gly) is located on exon 18, which encodes the cytoplasmic domain that contains the signal that clusters the receptor in clathrin-coated pits, permitting it to be internalized by endocytosis [36, 37]. Rare variants occur in this exon because the sequence contains fewer CpG dinucleotides [38]. The variant p.(Cys34Arg), as well as p.(Asp224Asn), are located on exons that encode the ligand binding domain (exon 2 and 4, respectively), which consists of seven tandem repeats of a 40-amino acid, cysteine rich sequence [37]. The p.(Asp601His) variant is located on exon 12, which encodes a region that shares sequence identity to the human epidermal growth factor (EGF) precursor gene, region important for LDLR folding and its function [39]. This same genetic variant has already been described in the Brazilian population [21, 22], as well as in the Spanish and South African population [40]. As far as we know, the p.(Cys34Arg) and p.(Ser854Gly) variants have not been reported in other populations and have an unknown exact functional effect.

The p.(Arg237Trp) VUS variant of the *PCSK9* gene was found in one IC, also described in a study in Norway that evaluates the functionality of *PCSK9* gene variants in relation to the effects on LDLR receptors on the cell surface. However, according to this study, this variant was classified as loss-of-function, leading to an increase of 16% in numbers of LDLR on the cell surface and 35% in the internalization of LDL [41]. Contrary, this variant was predicted as deleterious by Proven, SIFT, Polyphen-2 and Mutation taster softwares. In fact, it is expected that loss-of-function variants in the *PCSK9* gene lead to reduction in LDLc levels, which have been consistent with functional studies. However, we found it in an elevated LDLc context, which requires further studies to elucidate the effect of mutations at this position of *PCSK9* gene.

Finally, the variants in the *APOB* and *APOE* genes were also classified as VUS, however there are no studies of their functional effect and no description on other populations, requiring further studies to confirm their importance in the context of FH, contributing to a more accurate diagnosis and more personalized pathogenicity approach [42, 43].

The high frequency of the p.(Asp224Asn) variant in *LDLR* gene (59.2% of the individuals evaluated), also described in Portuguese patients with FH, can be explained by the historical features of the population on this region, which started with the immigration of Portuguese in the eighteenth century in the search for gold mining. This population had the habit of maintaining consanguineous marriages to preserve heritage, which contributed to the perpetuation and greater frequency of this Portuguese originated variant in the region [44]. In addition to the founder effect probably related to the higher frequency of

the p.(Asp224Asn) variant, other variants related to FH were also found in the studied population. This is because the region was also characterized by an important flow of Black Africans during the slavery in Brazil. Subsequently, a flow of Italians in the second half of the nineteenth century was observed, as well as the Germans in the post war, which justify the diversity of genetic variants related to FH in such limited geographic region [44].

Considering the DLCN score and the pathogenicity of the variants according to ACMG, it was observed that among individuals carrying VUS variants, 84% were classified as possible FH and 16% as definitive FH. For the probably pathogenic variants, 85.7% of the individuals were classified as possible and probable FH and 14.3% were classified as definitive FH, whereas for the pathogenic variants, only 27.3% were classified as definitive FH. These results suggest that the DLCN score based on clinical criteria may fail to detect individuals carrying FH-related pathogenic variants. In fact, about 50% of the individuals with FH in heterozygous form have an obvious phenotype [23, 26] and many remain underdiagnosed until they suffer the first acute cardiovascular event [45]. Previous studies indicate that in many countries, including Brazil, there are less than 1% of individuals formally and correctly diagnosed with FH [10, 22], partly due to the lack of low cost accessible genetic testing. On the other hand, clinical guidelines recommend genetic testing only for adults with DLCN criteria > 5 (probable and definitive FH), and these guidelines must undergo timely reviews to update the cut off after which the genetic test is indicated [46].

The presence of genetic variants was related to higher levels of LDLc and, consequently, to the presence of corneal arch and xanthoma/xanthelasma [10, 23]. However, this increase was due to the presence of variants classified as probably pathogenic or pathogenic types, since the LDLc levels in individuals carrying these variants were higher than those carrying VUS type variants (Fig. 2). It suggests the need of functional studies on these genetic variants. In addition, *in vitro* or *in silico* studies, as well as observation of familial co-segregation pattern, are needed to classify the functionality of the variants with conflicting pathogenic effects [47].

The comparison of LDLc levels between gene groups was only possible between carriers of variants in *LDLR* and *PCSK9* genes, as the sample size of the other groups made statistical analysis unfeasible. Individuals carrying *LDLR* gene variants showed higher LDLc levels, the majority being pathogenic and probably pathogenic variants, while the *PCSK9* gene variant, classified as VUS [41], had lower levels of LDLc. However, this data still needs to be interpreted with caution, since the number of carriers of the variant the *PCSK9* gene was reduced in our study.

Early diagnosis and effective treatment of FH can mean a reduction in coronary events and premature atherosclerotic disease. In the evaluated population was found that among the 19 IC, 16 (84.2%) were under hypolipidemic treatment and 36 (32.4%) relatives were variant carriers and were not in adequate treatment with lipid-lowering agents, which may indicate that their diagnosis may have been done during cascade recruitment and assessment. As the presence of genetic variants suggests the occurrence of FH [48], the search for affected family members (cascade screening) [22] is essential in early diagnosis and treatment, which justify the importance of our study.

This study presents some limitations. First, it was not possible to evaluate LDLc levels without the use of medications for all ICs, consequently, these levels were corrected for the use of those medications. Moreover, the sample size was limited and it is not possible to have a precise representation of FH disease in a continental country like Brazil. Therefore, a study with a huge number of subjects from different parts of the country will be required.

Conclusion

In the clinical and molecular characterization of 18 family clusters in southeastern Brazil with clinical suspicion of FH, higher frequency of *LDLR* variants was observed. Also, it was observed that the phenotypic characterization of the individuals did not prove to be sufficient to distinguish between non-carriers and carriers of genetic variants, suggesting that genetic sequencing for FH diagnosis is important. In addition, the cascade assessment in family members of the 1st and 2nd degrees of ICs made possible to identify FH patients without previous diagnosis, which would contribute to reduce the morbidity and mortality due to FH.

Acknowledgements All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by Silvino, J.; Jannes, C.; Tada, M.; Lima, I. and Gomes, K.

Funding KBG is grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq for the research fellowship. Amgen® Brazil provided financial resources for this research.

Data Availability Database will be made available if required.

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest There is no conflict of interest.

Ethical approval The study was approved by the Ethics Comite of Federal University of Minas Gerais (CAAE- 76387417.6.0000.5149) and by the Ethics Comite of the University of São Paulo (CAPPesq-proto000594212.1001.0068). The project was carried out in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki.

Informed consent All subjects participating in the study and/or their respective legal representatives were informed about the objectives and signed the Free and Informed Consent Form.

References

- Mohsni AG (1989) Genetic Familial Hypercholesterolemia and its diagnosis. *Atherosclerosis* 9:13–17
- Yang KC, Su YN, Shew JY, Yang KY, Tseng WK, Wu CC, LEE YT, (2007) LDLR and ApoB are major genetic causes of autosomal dominant hypercholesterolemia in a Taiwanese population. *J Formos Med Assoc* 106:799–807
- Abifadel M, Varret M, Rabès JP et al (2003) Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 34:154–156
- Nitika S, Movva S, Balakrishnan P, Biji IK, Sawhney JPS, Puri R, Arora A, Saxena R, Mishra S, Apte S, Kulshrestha S et al (2019) Genetic analysis of familial hypercholesterolemia in Asian Indians a single center study. *J Clin Lipidol* 14:35–45
- Al-Ahraf FA, Abduljaleel AAZ, Taher MM, Bouazzaoui A, Abalkhail H, Athar AFAM (2017) Compound heterozygous LDLR variant in severely affected familial hypercholesterolemia patient. *ABP* 64:75–79
- Leigh S, Futema M, Whittall R, Taylor-Beadling A, Williams M, Dunnen JT, Humphries SE (2017) The UCL low-density lipoprotein receptor gene variant database: pathogenicity update. *J Med Genet* 54(4):217–233
- Shah NP et al (2020) Familial hypercholesterolemia: Detect, treat, and ask about family. *Cleve Clin J Med* 87:109–120
- Williams RR, Hunt SC, Schumacher MC et al (1993) Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *Am J Cardiol* 72:171–176
- World Health Organization Familial Hypercholesterolemia (FH): Report of a Second WHO Consultation (1999) World Health Organization, Geneva (World Health Organization)
- Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE et al (2013) Familial hypercholesterolemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease. *Eur Heart J* 34:3478–3490
- Khera AV, Chaffin M, Aragam KG et al (2018) Genome-wide polygenic scores for common diseases identify individuals with risk equivalent to monogenic mutations. *Nat Genet* 50:1219–1224
- Steyn K, Goldberg YP, Kotze MJ, Steyn M, Swanepoel AS, Fourie JM, Coetzee GA, Van Der Westhuyzen DR (1996) Estimation of the prevalence of familial hypercholesterolemia in a rural Afrikaner community by direct screening for three Afrikaner founder low density lipoprotein receptor gene mutations. *Hum Genet* 98:479–484
- Nordestgaard BG, Benn M (2017) (2017) Genetic testing for familial hypercholesterolemia is essential in individuals with high LDL cholesterol: who does it in the world? *Eur Heart J* 38:1580–1583
- Harada PH, Miname MH, Benseñora IM, Santos RD, Lotufo PA (2018) Familial hypercholesterolemia prevalence in an admixed racial society: Sex and race matter. *The ELISA-Brasil. Atherosclerosis* 277:273–277. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.08.021>
- Benito-Vicente A, Uribe K, Jebari S, Galicia-García U, Ostolaza H, Martín C (2018) Familial hypercholesterolemia: the most frequent cholesterol metabolism disorder caused disease. *Int J MolSci* 19:1–21 pii:E3426
- Santos RD, Gidding SS, Hegele RA et al (2016) International Atherosclerosis Society Severe Familial Hypercholesterolemia Panel. Defining severe familial hypercholesterolemia and the implications for clinical management: a consensus statement from the International Atherosclerosis Society Severe Familial Hypercholesterolemia Panel. *Lancet Diabetes Endocrinol* 4:850–861
- Versmissen J et al (2008) Efficacy of statins in familial hypercholesterolemia a long term cohort study. *BMJ* 337:1–6
- Friedewald WT, Levy RIF (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18:499–552
- Foody JM et al (2013) Changes in LDL-C levels and goal attainment associated with addition of ezetimibe to simvastatin, atorvastatin, or rosuvastatin compared with titrating statin monotherapy. *Vasc Health Risk Manag* 9:719–727
- Ballantyne CM et al (2014) Efficacy, safety and effect on biomarkers related to cholesterol and lipoprotein metabolism of rosuvastatin 10 or 20 mg plus ezetimibe 10 mg vs. simvastatin 40 or 80 mg plus ezetimibe 10 mg in high risk patients: results of the GRAVITY randomized study. *Atherosclerosis* 232:86–93
- Salazar LA, Hirata MH, Cavallisa NER, Forti N, Jaime Diamant J, Giannini SD, Bertolami MC, Hirata RDC (2002) Molecular basis of familial hypercholesterolemia in Brazil: Identification of seven novel LDLR gene mutations. *Hum Mutat* 19:462–463
- Jannes CE, Dias RS, Silva PRS, Turolla L, Gagliardi ACM, Margis JDC, Chacra AP, Miname MH, Rocha VZ, Salgado-Filho W, Krieger JE, Pereira AC (2015) Familial hypercholesterolemia in Brazil: cascadescreeningprogram, clinicalandgeneticaspects. *Atherosclerosis* 238:101–107
- Garg A, Fazio S, Duell PB, Baass A, Udata C, Joh T, Riel T, Sirota M, Dentling D, Liang H, Garzone PD, Gumbiner B, Wan H (2019) Molecular Characterization of Familial Hypercholesterolemia in a North American Cohort. *J Endocr Soc* 20:1–16
- Ferranti SD, Rodday AM, Mendelson MM, Wong JB, Leslie LK, Sheldrick CR (2016) Prevalence of Familial Hypercholesterolemia in the 1999 to 2012 United States National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES). *Circulation* 133:1067–1072
- Maglio C, Mancina RM, Motta BM et al (2014) Genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia by targeted next-generation sequencing. *J Intern Med* 276:396–403
- Hsiung Y, Lin P, Chen C, Tung Y, Yanga W, Chen L, Sub T (2018) Identification of a novel LDLR disease-causing variant using capture-based next-generation sequencing screening of familial hypercholesterolemia patients in Taiwan. *Atherosclerosis* 277:440–447
- Liu H, Li J (2015) Aging and dyslipidemia A review of potential mechanisms. *Ageing Res Rev* 19:43–52
- De Lorenzo A, Silva JDL, Jannes CE, Pereira AC, Moreira ASB (2018) Anthropometric and Biochemical Characteristics of Patients with or without Genetically Confirmed Familial Hypercholesterolemia. *Arq Bras Cardiol* 110:119–123
- Futema M et al (2013) Analysis of the frequency and spectrum of mutations recognised to cause familial hypercholesterolemia in routine clinical practice in a UK specialist hospital lipid clinic. *Atherosclerosis* 229:161–168
- Grenkowitz T, Kassner U, Wihle-Demuth M, Salewsky B, Rosada A, Zemojtel T, Hopfenmüller W, Isermann B, Borucki K et al (2016) Clinical characterization and mutation spectrum of German patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 253:88–93
- Medeiros AM, Alves AC, Chora JR, Bourbon M (2017) Portuguese familial hypercholesterolemia study. *Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge- Doenças não-transmissíveis- artigos breves* 3:15–18
- Iacocca MA, Chora JR, Carrie A, Freiburger T, Leigh SE, Defesche JC et al (2018) ClinVar database of global familial hypercholesterolemia-associated DNA variants. *Hum Mutat* 39:1631–1640

33. Bourbon M, Alves AC, Medeiros AM, Silva S, Soutar AK (2008) Familial hypercholesterolaemia in Portugal- Investigators of Portuguese FH Study. *Atherosclerosis* 196:633–642
34. Südhof TC, Russell DW, Goldstein JL, Brown MS, Sanchez-Pescador R, Bell JI (1985) Cassette of eight exons shared by genes for LDL receptor and EGF precursor. *Science* 228(4701):893–895
35. Maruyama T, Yamashita S, Matsuzawa Y, Bujo H, Takahashi K, Saito Y et al (2004) Mutations in Japanese Subjects with Primary Hyperlipidemia - Results from the Research Committee of the Ministry of Health and Welfare of Japan since 1996. *J AtherosclerThromb* 11:131–145
36. Lehrman MA, Goldstein JL, Russell DW, Brown MS (1987) Duplication of seven exons in LDL receptor gene caused by Alu-Alu recombination in a subject with familial hypercholesterolemia. *Cell* 48:827–835
37. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL (1992) Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1:445–466
38. Humphries SE, Cranston T, Allen M, Middleton-Price H, Fernandez MC, Senior V (2005) Mutational analysis in UK patients with a clinical diagnosis of familial hypercholesterolaemia: relationship with plasma lipid traits, heart disease risk and utility in relative tracing. *J Molecular Medicine* 84:203–214
39. Porentadavity S, Jeendaang N (2019) Structure-Function Relationships of LDL Receptor Missense Mutations Using Homology Modeling. *Protein J* 38:447–462
40. Choea JR, Medeiros AM, Alves AC, Bourbon M (2018) Analysis of publicly available LDLR, APOB, and PCSK9 variants associated with familial hypercholesterolemia: application of ACMG guidelines and implications for familial hypercholesterolemia diagnosis. *Genet Med* 20:591–598
41. Cameron J, Holla OL, Ranheim T, Kulseth MA et al (2006) Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors. *HumMol Genet* 15:1551–1558
42. Benito-Vicente A, Etxebarria A, Stef M, Ostolaza H, Palacios L, Martín C (2015) Activity-associated effect of LDL receptor missense variants located in the cysteine-rich repeats. *Atherosclerosis* 238:304–312
43. Etxebarria A, Palacios L, Stef M, Tejedor D, Uribe KB, Oleaga A, Irigoyen L, Torres B, Ostolaza H, Martín C (2012) Functional Characterization of Splicing and Ligand-Binding Domain Variants in the LDL Receptor. *Hum Mutat* 33:232–243
44. Resende FH (2018) – Bom Despacho 300 anos: Homens que construíram Tomo I: Dos primórdios do Arraial de Nossa Senhora do Bom Despacho (1715) à emancipação político-administrativa (1912). Cap. II Velha Serrana- A sétima vila do ouro da capitania de Minas Gerais 1:15–27
45. Bhatnagar D, Morgan J, Siddiq S et al (2000) Outcome of case finding among relatives of patients with known heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Brit Med J* 321:1497–1500
46. Hendricks-Sturup RM, Lu CY (2019) Understanding Implementation Challenges to Genetic Testing for Familial Hypercholesterolemia in the United States. *J Pers Med* 9:1–7
47. Séguro F, Rabès J-P, Taraszkiewicz D, Ruidavets J-B, Bongard V, Ferrières J (2018) Genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia is associated with a premature and high coronary heart disease risk. *Clin Cardiol* 41:385–391
48. Khera AV, Won HH, Peloso GM et al (2016) Diagnostic yield and clinical utility of sequencing familial hypercholesterolemia genes in patients with severe hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 67:2578–2589

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

6 CAPÍTULO 2

EVALUATION OF NEW CARDIOVASCULAR DISEASE MARKERS IN PATIENTS WITH FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA AND RELATION WITH STATINS TREATMENT

Júnea Paolucci de Paiva Silvino¹, Cinthia Elim Jannes², Rodrigo Mendonça Cardoso Pestana¹, Lucas Paolucci de Paiva Silvino¹, Iêda de Fátima Oliveira Silva³, Karina Braga Gomes^{1,3*}

1. Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
2. Laboratório de Genética do Instituto do Coração (INCOR), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil
3. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

*Corresponding author:

Karina Braga Gomes

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.

Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Zip Code: 31270-901. Tel: 55 31 3409-6895, Fax: 55 31 3409-6985.

E-mail address: karinabgb@gmail.com, ORCID: 0000-0002-6870-2063

1. Introduction

Familial hypercholesterolemia (FH) is a monogenic disease related to the presence of variants in genes that express proteins involved in low-density lipoprotein (LDL) metabolism. These genetic alterations results in an increase in LDL-cholesterol (LDLc) levels, resulting in an improved risk of developing premature coronary atherosclerotic disease (CAD) [1,2,3]. The clinical diagnosis of FH has been based on criteria such as the Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) [4], US make Early Diagnosis Prevent Early Death Program (US MEDPED) [5] and Simon Broome Register Group [6], which the score is calculated by the presence of family history, clinical history, presence of physical signs of the disease and suspicious LDLc values for FH [7].

Plasma markers are useful tools in the diagnosis and prognosis of numerous processes such as atherosclerotic disease, which, alone or in combination, may play an important role in predicting risk and morbidity status. In addition, they can be used to detect an earlier stage of the disease, allowing a better response to treatment [8,9] and avoiding fatal outcomes. One of the cardiovascular markers, GDF-15, was discovered as a protein derived from transforming growth factor beta (TGF- β). It is a protein related to inflammation and oxidative cells [10] and is involved in cardiac hypertrophy and apoptosis [11]. GDF-15 has been shown to be a promising biomarker, since increased values have been observed in early subclinical disease, with prognostic utility for cardiovascular events and mortality [12].

The oxidized lipoprotein phosphatidylserine scavenger receptor (CXCL16/SR-PSOX) is related to atherosclerosis plaque formation and CAD development [13]. In vitro studies have suggested that this chemokine may mediate T cell adhesion to the endothelium, driving T cell migration, stimulating cell proliferation and inflammation in smooth muscle cells. It also acts as a scavenger receptor, being able to mediate the uptake of atherogenic lipoproteins by macrophages and smooth muscle cells [14].

Fatty acid binding protein 3 (FABP3) is one of nine known cytosolic FABPs, expressed in heart and skeletal muscle, involved in maintaining energy supply to the heart and regulating fatty acid transport in cardiomyocytes [15,16]. Increased levels of FABP3 have been observed in people with high cardiovascular risk who develop structural heart disease (stage B heart failure), and may predict mortality from cardiovascular causes in an apparently healthy general population, suggesting that it is a promising marker for cardiovascular risk stratification [17,18,19,20].

FABP4, also known as adipocyte FABP (A-FABP) or adipocyte P2 (aP2), is highly expressed in adipocytes, macrophages and dendritic cells and consists of 1% of all soluble proteins in adipose tissue [21, 22]. It is mainly released during the differentiation of monocytes into macrophages, a process where LDLox is involved for the formation of foam cells, increasing the accumulation of cholesterol esters and inducing an inflammatory response [23, 24]. It has been reported that the serum level of FABP4 is associated with atherosclerosis, as assessed by the thickness of carotid intima-media layer [25, 26].

TNFSF14 or LIGHT was identified as a new member of the TNF superfamily and as a key regulator of fibrosis [27,28,29,30], which presents two receptors, the herpes virus entry mediator (HVEM or TNFRSF14) and the lymphotoxin β receptor (LT β R or TNFRSF3) [30, 31]. Binding of LIGHT to LT β R expressed in endothelial cells promotes endothelial adhesion of T cells by upregulating E-selectin, intercellular adhesion molecule 1 (IACM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) [30,32,33]. LIGHT can also induce the expression of interleukin 8 (IL-8) and chemokine ligand 12 (CXCL12) [32, 34] in these cells that facilitate the migration of leukocytes to areas of inflammation, and indirectly promote a conducive environment for the promotion of tissue fibrosis [29]. Studies show the involvement of LIGHT in the pathogenesis of atherosclerosis [35,36,37].

CD-14 is a glycosylphosphatidyl-inositol (GPI)-anchored membrane glycoprotein present in both membrane-bound (mCD-14) and soluble (sCD-14) forms. The anchored mCD14 form is expressed on the surface of monocytes, macrophages,

neutrophils and dendritic cells that bind to lipopolysaccharides (LPS), resulting in an activation of several toll-like receptors 4 (TRL4), which trigger pro-inflammatory signaling pathways [38,39]. sCD-14 is able to mediate LPS activation of cells that do not express mCD-14, such as endothelial and smooth muscle cells [40,41,42]. sCD-14 plays a central role in transferring LPS to the TRL4 complex, increasing the expression of cell adhesion molecules and procoagulant activity, which could serve as a potential triggering event for the development of atherosclerosis and cardiovascular diseases (CVD), in addition to increase the secretion of inflammatory cytokines with TNF, interleukin 1- β (IL1- β) and IL -6 [38,39].

Matrix Gla protein (MGP) is a member of the vitamin K-dependent family of proteins, expressed by vascular smooth muscle cells of the arterial media layer, fibroblasts, chondrocytes and endothelial cells. MGP can also be expressed in a variety of tissues, including the arterial wall, heart, lungs and kidneys [43]. MGP is a marker of vascular calcification, as it is a potent inhibitor of this process, and can estimate cardiovascular risk [43,44,45]. MGP deficiency leads to massive arterial calcification and premature death from vascular events [45,46,47]. In several studies, its association with cardiovascular morbidity and mortality was observed [44,47,48].

This study aimed to evaluate the new cardiovascular disease markers in patients with FH. For this, individuals with clinical suspicious of the disease were genetically characterized. To compose the control group, family members who did not carry these genetic variants related to FH, but with exposure to the same risk factors (diet and life habits), were included in order to reduce the environmental effect on the elevation of LDLc levels. The new markers were also evaluated according to the treatment with statins, with the purpose to understand how statins can alter their concentration.

2. Materials and Methods

2.1 Patients and samples

In this study, 17 index cases (IC) with FH who were included, which presented LDLc \geq 210mg/dL (adults) or \geq 190 mg/dL (children), attended in a primary health care segment in the city of Bom Despacho, Minas Gerais, Brazil. The clinical diagnosis was performed according to the criteria of Simon and Broome and DLCN [49], considering the scores $>$ 8 points: definitive diagnosis of FH; 6-8 points: probable FH; between 3-5 points: possible FH. Those with a score $<$ 3 were considered absent. All 1st and 2nd degree family members of these ICs available were invited for clinical and laboratory evaluation without restriction regarding gender, age or use of cholesterol-lowering drugs, and 120 relatives presented themselves for participation in the study. Family members who did not carry genetic variants were included in the study as a control group. Individuals with liver, hematology and inflammatory disease; uncompensated diabetes mellitus (HbA1c $>$ 7%), obesity (body mass index - BMI $>$ 30 Kg/m² for adults and Z score $>$ +2 for children), uncompensated thyroid disease, triglycerides \geq 400 mg/dL and HIV carriers were excluded.

Blood samples were collected from all participants after 12 hours of fasting, in a Vacutainer[®] tube without anticoagulant and another with anticoagulant (EDTA) for quantification of lipoprotein(a) and the new cardiovascular markers. To obtain DNA, a buccal swab was collected using Oragene[®] OG-500 DNA Genotek from ICs, or whole blood was collected on a Whatman[®] FTA[®] card (Sigma-Aldrich).

2.2 *Ethical aspects*

The present study was approved by the UFMG Research Ethics Committee (COEP-UFMG) (Project CAAE-76387417.6.0000.5149) and by the University of São Paulo Ethics Committee (CAPPesqprotocolo100594212.0.1001.0068). The selected participants and/or their legal representatives were informed about the research and those who agreed signed a Free and Consent Form. The study was conducted in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki.

2.3 *Laboratory analysis*

The genetic characterization of ICs was performed as described in our previous study [50]. DNA sequencing was performed using NGS (next generation

sequencing) technique for the following genes: *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *LIPA*, *STAP1*, *APOE*, *ABCG5* and *ABCG8*. ICs that did not show variants by NGS analysis were also submitted to the MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification) technique to track copy number variants (CNVs) in the *LDLR* gene. The sequencing of family members, after characterizing the IC genetic variant, was performed using the Sanger method [50].

The variants found were classified according to the guidelines of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). The following heterozygous genetic variants were found with their respective pathogenic potentials: 1) *LDLR* gene – pathogenic variants: missense Asp224Asn in exon 4 and deletion of exon 15; probably pathogenic missense variants: Ser854Gly in exon 18, Cys34Arg in exon 2, Asp601His in exon 12; 2) *APOB* gene – missense variant of unknown clinical significance (VUS) Met499Val in exon 12; 3) *APOE* gene – missense VUS Pro28Leu in exon 3 [50].

The LDLc values, obtained from the medical records, were evaluated in the patients without treatment. However, in patients receiving lipid-lowering treatment, baseline LDLc was estimated using conversion factors [51, 52], based on the percentage of LDL reduction according to the therapeutic scheme used by each patient on lipid-lowering treatment.

Quantification of Lp(a) was performed in serum using the Atellica CH[®] diagnostic kit. The quantification of GDF-15, CXCL-16, FABP3, FABP4, LIGHT, sCD-14 and ucMGP markers was performed in plasma samples collected in EDTA, using a multiplex assay kit for Luminex (MILLIPLEX[®]MAP Human Cardiovascular Disease, EMD Millipore[®]) and a Luminex equipment following the manufacture's protocol.

2.4 Statistical analysis

Statistical analyzes were performed using the R Platform version 4.2.2 program. Qualitative variables were described as absolute and relative frequencies of their categories, and quantitative variables as measures of central tendency (median) and variability (interquartile range –IQ). The association between qualitative variables was tested using the chi-square test, with Monte Carlo simulation when necessary. Comparison of the central tendency of quantitative variables between

groups was performed using the non-parametric Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests, as none of them assumed a normal distribution (Shapiro-Wilk test). The significance level adopted was 5%.

3. Results

The 137 individuals were classified according to the presence or absence of genetic variants, which were identified as follows: Asp224Asn in the *LDLR* gene in 70 individuals, Asp601His in the *LDLR* gene in 4 individuals, deletion of exon 15 in the *LDLR* gene in 3 individuals, Cys34Arg in the *LDLR* gene in 1 individual, Ser854Gly in the *LDLR* gene in 2 individuals, Met499Val in the *APOB* gene in 3 individuals and the Pro28Leu variant in *APOE* gene in 3 individuals. In total, 86 individuals carried one of the identified variants.

According to the clinical criteria of DLCN, in the group of carriers of genetic variants, 38 (44.2%) individuals were classified as definitive, 31 (36%) were classified as probable, 15 (17.5%) were classified as possible and only two (2.3%) were classified as absent. In the group of non-carriers, 19 (37.2%) were classified as absent, 27 (53%) were classified as possible, four (7.9%) were classified as probable and only 1 (1.9%) received the definitive classification.

The group of carriers of genetic variants showed higher levels of LDLc ($p=0.010$) and Lp(a) ($p=0.020$), in addition to a higher frequency of corneal arch ($p=0.010$), xanthomas ($p=0.020$) and xanthelasma ($p=0.030$) (**Table 1**). Approximately, 4% of subjects in each group experienced cardiovascular complications. There was no difference between groups regarding age, sex, BMI, frequency of diabetes mellitus, hypertension or smoking ($p>0.05$ for all).

Forty-six individuals were treated with statins alone (simvastatin, atorvastatin or rosuvastatin). In the group of non-carriers, eight (22.2%) individuals were under lipid-lowering treatment, six (75%) were using simvastatin and two (25%) were using atorvastatin associated with ezetimibe. In the group carrying genetic variants, 53 individuals were under lipid-lowering treatment with statin alone or in combination with ezetimibe, 33 (62.2%) were using atorvastatin, 9 (17.0%) using

rosuvastatin and 10 (20.8%) were using simvastatin. Regarding the use of ezetimibe, 16 individuals were using this drug, two (12.5%) individuals in the group without genetic variants and 14 (87.5%) in the group with genetic variants.

When comparing the levels of new cardiovascular disease markers between the two groups, only FABP4 levels were significantly lower in the carrier group when compared to the non-carrier group of genetic variants ($p=0.010$) (**Table 2**).

In order to verify whether the treatment could have influenced the results, the groups were then classified into carriers of variants: 1) using statins and 2) not using statins; non-carriers of variants: 3) using statins and 4) not using statins. For FABP3, it was observed that the levels in individuals carrying variants using statins [1.8 (1.3-14.9) pg/dL] were significantly higher compared to the group of carriers not using statins [1.4 (0.9-1.9) pg/dL] ($p=0.040$). The other comparisons were not different between the groups ($p > 0.05$ for all) (**Figure 1**). There was also a significant difference for FABP4 levels, where individuals without genetic variants using statins showed higher values [5.6 (1.1 – 12.0) pg/dL] than the group with variants using these drugs [0.7 (0.2 – 1.0) pg/dL] ($p=0.010$). The other comparisons showed no significant difference between groups ($p > 0.05$ for all) (**Figure 2**). It should be noted that the group of non-carriers using statins showed a tendency towards higher levels of FABP4 [5.6 (1.1-12.0) pg/dL] compared to the group of non-carriers without statins [0.9 (0.6-1.7)pg/dL] ($p=0.090$).

A trend towards higher Lp(a) levels was also observed in the groups of individuals not using statins, comparing carriers [25.0 (10.0-42.0)mg/dL] and non-carriers of genetic variants [13.5(10.0-22.9) mg/dL] ($p=0.080$). For the other comparisons between groups 1 to 4 involving markers GDF-15, CXCL16, LIGHT, sCD-14 and ucMGP, no significant differences were found between groups ($p > 0.05$ for all).

4. Discussion

In this study, 137 individuals participated, 17 ICs and 120 relatives, who were classified according to the presence or absence of genetic variants related to FH,

treated or not with statins. It was observed that levels of Lp(a), and of the new markers of cardiovascular diseases FABP3 and FABP4, can be associated with FH, whose levels can be modulated by the use of statins.

It was shown that higher LDLc values were observed in the group of genetic variant carriers, as expected, since the most variants were located in genes related to the metabolism of this lipoprotein, and it also confirms the use of higher LDLc cutoffs as a criterion associated with a higher probability of finding genetic variants [53,54,55]. However, few individuals in both groups had a history of cardiovascular disease, which can be explained by the fact that the groups were composed of younger individuals - age is a risk factor for these complications.

In the group carrying genetic variants, 62.8% were under treatment with lipid-lowering agents and 37.2% were not under treatment. The study conducted by Jannes et al. involving populations with FH in 3 different Brazilian regions, including the population of this study, found 36 individuals with pathogenic genetic variants among 105 IC evaluated, from which only 24 (66.7%) used lipid-lowering drugs [56]. In this same study, among 240 family members carrying genetic variants, only 93 (38.8%) were under lipid-lowering treatment. This data shows that the FH population is still underdiagnosed and, consequently, undertreated, suggesting the need to identify laboratory markers for monitoring these patients in order to reduce morbidity and mortality from CAD [1, 57].

Regarding Lp(a), higher levels were observed in the group carrying genetic variants compared to the group without variants, suggesting that Lp(a) is a suggestive marker of individuals with suspected FH and carriers of genetic variants associated with the disease. The results also indicate an effect in the reduction of Lp(a) levels with the use of statins, since the tendency to higher levels was only observed in carriers of genetic variants that do not use statins. In a prospective cohort study with 46,200 healthy individuals aged between 20-100 years, in which all those with elevated Lp(a) were submitted to genotyping in the most common genes for FH (*LDLR*, *APOB* and *PCSK9*), it was observed that Lp(a) was elevated in 25-30% of individuals who carry genetic variants for FH. However, Lp(a) was also elevated in some individuals who did not carry the

studied genetic variants, suggesting the presence of possible variants in the *LPA* gene, which could contribute to a form of clinical familial hypercholesterolemia [58]. In fact, one of the limitations of our study is that the *LPA* gene was not sequenced; however, our results suggest that Lp(a) is a CAD marker associated with variants in other genes linked to FH, and that the use of statins can reduce Lp(a) levels regardless of the carrying status of these variants.

The marker FABP4, also known as adipocyte FABP (A-FABP or aP2), is released during the differentiation of monocytes into macrophages in the process of foam cell formation, also functioning as an adipokine [23,24]. A study was conducted to assess the serum level of this marker in the atherosclerotic disease and it was observed that the increase was significantly associated with a greater burden of coronary plaque, showing that the serum dosage of FABP4 could be used to assess the extent of coronary atherosclerosis [59]. Other studies were conducted to evaluate FABP4 and its relationship with atherosclerotic plaque instability and the results indicated that FABP4 is a factor that connects vascular and cellular lipid accumulation to inflammation [60, 61]. FABP4 was also evaluated as a marker for coronary artery disease, showing that it may be useful for prognosis in the risk stratification of patients with acute coronary syndrome (ACS) [62], including predicting new cerebrovascular and secondary cardiovascular events 30 days after the infarction. Another study also showed an increase in levels in patients with acute myocardial infarction with ST-segment elevation (STEMI) when compared to controls, with prognostic performance similar to the risk score of the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE) or N-terminal brain natriuretic peptide (NT-ProBNP) [63].

In the present study, we observed that FABP4 levels were higher in non-carriers of genetic variants compared to carriers, even when both groups were using statins. To our knowledge, no other study has been performed quantifying FABP4 in genetically characterized individuals with FH. One hypothesis to explain our findings is the fact that 93% of carrier individuals had variants in the *LDLR* gene. Thus, structural changes in LDLR could affect LDL oxidation and, in turn, reduce FABP4 expression by macrophages that differentiate into foam cells during the atherosclerotic process [64]. Zhou et al. observed that LDLR is critical

in the regulation of cholesterol efflux and ABCA1 expression in macrophages, since the loss of LDLR function alters this expression by sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP 1)-dependent under hypercholesterolemic conditions [65]. Thus, FABP4 expression by macrophages could follow the same LDLR-dependent mechanism.

Studies have shown that statins, mainly atorvastatin, reduce FABP4 expression induced by LDL oxidation in macrophages [66, 67, 68]. However, in a study that evaluated FABP4 in women with polycystic ovary syndrome who received treatment with simvastatin, with or without metformin, no changes in FABP4 levels were observed [69]. In our study, non-carrier individuals of variants showed a tendency to higher levels of FABP4 when they were using statins. In agreement with our study, Rhee et al., analyzing individuals with a tendency to CAD, also observed that FABP4 levels showed increased values in individuals who were using statins and antihypertensive drugs [70], although the mechanism is still unknown.

FABP3 is a marker related to cardiac muscle and skeletal muscle injury [16]. Although FABP3 levels have not been related to variables such as smoking, diabetes mellitus and dyslipidemia, its presence was increased in the content of atherosclerotic plaque [71]. In our study, FABP3 levels did not differ between the non-carrier and variant carrier groups, however, in the latter group, higher values were observed in statins users. It is important to emphasize that 61.6% of these patients carrying the variants were using therapeutic regimens with high-potency statins, mainly atorvastatin. Khodabukus et al. analyzed FABP3 levels relating skeletal muscle toxicity with the use of statins (cerivastatin) in animal models for skeletal muscle injury [72]. The authors observed an increase in FABP3 with loss of myobundle contractile function and statin-dependent myotube atrophy. These results corroborate our findings, suggesting that the increase in FABP3 may be an adverse effect of statin use.

GDF-15, CXCL16, LIGHT, sCD14 and ucMGP levels showed no difference between carrier and non-carrier groups. The presence of comorbidities, such as diabetes mellitus and hypertension; smoking; sex; and BMI may be confounding

events for these results, although these variables were paired between groups. In addition, the groups were formed by young individuals, with a low frequency of cardiovascular events. Thus, these markers should not be indicated for the early diagnosis of CVD in FH young individuals. Other studies with older populations are needed to verify the accuracy of these markers in diagnosing CVD in individuals with greater probability to present atheromatous plaque.

Some limitations should be mentioned in this study, such as the limited sample size, especially the analysis of statin use in individuals who do not carry genetic variants. Prospective studies should be conducted in order to evaluate the application of these markers along the complications caused by FH.

5. Conclusion

The FABP4 and Lp(a) markers proved to be useful in distinguishing between carriers and non-carriers of genetic variants related to FH. As the presence of these variants predisposes to the development of CAD in these patients, FABP4 and Lp(a) can potentially be used as markers to assess cardiovascular outcomes in individuals with suspected FH.

Acknowledgements:

KBG is grateful to CNPq Research Fellowship (PQ).

Declarations of interest:

The authors report there are no competing interests to declare.

6. References

[1] B.G. Nordestgaard, M.J. Chapman, S.E. Humphries, H.N. Ginsberg, L. Masana, O.S. Descamps, O. Wiklund, R.A. Hegele, F.J. Raal, J.C. Desfeche, A. Wiegman, R.D. Santos, G.F. Watts, K.G. Parhofer, G.K. Hovingh, P.T. Kovanen, C. Boileau, M. Averna, J. Borén, E. Bruckert, A.L. Catapano, J.A. Kuivenhoven, P. Pajukanta, K. Ray, A.F.H. Stalenhoef, E. Stroes, M.J. Taskinen, A.T. Hansen. Familial hypercholesterolemia is underdiagnosed and undertreated in general

population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease. European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J.* 34 (45) (2013)3478- 3490

[2]P.R.S. Silva, C.E. Jannes, J.D.C. Marsiglia, J.E. Krieger, R.D. Santos, A.C. Pereira. Predictors of cardiovascular events after one year of molecular screening for Familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 250 (2016) 144-150

[3] R. Scicali, A. Di Pino, R. Platania, G. Purrazzo, V. Ferrara, A. Giannone, F. Urbano, A. Filippello, V. Rapisarda, E. Farruggia, S. Piro, A.M. Rabuazzo, F. Purrello. Detecting familial hypercholesterolemia by serum lipid profile screening in a hospital setting: Clinical, genetic and atherosclerotic burden profile. *NutrMetab Cardiovasc Dis.* 28 (2018) 35-43

[4]R.R.Williams, S.C. Hunt, M.C. Schumacher, M.F. Leppert, E.H. Ludwig, P.N. Hopkins, Diagnosing Heterozygous Familial Hypercholesterolemia Using New Practical Criteria Validated By Molecular Genetics. *Am. J. Card.* 72 (2) (1993)171-176

[5]World Health Organization. Human Genetics Program, Geneva (1999)

[6]National Collaborating Centre for Primary Care - NCCPC (UK). Identification and management of familial hypercholesterolemia (FH). London: Royal College of General Practitioners (UK) (2008)

[7]A. Haase, A.C. Goldberg. Identification of people with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Curr. Opin. Lipidol*, 23 (2012) 282-289

[8]A. Zernecke, E. Shagdarsuren, C. Weber. Chemokines in Atherosclerosis an Update. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 (2008)1897-1908

[9]A. Piek, W. Dua, R. A. Boera, H.H.W Sillj. Novel heart failure biomarkers: why do we fail to exploit their potential? *Crit Rev Clin Lab Sci* 55 (4) (2018) 246–263

- [10] A. E. Berezin, A. A. Berezin. Adverse Cardiac Remodelling after Acute Myocardial Infarction: Old and New Biomarkers. *Dis Markers*, Article ID 1215802, (2020) 1-21
- [11] T. Ago, J. Sadoshima. GDF15, a cardioprotective TGF-beta superfamily protein. *Circ. Res.* 98 (2006) 294-297
- [12] G. L. Salvagno, C. Pavan. Prognostic biomarkers in acute coronary syndrome. *Ann. Transl. Med.* 4 (13) (2016) 1-8
- [13] J. Xing, Y. Liu, T. Chen. Correlations of chemokine CXCL16 and TNF- α with coronary atherosclerotic heart disease. *Exp. Ther. Med.* 15 (2018) 773-776
- [14] J. Korbecki, K. Bajdak-Rusinek, P. Kupnicka, P. Kapczuk, D. Siminska, D. Chlubek, I. Baranowska-Bosiacka, The Role of CXCL16 in the Pathogenesis of Cancer and Other Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (3490) (2021) 1-27
- [15] R. Tsukahara, H. Haniu, Y. Matsuda, T. Tsukahara. Heart-type fatty-acid-binding protein (FABP3) is a lysophosphatidic acid-binding protein in human coronary artery endothelial cells. *FEBS Open Bio* 4 (2014) 947-951
- [16] M.G. Moon, C.H. Yoon, K.; Lee, S.H. Kang, T.J. Youn, I.H Chae. Evaluation of Heart-type Fatty Acidbinding Protein in Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *J. Korean Med. Sci* 36 (8) (2021) 1-12
- [17] J.F. Glatz, R.J. Paulussen, J.H. Veerkamp. Fatty acid binding proteins from heart. *Chem. Phys. Lipids* 38 (1985) 115–129
- [18] Y. Zhang, J.W. Kent Jr, A. Lee, D. Cerjak, O. Ali, R. Diasio, M. Olivier, J. Blangero, M. A. Carless, A. H Kissebah. Fatty acid binding protein 3 (fabp3) is associated with insulin, lipids and cardiovascular phenotypes of the metabolic syndrome through epigenetic modifications in a northern european family population. *BMC Med. Gen.* 6 (9) (2013) 2-14, 2013

- [19] Y. Otaki, T. Watanabe, H. Takahashi, A. Hirayama, T. Narumi, S. Kadowaki, Y. Honda, T. Arimoto, T. Shishido, T. Miyamoto, T. Konta, Y. Shibata, A. Fukao, M. Daimon, Y. Ueno, T. Kato, T. Kayama, I. Kubota. Association of Heart-Type Fatty Acid-Binding Protein with Cardiovascular Risk Factors and All-Cause Mortality in the General Population: The Takahata Study. *PLOS ONE* 9 (5) (2014) e94834 1-10
- [20] J.D. Jones, P.G. Chew, R. Dobson, A. Wootton, R. Ashrafi, A. Khand. The Prognostic Value of Heart Type Fatty Acid Binding Protein in Patients with Suspected Acute Coronary Syndrome: A Systematic Review. *Curr. Cardiol. Rev.* 13 (2017) 189-198
- [21] M. Furuhashi, S. Saitoh, K. Shimamoto, T. Miura. Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clin. Med. Insights Cardiol.* 8 (3) (2015) 23-33
- [22] M. Tan, H. Korkmaz, H. Aydin, D. K. Doğuç. FABP4 levels in hypothyroidism and its relationship with subclinical atherosclerosis. *Turk. J. Med. Sci.* 49 (2019) 1490-1497
- [23] L. Makowski, K.C. Brittingham, J.M. Reynolds, J. Suttles, G.S. Hotamisligil. The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and I κ B kinase activities. *JBC* 280 (13) (2005) 12888–12895
- [24] X. Hui, H. Li, Z. Zhou, K.S.L. Lam, Y. Xiao, D. Wu, K. Ding, Y. Wang, P.M. Vanhoutte, A. Xu. Adipocyte fatty acid-binding protein modulates inflammatory responses in macrophages through a positive feedback loop involving c-Jun NH₂-terminal kinases and activator protein-1. *JBC* 285 (14) (2010) 10273-10280
- [25] D.C. Yeung, A. Xu, C.W. Cheung, N.M.S. Wat, M.H. Yau, C.H.Y. Fong, M.T. Chau, K.S.L. Lam. Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels were

independently associated with carotid atherosclerosis. *ArteriosclerThrombVasc Biol* 27(8) (2007)1796-802

[26] V. V. Miroshnikova, E.A. Polyakova, I.A. Pobozeva, A. A. Panteleeva, N.D. Razgildina, D. A. Kolodina, O.D. Belyaeva, O.A. Berkovich, S.N. Pchelina, E.I. Baranova. FABP4 and omentin-1 gene expression in epicardial adipose tissue from coronary artery disease patients. *Genet. Mol. Biol.* 44 (4) (2021) e20200441 1-8

[27] D.N.; Mauri, R.; Ebner, R. I.; Montgomery, K.D.; Kochel, T.C.; Cheung, G.L; Yu, S.; Ruben, M.; Murphy, R.J.; Eisenberg, G.H.; Cohen, P.G.; Spear, C.F. Ware. LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity* 8 (1998) 21–30

[28] J.A. Harrop, P.C. McDonnell, M. Brigham-Burke, S.D. Lyn, J. Minton, K.B. Tan, K. Dede, J. Spanpanato, C. Silverman, P. Hensley, R. Diprinzo, J.G. Emery, K. Deen, C. Eichman, M. Chabot-Fletcher, A; Truneh, P.R. Young, Herpesvirus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells and inhibits HT29 cell growth. *JBC* 273 (1998) 27548– 27556

[29] R. Herro, M. Croft. The Control of Tissue Fibrosis by the Inflammatory Molecule LIGHT (TNF Superfamily member 14). *Pharmacol Res* 104 (2016) 151-155

[30] A. Herrero-Cervera, C. Espinós-Estévez, S. Martín-Vañó, A. Taberner-Cortés, M. Aguilar-Ballester, A. Vinué L. Piqueras, S. Martínez-Hervás, H. González-Navarro. Dissecting Abdominal Aortic Aneurysm Is Aggravated by Genetic Inactivation of LIGHT (TNFSF14). *Biomedicines* 9 (1518) (2021) 1-17

[31] X. Yuan, Y. Gu, X. Lai, Q. Gu. LIGHT is increased in patients with coronary disease and regulates inflammatory response and lipid metabolism in oxLDL-induced THP-1 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2017)1-7

[32] Y.H. Chang, S.L. Hsieh, Y. Chao, Y.C. Chou, W.W. Lin. Proinflammatory effects of LIGHT through HVEM and LTbetaR interactions in cultured human umbilical vein endothelial cells. *J. Biomed. Sci.* 12 (2005) 363–375

[33] S. Celik, H. Langer, K. Stellos, A.E. May, V. Shankar, K. Kurz, H.A. Katus, M.P. Gawaz, T.J. Dengler. Platelet-associated LIGHT (TNFSF14) mediates adhesion of platelets to human vascular endothelium. *J. Thromb Haemost* 98 (2007) 798–805

[34] L.A. Madge, M.J. May. Classical NF-kappaB activation negatively regulates noncanonical NFkappaB-dependent CXCL12 expression. *JBC* 285 (2010) 38069–38077

[35] W.H. Lee, S.H. Kim, Y. Lee, B.B. Lee, B. Kwon, H. Song, B.S. Kwon, J.E. Park. Tumor necrosis factor receptor superfamily 14 is involved in atherogenesis by inducing proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 (2001) 2004–2010

[36] W.J. Sandberg, B. Halvorsen, A. Yndestad, C. Smith, K. Otterdal, F.R. Brosstad, S.S. Froland, P.S. Olofsson, J.K. Damås, L. Gullestad, G.K. Hansson, E. Oie, P. Aukrust. Inflammatory interaction between LIGHT and proteinase-activated receptor-2 in endothelial cells: potential role in atherogenesis. *Circ. Res.* 104 (2009) 60–68

[37] C.Y. Hsu, W.K. Tseng, Y.W. Wu, T.H. Lin, H.I. Yeh, K.C. Chang, J.H. Wang, R.H. Chou, C.Y. Huang, P.H. Huang, H.B. Leu, W.H. Yin, C.C. Wu, S.J. Lin, J.W. Chen. Circulating TNFSF14 (Tumor Necrosis Factor Superfamily 14) Predicts Clinical Outcome in Patients with Stable Coronary Artery Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 39 (2019) 1-13

[38] A. P. Reiner, E. M. Lange, N. S. Jenny, P.H.M. Chaves, J. Ellis, J. Li, J. Walston, L. A. Lange, M. Cushman, R. P. Tracy, Soluble CD14: genome-wide association analysis and relationship to cardiovascular risk and mortality in the older adults. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33 (1) (2013) 1-18

[39] N.C. Olson, I. Koh, A. P. Reiner, S.E. Judd, M.R. Irvin, G. Howard, N.A. Zakai, Cushman, M. Soluble CD1, Ischemic Stroke, and Coronary Heart Disease Risk in a Prospective Study: The REGARDS Cohort. *J. Am. Heart Assoc.* 9 (2020) e0142411-9

[40] J.Pugin, C.C. Schürer-Maly, D. Leturcq, A. Moriarty, R.J. Ulevitch, P.S. Tobias, Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 90 (1993) 2744–2748

[41] T.S. Juan, M.J. Kelley, D.A. Johnson, L.A. Busse, E. Hailman, S.D. Wright, H.S. Lichenstein. Soluble CD14 truncated at amino acid 152 binds lipopolysaccharide (LPS) and enables cellular response to LPS. *JBC* 270 (1995) 1382–1387

[42] S.G. Shitole, M. Biggs, A.P. Reiner, K.J. Mukama, L. Dioussé, J.H. Ix, J.I. Barzilay, R.P. Tracy, D. Siscovick, J.R. Kizer. Soluble CD14 and CD14 Variants, Other Inflammatory Markers, and Glucose Dysregulation in Older Adults: The Cardiovascular Health Study. *Diabetes Care* 42 (2019) 2075–2082

[43] T. P. Griffin, N. Islam, D. Wall, J. Ferguson, D. G. Griffin, M. D. Griffin, P.M. O'shea. Plasma dephosphorylated uncarboxylated Matrix Gla-Protein (dp-ucMGP): reference intervals in Caucasian adults and diabetic kidney disease biomarker potential. *Sci. Rep.* 9 (18452) (2019) 1-13

[44] E.G.H.M. Van Den Heuvel, N. M. Van Schoor, P. Lips, E.J.P. Magdeleyns, D.J.H. Deega, C. Vermeer, M. Heijer. Circulating uncarboxylated matrix Gla protein, a marker of vitamin K status, as a risk factor of cardiovascular disease. *Maturitas* 77 (2014) 137-141

[45] A. Shioi, T. Morioka, T. Shoji, M. Emoto. The Inhibitory Roles of Vitamin K in Progression of Vascular Calcification. *Nutrients* 12 (583) (2020) 1-13

- [46] G. Luo, P. Ducey, M.D. Mckee, G.J. Pinero, E. Loyer, R.R. Behringer. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 386 (1997) 78-81
- [47] A. Bilalic, T. T. Kurir, M. Kumric, J. A. Borovac, A Matetic, D. Supe-Domic, J. Bozic. Circulating Levels of Dephosphorylated-Uncarboxylated Matrix Gla Protein in Patients with Acute Coronary Syndrome. *Molecules* 26 (1108) (2021) 1-12
- [48] A.M.G. Jaminon, L. Dai, A.R. Qureshi, P. Evenepoel, J. Ripsweiden, M. Söderberg, A. Witasp, H. Olauson, L.J. Schurgers, P. Stenvinkel. MatrixGla protein is an independent predictor of both intimal and medial vascular calcification in chronic kidney disease. *Sci. Rep.* 10 (6586) (2020) 1-8
- [49] M.C.O. Izar, V.Z.R. Giraldez, A. Bertolami, R.D.Santos, A.M. Lottenberg, M.H.V. Assad, J.F.K. Saraiva, A.P.M. Chacra, T.L.R. Martinez, L.R. Bahia, F.A.H. Fonseca, A.A. Faludi, A.C. Sposito, A.C.P. Chagas, C.E. Jannes, C.K. Amaral, D.B. Araújo, D.E. Cintra, E.R. Coutinho, F. Cesena, H.T Xavier, I.C.P. Mota, I.C.B. Giuliano, J.R.F. Neto, J.T. Kato, M.C. Bertolami, M.H. Miname, M.H.C.G. Castelo, M.S.F. Lavrador, R.M. Machado, P.G. Souza, R.J. Alves, V.A. Machado, W.S.Filho, Atualização da Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar – 2021. *Arq. Bras. Cardiol.* 117 (4) (2021) 782-844
- [50] J. P.P. Silvino, C. E. Jannes, M. T. Tada, I. R. Lima, I.F.O. Silva, A. C. Pereira, K.B. Gomes. Cascade screening and genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia in clusters of the Southeastern region from Brazil. *Mol. Biol. Rep.* 47 (2020) 9279–9288
- [51] J.M. Foody, P.P. Toth, J.E. Tomassini, S. Sajjan, D.R. Ramey, D. Neff, A.M. Tershakovec, H. Hu, K. Tunceli. Changes in LDL-C levels and goal attainment associated with addition of ezetimibe to simvastatin, atorvastatin, or rosuvastatin compared with titrating statin monotherapy. *Vasc. Health Risk Manag.* 9 (2013) 719-727

[52] C.M.;Ballantyne, R.C.; Hoogeveen, J.L.; Raya, V.A.; Cain, M.K.; Palmer, B.W.; Karlson. Gravity Study Investigators. Efficacy, safety and effect on biomarkers related to cholesterol and lipoprotein metabolism of rosuvastatin 10 or 20 mg plus ezetimibe 10 mg vs. simvastatin 40 or 80 mg plus ezetimibe 10 mg in highrisk patients: results of the GRAVITY randomized study. *Atherosclerosis* 232 (2014) 86–93

[53] J. Vandrovcova, E.R.A. Thomas, S.S. Atanur, P. Norsworthy, C. Neuwirth, Y. Tan, D. Kasperaviciute, J. Biggs, L. Game, M. Mueller, A. Soutar, T.J. Aitman. The use of next-generation sequencing in clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Genet. Med.* 15 (2013) 948–957

[54] C. Maglio, R. M. Mancina, B. M. Motta, M. Stef, C. Pirazzi, L. Palacios, N. Askaryar, J. Borén, O. Wiklund, S. Romeo. Genetic diagnosis of familial hypercholesterolaemia by targeted next-generation sequencing. *J. Intern. Med.* 276 (4) (2014) 396–403

[55] Y. Hsiung, P. Lin, C. Chen, Y. Tung, W. Yang, P. Chen, T. Su. Identification of a novel LDLR disease-causing variant using capture-based next-generation sequencing screening of familial hypercholesterolemia patients in Taiwan. *Atherosclerosis* 277 (2018) 440-447

[56] C.E. Jannes, J.P.P. Silvino, P.R.S. Silva, I.R. Lima, M.T. Tada, T.G.M. Oliveira R.D. Santos, J.E. Krieger, A.C. Pereira. Screening for Familial Hypercholesterolemia in Small Towns: Experience from 11 Brazilian Towns in the Hipercolbrasil Program. *Arq. Bras. Cardiol.* 118 (4) (2022) 669-677

[57] A. Garg, S. Fazio, P.B. Duell, A. Baass, C. Udata, T. Joh, T. Riel, M. Sirota, D. Dettling, H. Liang, P.D. Garzone, B. Gumbiner, H. Wan. Molecular Characterization of Familial Hypercholesterolemia in a North American Cohort. *J. Endocr. Soc.* 20 (2019) 1–16

[58] A. Langsted, P.R. Kamstrup, M. Benn, A. Tybjaerg-Hansen, B.G. Nordestgaard. High lipoprotein(a) as a possible cause of clinical familial

hypercholesterolaemia: a prospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 4 (2016) 577– 587

[59] T. Miyoshi, G. Onoue, A. Hirohata, S. Hirohata, S. Usui, K. Hina, H. Kawamura, M. Doi, K.F. Kusano, S. Kusachi, Y. Ninomiya. Serum adipocyte fatty acid-binding protein is independently associated with coronary atherosclerotic burden measured by intravascular ultrasound. *Atherosclerosis* 211 (2010) 164–169

[60] W. Peeters, D.P.V. de Kleijn, A. Vink, S. van de Weg, A. H. Schoneveld, S. K. Sze, P.J. van der Spek, J.P.M. de Vries, F.L. Moll, G. Pasterkamp. Adipocyte fatty acid binding protein in atherosclerotic plaques is associated with local vulnerability and is predictive for the occurrence of adverse cardiovascular events. *Eur. Heart J.* 32 (2011) 1758–1768

[61] H.E.; Agardh, L.; Folkersen, J., Ekstrand, D.; Marcus, J.; Swedenborg, U.; Hedin, A.; Gabrielsen, G. Paulsson-Berne. Expression of fatty acid-binding protein 4/aP2 is correlated with plaque instability in carotid atherosclerosis. *J. Int. Med.* 269 (2) (2011) 200-210

[62] M. von Eynatten, L.P. Breitling, M. Roos, M. Baumann, D. Rothenbacher, H. Brenner. Circulating Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein Levels and Cardiovascular Morbidity and Mortality in Patients With Coronary Heart Disease A 10-year Prospective Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 3 (2012) 22327-2335.

[63] H. Reiser, R. Klingenberg, D. Hof, S. Cooksley-Decasper, N. Fuchs, A. Akhmedov, S. Zoller, P. Marques-Vidal, H. M. Soler, D. Heg, U. Landmesser, N. Rodondi, F. Mach, S. Windecker, P. Vollenweider, C. M. Matter, T. F. Lüscher, A. von Eckardstein, J. Gawinecka. Circulating FABP4 Is a Prognostic Biomarker in Patients with Acute Coronary Syndrome but Not in Asymptomatic Individuals. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35 (2015) 1-7

- [64] Y. Wu, T. Chang, C. Chang, J. Chen. Fatty-Acid-Binding Protein 4 as a Novel Contributor to Mononuclear Cell Activation and Endothelial Cell Dysfunction in Atherosclerosis. *Int J Mol Sci.* 23 (9245) (2020)1-15
- [65] X.Zhou, W. He, Z. Huang, A. M. Gotto Jr, D. P. Hajjar, J. Han. Genetic deletion of low density lipoprotein receptor impairs sterol-induced mouse macrophage ABCA1 expression. A new SREBP1-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 283(4) (2008) 2129-2138.
- [66] G. Llaverias, V. Noe, S. Penuelas, M. Vazquez-Carrera, R. M. Sanchez, J. C. Laguna, C. J. Ciudad, M. Alegreta. Atorvastatin reduces CD68, FABP4, and HBP expression in oxLDL-treated human macrophages *Biochemical and Biophysical Research Communications* 318 (2004) 265–274
- [67] Y. Wu, H. Kao, C. Huang, M. Chen, L. Lin, Y. Wang, Y. Lin, H. Lin, K. Tzen, R. Yen, Y. Chi, P. Huang, W. Yang. The effects of 3-month atorvastatin therapy on arterial inflammation, calcification, abdominal adipose tissue and circulating biomarkers. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 39 (2012) 399–407
- [68] W. Hu, X. Zhou, M. Jiang, Y. Duan, Y. Chen, X. Li, Z. Yin, G. He, Z. Yao, Y. Zhu, D. P. Hajjar, J. Han. Statins synergize dexamethasone-induced adipocyte fatty acid binding protein expression in macrophages. *Atherosclerosis* 222 (2012) 434–443
- [69] S.E. Karakas, Beata Banaszewska, Robert Z. Spaczynski, Leszek Pawelczyk, A. Duleba. Free fatty acid binding protein-4 and retinol binding protein-4 in polycystic ovary syndrome: response to simvastatin and metformin therapies *Gynecol Endocrinol*, 29(5) (2013) 483–487
- [70] E. J. Rhee, W. Y. Lee, C. Y. Park, K. W. Oh, B. J. Kim, K. C. Sung, B. S. Kim. The association of serum adipocyte fatty acid-binding protein with coronary artery disease in Korean adults. *European Journal of Endocrinology* 160 (2009) 165–172

[71] M. Karaduman, A. Sengul, C. Oktenli, A. Pekel, Z. Yesilova, U. Musabak, S. Y. Sanisoglu, C. Gunay, O. Baysan, I. H. Kocar, H. Tatar, M. Ozata, Blackwell Publishing Ltd. Tissue levels of adiponectin, tumour necrosis factor-alpha, soluble intercellular adhesion molecule-1 and heart-type fatty acid-binding protein in human coronary atherosclerotic plaques. *Clinical Endocrinology* 64 (2006) 196–20

[72] A. Khodabukus, A. Kaza, J. Wang, N. Prabhu, R. Goldstein, V. S. Vaidya, N. Bursac. Tissue-Engineered Human Myobundle System as a Platform for Evaluation of Skeletal Muscle Injury Biomarkers. *Toxicol. Sci.* 176 (1) (2020) 124–136

Table 1 – Clinical and demographic characterization of carrier and non-carrier groups of genetic variants related to Familial Hypercholesterolemia.

Variables	Non-carriers (n= 51)	Carriers (n= 86)	P value
LDLc (mg/dL)	118 (96-145)	253 (214-312)	0.010*
Lp(a) (mg/dL)	13.4 (10-22.9)	23.5 (10.0-50.2)	0.020 *
Age (years)	29 (14-56)	39 (24-53)	0.340
Gender (%)			
Male	17 (33.3%)	34 (39.5%)	0.580
Female	34 (66.7%)	52 (60.5%)	
BMI (Kg/m ²)	22.9 (18.6-26.1)	23.3 (20.1- 26.5)	0.200
Cornealarch (%)	1 (2%)	15 (17.5%)	0.010*
Xanthomas (%)	0 (0%)	10 (11.6%)	0.020*
Xanthelasma (%)	0 (0%)	9 (10.5%)	0.030*
CVD familyhistory (%)	30 (58.8%)	56 (65.2%)	0.470
CVD personalhistory (%)	2 (4%)	4 (4.6%)	1.000
Diabetes mellitus (%)	5 (9.8%)	3 (3.5%)	0.150
Systemic arterial hipertension (%)	14 (27.5%)	19 (22.1%)	0.540
Smoking			
Non-smokers	43 (84.4%)	75 (87.2%)	0.920
Ex-smokers#	4 (7.8%)	5 (5.8%)	
Smokers	4 (7.8%)	6 (7.0%)	

*Continuous variables expressed as median (interquartile range), categorical variables expressed as absolute numbers (frequency). BMI=Body Mass Index; CVD= cardiovascular disease. * Significant $p<0.05$. # up to 1 year before collection.*

Table 2 – Evaluation of levels of new cardiovascular disease markers comparing carrier and non-carrier groups of genetic variants related to Familial Hypercholesterolemia.

Marker	Non-carriers (n= 51)	Carriers (n=86)	P value
GDF-15 (ng/dL)	1.4 (0.9-2.0)	1.5 (1.3-4.0)	0.300
CXCL16 (pg/dL)	1.7 (1.3 – 2.5)	1.7 (1.4 – 2.7)	0.310
FABP3 (pg/dL)	1.6 (1.2-13.8)	1.6 (1.1- 12.4)	0.530
FABP4 (pg/dL)	1.0 (0.6 – 1.7)	0.7 (0.1 – 1.1)	0.010*
LIGHT (pg/dL)	0.1 (0.1 – 0.6)	0.1 (0.1 – 0.6)	0.570
sCD14 (ng/dL)	6.079 (5.281-8.414)	5.885 (5.029- 7.347)	0.270
ucMGP (ng/dL)	16 (13.7- 19.4)	16.5 (14.2 – 19.0)	0.930

*Variables expressed as median (interquartile range). * Significant $p < 0.05$*

Figure 1- FAPB3 levels in FH genetic variants carriers and non-carriers, classified according to statin treatment.

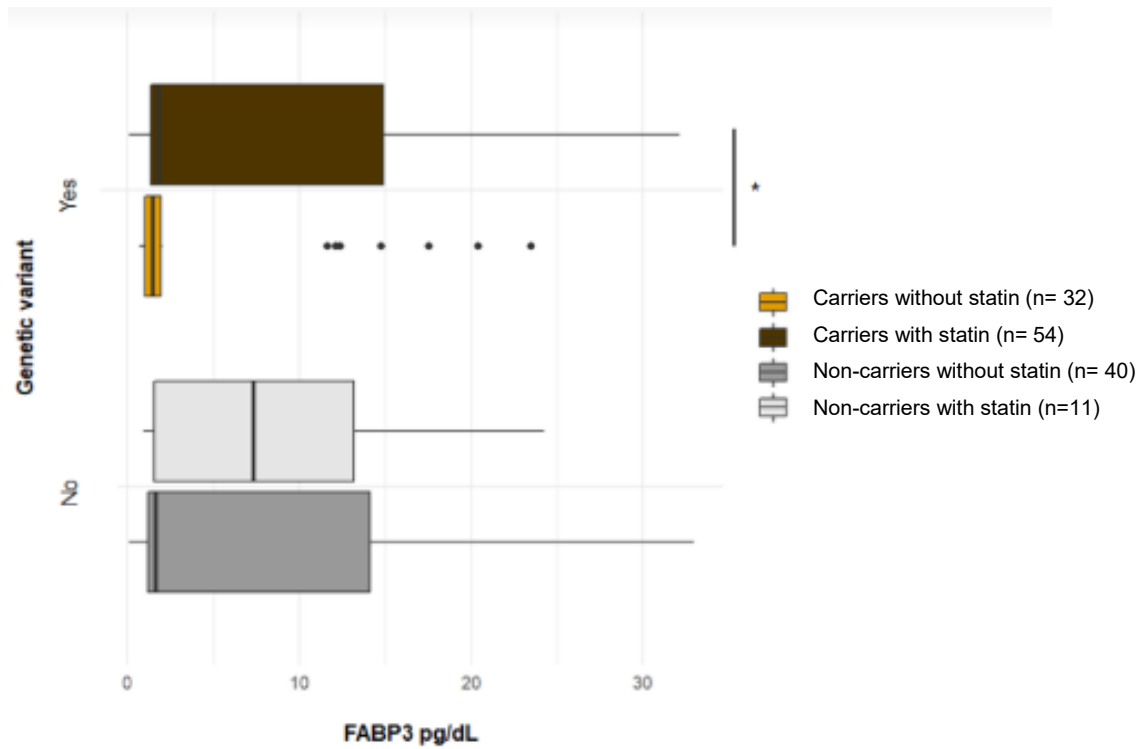
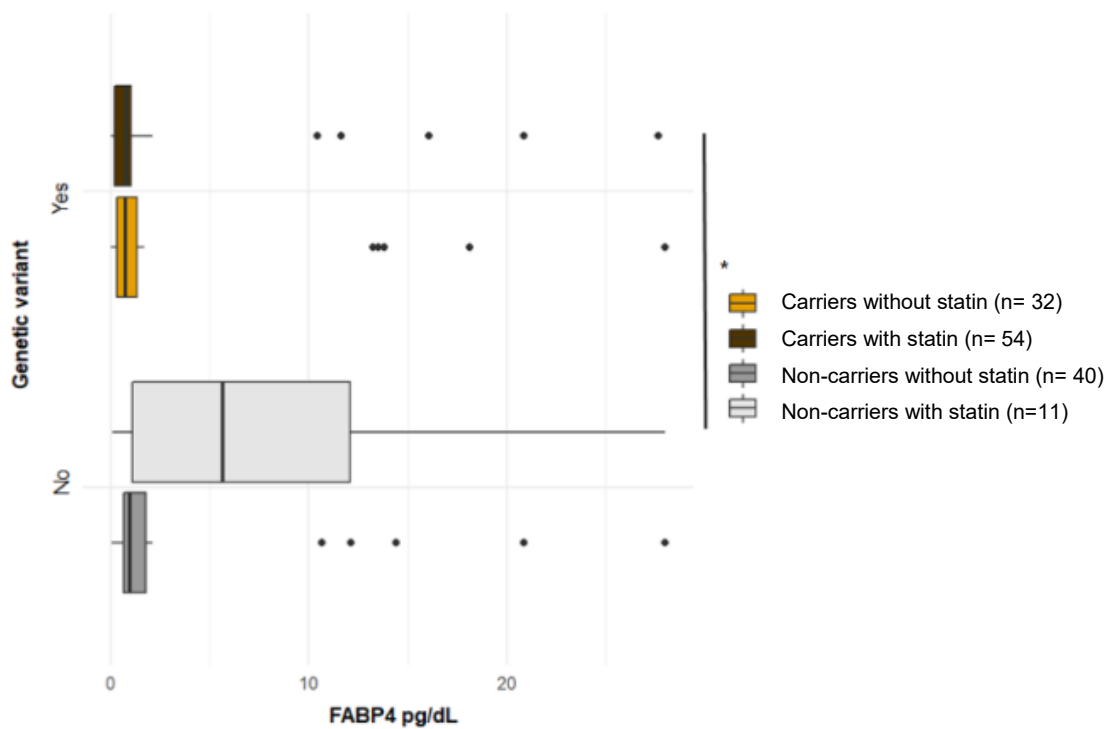


Figure 2 - FAPB4 levels in FH genetic variants carriers and non-carriers, classified according to statin treatment



7 CAPÍTULO 3

MICROPARTICLES INCARRIERS OF GENETIC VARIANTS RELATED TO FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA AND THE RELATIONSHIP WITH STATINS

Júnea Paolucci de Paiva Silvino¹, Cinthia Elim Jannes², Rodrigo Mendonça Cardoso Pestana¹, Lucas Paolucci de Paiva Silvino¹, Iêda de Fátima Oliveira Silva³, Andréa Teixeira-Carvalho⁴, Karina Braga Gomes^{1,3*}

1. Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
2. Laboratório de Genética do Instituto do Coração (INCOR), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil
3. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
4. Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author:

Karina Braga Gomes

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.

Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Zip Code: 31270-901. Tel: 55 31 3409-6895, Fax: 55 31 3409-6985.

E-mail address: karinabgb@gmail.com, ORCID: 0000-0002-6870-2063

Abstract

Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant genetic disease characterized by elevated levels of LDL-c. The detection of genetic variants in genes related to LDL metabolism can provide an early diagnosis to reduce unfavorable atherosclerotic outcomes in this population. Microparticles (MPs) are extracellular vesicles released by the membrane of various cell types during the process of cell activation or apoptosis and are important messengers in intercellular communication. This study aimed to evaluate MPs in a group of carriers of FH-related genetic variants compared to family members without FH, and the influence of statin treatment on MP counts. Annexin-positive total- MPs, cardiomyocyte-derived MPs (CardioMPs), endothelial cell (EMPs), platelet-derived MPs (PMPs) and tissue factor expressing MPs (TFMPs) were evaluated comparing individuals with FH and genetic variants (n=16) and without FH and without genetic variants (n=16), using or not using statins. Higher counts of total- MPs, CardioMPs, EMPs and TFMPs were observed in the group carrying genetic variants. Furthermore, patients with FH without the use of statins had higher counts of these same MPs compared to the non-FH group without the use of statins. In conclusion, the data suggests that MPs are related to FH and that statins can modulate the activation or injury of the cells of origin of these MPs.

Keywords: Familial hypercholesterolemia, genetic variants, statins, microparticles.

1 –Introduction

Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant genetic disease characterized by the presence of variants in genes related to the metabolism of low-density lipoprotein cholesterol (LDLc). Chronic elevation of LDLc predisposes to the risk of prematurely developing cardiovascular diseases (Nordestgaard et al., 2013; Silva et al., 2016; Scicali et al., 2018). FH can be caused by variants located mainly in the low-density lipoprotein receptor (*LDLR*), apolipoprotein B (*APOB*) and proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (*PCSK9*) genes, with more than 2,900 genetic alterations associated to the disease (Iacocca et al., 2018). FH can presents multiple phenotypes due to different molecular etiologies and additional genetic factors (Sturm et al., 2018), but the risk of coronary artery disease (CAD) is higher in carriers of pathogenic variants (Khera et al., 2016).

The pathophysiology of atherosclerosis begins with endothelial injury, mediated by cascade of intra and intercellular signaling events that shape cellular behavior within vessels (Da Luz et al., 2018). Vascular endothelial cells facilitate the active transport of low-density lipoprotein (LDL) to the subendothelial space through transcytosis pathways, and the accumulation of LDL initiates an inflammatory response (Mundi et al., 2018), a process that occurs intensely in FH. Early in the atherosclerosis process, the endothelium transitions from a quiescent state to an activated state in response to proatherogenic stimuli, including oxidized LDL (LDL_{ox}) and proinflammatory cytokines (Ricard et al., 2021). The complication resulting from this process is mainly acute coronary syndrome (ACS), observed more frequently in patients with FH, including young people (Cahill and Redmond, 2016; Da Luz et al., 2018). Thus, plasmatic markers related to the atherosclerotic process, endothelial injury, as well as cardiac dysfunctions, such as intercellular adhesion molecule (ICAM-1), vascular cell adhesion molecules (VCAM-1), platelet selection (P-selectin) and endothelial cell selectin (E-selectin) (Motta et al., 2013) and that can early identify these outcomes in patients with FH, are highly desirable.

Microparticles (MPs) are extracellular vesicles (0.1 – 1.0 μm in diameter) that slough off from cell membranes in response to activation or apoptosis. The initial step of its formation consists in membrane remodeling with bubble formation and an increase in intracellular calcium, resulting rearrangement in the phospholipid layer and exposure of phosphatidylserine. Concomitantly with loss of membrane asymmetry, calcium-sensitive enzymes are activated and promote the cleavage of cytoskeletal filaments, leading to the formation of membrane bubbles and release of MPs (Marques et al., 2012; Carvalho et al., 2017). MPs come from various cell types and can be released under the influence of cytokines, thrombin, endotoxins or physical stimuli, as well as shear stress or hypoxia (Nomura et al., 2008; Rodrigues et al., 2018). Moreover, MPs carry markers on its surface that make it possible to identify the cell of origin.

This study aims to evaluate the total MPs, MPs from cardiomyocytes, endothelium, platelets and MPs that express tissue factor (TF) in individuals carrying FH-related genetic variants, compared to the control group of non-carriers. Furthermore, the effect of treatment with statins on the count of MPs released in both groups was investigated.

2 – Materials and Methods

2.1- Characterization of individuals

In this study, 32 individuals were included, 16 cases with FH and 16 controls, assisted by the Itinerant Hipercol Brazil program of Instituto do Coração (InCor)-Brazil (Jannes et al., 2022). This program aims to investigate the presence of genetic variants in populations with high prevalence of dyslipidemia, according to information collected by local medical assistance, with an active search for index cases (IC) based on medical records and cholesterol tests carried out in laboratories of clinical analysis of the local health units.

Individuals in the case group were diagnosed according to the clinical criteria of the Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) (Williams et al., 1993), considering LDLc levels ≥ 210 mg/dL in adults (≥ 18 years) and ≥ 190 mg/dL in children (< 18

years). First and 2nd degree relatives without genetics variants in the genes evaluated, with the same lifestyle and diet were included as controls (**Figure 1**). Individuals with hepatic or hematological diseases, descompensated diabetes mellitus (HbA1c >7,0%), obesity (BMI > 30 Kg/m² for adults and BMI Zscore > +2 for children), inflammatory and thyroid diseases, triglycerides > 400 mg/dL and HIV carriers were excluded in both groups.

The genetic characterization of both groups was performed as described in our previous study (Silvino et al., 2020), with the sequencing of *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *LIPA*, *STAP1*, *APOE*, *ABCG5* and *ABCG8* genes by next generation sequencing (NGS) in ICs. Individuals who did not show variants by NGS analysis were also submitted to the MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification) technique to track copy number variants (CNVs) in the *LDLR* gene. DNA sequencing of family members was performed using the Sanger method after characterizing the patient's genetic variant. Thus, in the present study, those carrying genetic variants in at least one of the investigated genes were considered to have FH, and also they were included in the case-group.

Subjects were then classified according to statin use. In the group of patients carriers genetic variants (n=16), 13 were using statins (Simvastatin, Atorvastatin or Rosuvastatin), while in the group of patients non-carriers genetic variants (n=16), only 3 were using statins (Simvastatin and Atorvastatin).

2.2 Ethical aspects

The present study was approved by the Research Ethics Committee of the UFMG (COEP-UFMG) (Project CAAE-76387417.6.0000.5149) and by the Ethics Committee of the University of São Paulo (CAAPesqprotocolo100594212.0.1001.0068) and selected participants and/or their legal representatives were informed about the research and those who agreed signed a Free and Informed Consent Form.

2.3 Quantification of microparticles

MPs analysis in plasma was performed by flow cytometry as previously described (Campos et al., 2010). The antibodies and fluorochromes used in this panel were: CD51/61-FITC (endothelial cells - EMP), CD142-PE (MPs expressing tissue factor - TFMP), CD41a-PE-Cy7 (platelets - PMP) and anti-caveolin3-AlexaFluor 647 (cardiomyocytes - CardioMP). AnnexinV-eFluor450 was used to identify phosphatidylserine (PS) in total-MPs. All antibodies-fluorochromes were from Thermo Fisher Scientific® (San Diego, USA). The MPs were assessed in CytoflexS® (Beckman Coulter Inc, Brea, USA).

Firstly, the platelet-poor plasma (PPP) samples were thawed at 37°C and centrifuged at 13,000×g for 3 min. The supernatant of the platelet-free plasma (PFP) was aspirated and diluted 1:3 in citrate phosphate buffered saline (PBS) containing heparin. The diluted sample was centrifuged at 15,000×g for 90 min at 15°C. The MPs pellet was then resuspended in 10× annexin V binding buffer Thermo Fisher Scientific® (San Diego, USA).

The number of MPs/μL of plasma was calculated as: $MPs/\mu L = (N \times 400)/(60 \times 100)$, in which N is the number of events, 400 is the total volume of the tube before analysis, 60 is the sample volume analyzed, and 100 is the original volume of MPs suspension used to perform the phenotyping protocol. The cytometer was programmed to operate at a high flow rate setting for 60 seconds for each sample (50.000 events, each). Calibration microbeads (The Flow Cytometry Submicron Particle Size Reference Kit, by Thermo Fisher Scientific®), ranging in diameter from 0.02 μm to 2.0 μm, were used to identify MPs according to their sizes. Analysis was performed using the FlowJo® software (Tree Star).

2.4 LDLc and Lipoprotein(a) quantification

The LDLc values, obtained from medical records, were evaluated in the patients' baseline conditions, that is, without treatment. However, in patients receiving lipid-lowering treatment, baseline LDLc was estimated using conversion factors reported in the literature according to Foody et al. (2013) and Ballantyne et al. (2014).

The quantification of Lp(a) was carried out in serum using the Atellica CH® diagnostic kit whose analytical principle is the turbidimetry method, using the Atellica Siemens Healthineers® analyzer.

2.5 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the R Platform version 4.2.2 program. Qualitative variables were described as absolute and relative frequencies of their categories, and quantitative variables through measures of central tendency (median and interquartile range – IQ, or mean \pm standard deviation). The normality test applied was the Shapiro-Wilk. The association between qualitative variables was tested using the chi-square test, with p-value calculation via Monte Carlo simulation when necessary. Comparison of the central tendency of quantitative variables between groups was performed using the Student T-test or Mann-Whitney test for two groups, Kruskal-Wallis for three or more groups. Correlation analysis was performed using Spearman test. The significance level adopted was 5%.

3 Results

The case group consisted of 14 individuals with genetic variants in the LDLR gene (13 carrying Asp224Asn variant, included 1 IC and 1 IC carrying Cys34Arg variant) plus 2 individuals with genetic variant in the APOE gene (both carrying Pro28Leu variant, included 1 IC). The other 16 relatives were not carriers of these genetic variants and were classified as control group. There was no significant difference between groups regarding age, Lp(a) levels, sex, frequency of diabetes mellitus, hypertension, presence of corneal arch, xanthoma or xanthelasma, history of cardiovascular disease and smoking ($p > 0.05$ for all). However, body mass index (BMI) was higher in the group carrying genetic variants, as well as LDLc levels, as expected, since it is a diagnostic criteria for FH ($p=0.025$ and $p < 0.001$, respectively). Clinical and demographic characterization of case-group and control-group are summarized in **Table 1**.

Patients with FH who carry genetic variants had higher counts of annexin-positive total-MPs ($p=0.040$), Cardio-MPs ($p=0.010$), EMPs ($p=0.010$) and TFMPs ($p=0.010$), compared to the group of family members without FH and non-carriers. No significant difference was observed between the groups regarding PMPs count ($p=0.060$) (**Table 2**).

A significant and positive correlation was observed between LDLc levels and total-MPs count ($\rho=0.500$, $p=0.004$), Cardio-MPs ($\rho=0.509$, $p=0.030$), EMPs ($\rho=0.618$, $p<0.001$) and TFMPs ($\rho=0.623$, $p<0.001$). No correlation was observed with the PMPs count ($\rho= -0.326$, $p=0.068$). Interestingly, the total-MPs count also showed a significant correlation with Lp(a) levels ($\rho= 0.360$, $p=0.043$). As BMI, an interfering covariate, was higher in the group with FH, the correlation with the MPs count was verified and a correlation was observed only between BMI and Cardio-MPs ($\rho= 0.352$, $p=0.048$).

For total-MPs, higher counts were observed in the group of individuals with FH who were not using statins compared to individuals without FH and not using these drugs [15,182 (12,374 -17,516) MPs/ μ L and 8,553 (6,641-11,188) MPs/ μ L, respectively, $p=0.020$] (**Figure 2a**).

Likewise, higher Cardio-MPs and TFMPs counts were observed in the group of individuals with FH when compared to the group of individuals without FH, both not using statins [Cardio-MPs 9,726 (7,884-11,675) MPs/ μ L and 3,494 (2,799-5,832) MPs/ μ L, respectively, $p=0.020$] (**Figure 2b**); [TFMPs 4,736 (4,072-5,305) MPs/ μ L and 1,977 (1,554 – 3,117) MPs/ μ L, respectively, $p=0.020$] (**Figure 2c**).

The same pattern was observed for EMPs, in which individuals with FH had higher EMPs counts than individuals without FH, both groups not using statins [9,244 (7,932-10,118) MPs/ μ L and 1,326 (1,034-2,420) MPs/ μ L, respectively, $p<0.001$] (**Figure 2d**). In addition, a significant difference ($p=0.010$) was also observed in the group of carriers of variants with FH, in which individuals who were not using statins showed higher counts of EMPs than individuals who were using this drug [9,244 (7,932-10,118) MPs/ μ L and 3,531 (2,408-3,766) MPs/ μ L, respectively] (**Figure 2d**). PMPs showed no significant difference between

carriers of genetic variants with FH and non-carriers due to the use of statins ($p>0.050$ for all comparisons – data not shown).

4 Discussion

In this study, 32 individuals were evaluated, of which 16 were carriers of genetic variants related to FH, and 16 were 1st and 2nd degree family members who were not carriers of the variants found in family clusters. A higher count of total-MPs, Cardio-MPs, EMPs and TFMPs was observed in the group with FH compared to the group without FH. In addition, for these same MPs, a higher count was observed among individuals with FH without the use of statins, which suggests that these drugs may have a regulatory role in the release of MPs, either by a direct action in reducing cell activation or injury that gave rise to the evaluated MPs, or by reducing LDLc levels. In fact, MPs showed a positive correlation with LDLc levels, FH diagnostic criteria and risk markers for coronary artery disease, in agreement with our previous study (Carvalho et al., 2017). It is also important to emphasize the correlation of total-MPs with Lp(a), a marker currently related to FH (Izar et al, 2021).

Chen et al. (2020) analyzed the role of total-MPs in the atherosclerotic process and suggested that they may induce endothelial dysfunction, vascular inflammation, coagulation, thrombosis, and calcification through their protein components and non-coding RNAs that may promote atherosclerosis. MPs may represent important pathways of intercellular communication and act as messengers, accelerating the atherosclerosis process, and may become diagnostic biomarkers in the approach to atherosclerotic disease (Chen et al., 2020).

In another study, the impact of atherogenic lipoproteins on the production of MPs and their contents of microRNAs that produce protective factors, derived from human coronary artery smooth muscle cells, was evaluated (Gonzalo-Calvo et al., 2017). Individuals with FH who had not been treated with lipid-lowering drugs were evaluated, compared with normocholesterolemic individuals. The groups were paired based on the following criteria: age, sex and cardiovascular risk

factors (hypertension, diabetes, smoking, obesity, protein C reactive, Lp(a), family and personal history of CVD, HDLc, triglycerides). After quantitative analysis of circulating MPs derived from smooth muscle cells and their microRNA contents, a higher count of MPs with reduced microRNA within them was demonstrated in patients with FH than in control individuals (Gonzalo-Calvo et al., 2017). The findings of this study corroborate our results, which showed higher counts of total-MPs and MPs related to cardiovascular disease in patients with FH.

When the MPs were characterized according to cell origin, we observed that Cardio-MPs were significantly increased in FH group compared to non-FH. As far as we know, this is the first study that evaluates the relationship between Cardio-MPs and FH. Although cardiomyocytes are not considered as typical secretory cells, MPs can be released due to cellular activation, hypoxia, apoptosis, injury and inflammation, conditions that co-occur with coronary artery disease that presents early in individuals with FH (Chistiakov et al., 2016). It is known that cardiac cell dysregulation can be both a signal and a propagation mechanism of heart disease, requiring a better understanding of the role of MPs from cardiomyocytes in the development of FH (Wagner and Radisic, 2021). As the Cardio-MPs count was correlated with the BMI, which was higher in the FH group, further studies are needed in order to demonstrate dependence between these variables.

EMPs counts were higher in the group of individuals with FH compared to individuals without FH. In addition, in individuals with FH, the count was higher in non-users of statins when compared to those with FH and using statins, corroborating the hypothesis that statins reduce endothelial damage and, consequently, the release of EMPs. MPs originating from endothelial cells are suggestive of vascular pathologies (Curtis et al, 2013), being one of the cellular responses to an activated, compromised and damaged endothelium, placing EMPs as an early marker of vascular dysfunction in ACS, atherosclerosis, stroke (CVA), hypercholesterolemia, metabolic syndrome, obesity, diabetes, peripheral arterial disease (PAD), hypertension and heart failure. Therefore, EMPs are a predictive marker of vascular health (Curtis et al., 2013). Studies have shown a

significant elevation of circulating EMPs in association with coronary artery disease, suggesting that this elevation is not only related to coronary endothelial dysfunction, but is also associated with an increased risk of major cardiovascular events (Bernal-Mizrachi et al., 2004; Werner et al., 2006; Sinning et al., 2011; Finn et al., 2013; Schiro et al., 2014).

In a controlled study by Camargo et al. (2014), evaluating the effect of simvastatin associated with ezetimibe on MPs, no change was observed in platelet aggregation and in the amount of endothelial and circulating platelet MPs, concluding that cardiovascular protection after therapy with simvastatin/ezetimibe seems restricted to lipid changes and function improvement, not directly affecting the release of MPs, endothelial progenitor cell flow or decrease in platelet aggregation (Camargo et al., 2014). On the contrary, in another study, the evaluation of MPs carrying cellular markers of vascular and circulating cellular origin (platelets, endothelial cells, pan-leukocytes and their specific subsets) were significantly lower in the blood of hypercholesterolemic patients on lipid-lowering therapy with statins compared to hypercholesterolemic patients without treatment, in addition to a reduction in platelets, activated inflammatory cells and tissue factor (Suades et al., 2013), corroborating our findings. Furthermore, it was argued that the effect of lipid-lowering therapy on MPs clearance was cumulative over years and that patients on statin treatment had significantly lower numbers of MPs carrying activated cell markers, indicating that statins protect against cell activation vascular disorders (Suades et al., 2013). Another study, comparing two groups, one using atorvastatin 10 mg and the other using a 40 mg dose, showed that the group using 40 mg had a reduction in circulating EMPs and an increase in circulating endothelial cell progenitor cells in patients with ischemic cardiomyopathy, compared with the group using 10 mg. The effect was independent of the decrease in lipids, LDLox and ultrasensitive C-reactive protein (usCRP) (Huang et al., 2012).

In the analysis of MPs that express tissue factor (TFMPs), higher values were observed in individuals with FH who carry genetic variants. Tissue factor is highly expressed in atherosclerotic plaque and is upregulated by LDLox (Matsumoto et

al., 2004). Analyzing TFMPs in relation to lipid-lowering treatment with statins, a study was carried out to assess whether simvastatin would be able to inhibit tissue factor production in monocytes from hypercholesterolemic mice and monkeys, considering that hypercholesterolemia can produce a procoagulant state (Owens III et al., 2012). It has been hypothesized that hypercholesterolemia leads to elevated plasma LDLox levels and that this induces tissue factor expression in monocytes. Simvastatin treatment in hypercholesterolemic mice and monkeys reduced LDLox, and consequently, decreased monocyte tissue factor expression and TFMPs activity, reducing the prothrombotic state associated with hypercholesterolemia (Owens III et al., 2012). Other studies also obtained the same findings with the use of high-potency statins or in association with ezetimibe (Nomura et al., 2004; Montoro-Garcia et al., 2011; Huang et al., 2012; Suades et al., 2013).

In the evaluation of PMPs, no significant difference was observed comparing the groups regarding the presence of FH/genetic variants or the use of statins. The same finding was reported by Camargo et al. (2014) analyzing the effects of simvastatin/ezetimibe on MPs and platelet aggregation (Camargo et al., 2014). Considering that platelets play a central role in primary hemostasis due to aggregation, and secondary hemostasis because they exhibit procoagulant properties (Zhou et al., 2014; Varon and Shai, 2015), the data shows that individuals with FH in our study are young (mean aged 43,6 years) and probably they do not still show thrombus formation in atheromatous plaques in formation and hemostatic complications, conditions observed in more advanced processes. This study has some limitations, mainly the limited sample size with regard to the number of individuals carrying genetic variants who were not using statins. In addition, genetic variants in other uninvestigated genes related to LDL metabolism may be present in family members classified as non-FH. Thus, further studies should be conducted to evaluate the application of these markers in the evolution of atherosclerotic disease in individuals with FH.

5 Conclusion

MPs could be potential markers in the monitoring of atherosclerotic disease in individuals with FH. In addition, treatment with statins can reduce the amount of total-MPs, as well as Cardio-MPs, TFMPs and EMPs, potentially resulting in reduced activation of the cells of origin, and consequently, a decrease in the risk of cardiovascular diseases.

Acknowledgements:

ACT and KBG are grateful to CNPq Research Fellowship (PQ).

The authors would like to thank FAPEMIG and CNPq for kind support

Declarations of interest: The authors report there are no competing interests to declare.

Conflicts of Interest and Source of Funding.

The authors declare that there is no conflict of interests and Source of Funding.

6 References

Ballantyne, C.M.;Hoogeveen, R.C.; Raya, J.L.; Cain, V.A.; Palmer, M.K.; Karlson, B.W., 2014. GRAVITY Study Investigators. Efficacy, safety and effect on biomarkers related to cholesterol and lipoprotein metabolism of rosuvastatin 10 or 20 mg plus ezetimibe 10 mg vs. simvastatin 40 or 80 mg plus ezetimibe 10 mg in highrisk patients: results of the GRAVITY randomized study. *Atherosclerosis*, 232, 86e93

Bernal-Mizrachi, L., Jy, W., Fierro, C., et al., 2004. Endothelial microparticles correlate with high-risk angiographic lesions in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol*, 97, 439e46

Cahill, P. A.; Redmond, E. M., 2016. Vascular Endothelium – Gatekeeper of Vessel Health. *Atherosclerosis*, 248, 97e109

Camargo, L.M., Franc, C.N.,Izar, M.C., Bianco, H.T., Lins, L.S., Barbosa, S.P., Pinheiro, L.F.,Fonseca, F.A.H., 2014. Effects of simvastatin/ezetimibe on microparticles, endothelial progenitor cells and platelet aggregation in subjects

with coronary heart disease under antiplatelet therapy. *Braz J Med Biol Res*, 47, 432e437

Campos, F.M.F., Franklin, B.S., Teixeira-Carvalho, A., Filho, A.L.S., de Paula, S.C.O., Fontes, C.J., Brito, C.F., Carvalho, L.H., 2010. Augmented plasma microparticles during acute *Plasmodium vivax* infection. *Malar J*, 9, 327, 1e8

Carvalho, L.M.L., Ferreira, C.N., Soter, M.O., Sales, M.F., Rodrigues, K.F., Martins, S.R., Candido, A.L., Reis, F.M., Silva, I.F.O., Campos, F.M.F., Gomes, K.B., 2017. Microparticles: Inflammatory and haemostatic biomarkers in Polycystic Ovary Syndrome. *Mol Cell Endocrinol*, 443, 155e162

Chen, Y., Yuan, H., Ou, Z., Ou, J., 2020. Microparticles (Exosomes) and Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 23, 1e9

Chistiakov, D.A., Orekhov, A.N., Bobryshev, Y.V., 2016. Cardiac Extracellular Vesicles in Normal and Infarcted Heart. *Int J Mol Sci*, 17, 1e18

Curtis, A.M., Edelberg, J., Jonas, R., Rogers, W.T., Moore, J.S., Syed, W., Mohler III, E.R., 2013. Endothelial microparticles: Sophisticated vesicles modulating vascular function. *Vasc Med*, 18, 204e214.

Da Luz, P.L.; Chagas, A.C.P.; Dourado, P.M.M.; Laurindo, F.R.M., 2018. Endothelium in Atherosclerosis: Plaque Formation and its Complications in Endothelium and Cardiovascular Diseases. Editors P. L. DaLuz, P. Libby, A. C. P. Chagas, and F. R. M. Laurindo. Academic Press, 493e512

Finn, N.A., Eapen, D., Manocha, P., et al., 2013. Coronary heart disease alters intercellular communication by modifying microparticle-mediated microRNA transport. *FEBS Lett*, 587, 3456e3463

Foody, J.M.; Toth, P.P.; Tomassini, J.E.; Sajjan, S.; Ramey, D.R.; Neff, D.; Tershakovec, A.M.; Hu, H.; Tunceli, K., 2013. Changes in LDL-C levels and goal attainment associated with addition of ezetimibe to simvastatin, atorvastatin, or

rosuvastatin compared with titrating statin monotherapy. *Vasc Health Risk Manag*, 9, 719e727

Gonzalo-Calvo, D., Cenarro, A., Garlaschelli, K., Pellegatta, F., Vilades, D., Nasarre, L., Camino-Lopez, S., Crespo, J., Carreras, F., Leta, R., Catapano, A. L., Norata, G.D., Civeira, F., Llorente-Cortes, V., 2017. Translating the microRNA signature of microvesicles derived from human coronary artery smooth muscle cells in patients with familial hypercholesterolemia and coronary artery disease. *J Mol Cell Cardiol*, 106, 55e67

Huang, B., Cheng, Y., Xie, Q., Lin, G., Wu, Y., Feng, Y., Gao, J., Xu, D., 2012. Effect of 40 mg Versus 10 mg of Atorvastatin on Oxidized Low-Density Lipoprotein, High-Sensitivity C-Reactive Protein, Circulating Endothelial-Derived Microparticles, and Endothelial Progenitor Cells in Patients With Ischemic Cardiomyopathy. *Clin Cardiol*, 35, 125e130

Iacocca, M.A., Chora, J.R., Carrie, A., Freiburger, T., Leigh, S.E., Defesche, J.C., Kurtz, C.L., et al., 2018 ClinVar database of global familial hypercholesterolemia-associated DNA variants. *Human Mutation*, 39, 1631e1640

Izar, M.C.O.; Giraldez, V.Z.R.; Bertolami, A.; Santos, R.D.; Lottenberg, A.M.; Assad, M.H.V.; Saraiva, J.F.K.; Chacra, A.P.M.; Martinez, T.L.R.; Bahia, L.R.; Fonseca, F.A.H.; Faludi, A.A.; Sposito, A.C.; et al., 2021. Atualização da Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar – 2021. *Arq Bras Cardiol*, 117, 782e844

Jannes, C.E., Silvino, J.P.P., Silva, P.R.S., Lima, I.R., Tada, M.T., Oliveira, T.G.M., Santos, R.D., Krieger, J.E., Pereira, A.C., 2022. Screening for Familial Hypercholesterolemia in Small Towns: Experience from 11 Brazilian Towns in the Hipercolbrasil Program. *Arq Bras Cardiol*, 118, 669e677

Khera, A.V., Won, H.H., Peloso, G.M., Lawson, K.S., Bartz, T.M., Deng, X., Leeuwen, E.M., Natarajan, P., Emdin, C.A., Bick, A.G., Morrison, A.C., Brody, J.A., Gupta, N., et al., 2016. Diagnostic yield and clinical utility of sequencing familial

hypercholesterolemia genes in patients with severe hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*, 67, 2578e2589

Marques, F.K., Campos, F.M.F., Filho, O.A.M., Carvalho, A.T., Dusse, L.M.S., Gomes K.B., 2012. Circulating microparticles in severe preeclampsia. *Clin Chim Acta*, 414, 253e258

Montoro-García, S., Lip, G.Y.H., Shantsila, E., 2011. Atorvastatin and its collateral effects on microparticles. *Thromb Haem*, 106, 185e186

Motta, N.A.V., Fumian, M.M., Castro, J.P., Brito, F.C.F., 2013. Inflammation and Atherosclerosis: New Biomarkers and Outlooks for Treatment. *Rev Bras Cardiol*, 26, 390e399

Mundi, S., Massaro, M., Scoditti, E., Carluccio, M.A., VanHinsbergh, V.W.M., Iruela-Arispe, M.L., Caterina R., 2018. Endothelial Permeability, LDL Deposition, and Cardiovascular Risk Factors - A Review. *Cardiovasc Res*, 114, 35e52

Nomura, S., Shouzu, A., Omoto, S., Nishikawa, M., Iwasaka, T., 2004. Effects of Losartan and Simvastatin on Monocyte-Derived Microparticles in Hypertensive Patients with and Without Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin Appl Thrombosis/Hemostas*, 10, 133e141

Nordestgaard, B.G., Chapman, M.J.; Humphries, S.E.; Ginsberg, H.N., Masana, L., Descamps, O.S., Wiklund, O., Hegele, R.A., Raal, F.J., et al., 2013. Familial hypercholesterolemia is underdiagnosed and undertreated in general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease. European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*, 34, 3478e3490

Normura, S., Ozaki, Y., Ikeda, Y., 2008. Function and role of microparticles in various clinical settings. *Thromb Res*, 123, 8e23

Owens III, P., Passam, F.H., Antoniak, S., Marshall, S.M., McDaniel, A.L., Rudel, L., Williams, J. C., Hubbard, B.K., Dutton, J., Wang, J., Tobias, P.S., Curtiss,

L. K., et al., 2012. Monocyte tissue factor–dependent activation of coagulation in hypercholesterolemic mice and monkeys is inhibited by simvastatin. *J Clin Invest*, 122, 558e568

Ricard, N., Bailly, S., Guignabert, C., Simons, M., 2021. The Quiescent Endothelium: Signalling Pathways Regulating Organ-specific Endothelial Normalcy. *Nat Rev Cardiol*, 18, 565e580

Rodrigues, K.F., Pietrani, N.T., Fernandes, A.P., Bosco, A.A., Sousa, M.C.R., Silva, I.F.O., Silveira, J.N., Campos, F.M.F., Gomes, K.B., 2018. Circulating microparticles levels are increased in patients with diabetic kidney disease: A case-control research. *Clin Chim Acta*, 479, 48e55

Schiro, A., Wilkinson, F.L., Weston, R., Smyth, J.V., Serracino-Inglott, F., Alexander, M.Y., 2014. Endothelial microparticles as conveyors of information in atherosclerotic disease. *Atherosclerosis*, 234, 295e302

Scicali, R., Di Pino, A., Platania, R., Purrazzo, G., Ferrara, V., Giannone, A., Urbano, F., Filippello, A., Rapisarda, V., Farruggia, E., Piro, S., Rabuazzo, A.M., Purrello, F., 2018. Detecting familial hypercholesterolemia by serum lipid profile screening in a hospital setting: Clinical, genetic and atherosclerotic burden profile. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 28, 35e43

Silva, P.R.S., Jannes, C.E., Marsiglia, J.D.C., Krieger, J.E., Santos, R.D., Pereira A.C., 2016. Predictors of cardiovascular events after one year of molecular screening for Familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 250, 144e150

Silvino, J.P.P., Jannes, C.E., Tada, M.T., Lima, I.R., Silva, I.F.O., Pereira, A.C., Gomes, K.B., 2020. Cascade screening and genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia in clusters of the Southeastern region from Brazil. *Mol Biol Rep*, 47, 9279e9288

Sinning, J.M., Losch, J., Walenta, K., et al., 2011. Circulating CD31p/AnnexinVp microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *Eur Heart J*, 32, 2034e2041

Sturm, A.C, Knowles, J.W., Gidding, S.S, Ahmad, Z.S., Ahmed, C.D., Ballantyne, C.M., Baum, S.J., Bourbon, M., Carrié, A., Cuchel, M., Ferranti S.D., Defesche, J.C., Freiburger, T., Hershberger, R.E.,Hovingh, K., et al., 2018. Convened by the Familial Hypercholesterolemia Foundation. Clinical Genetic Testing for Familial Hypercholesterolemia: JACC Scientific Expert Panel. *J Am Coll Cardiol*,72, 662e680

Suades, R., Padró, T., Alonso, R., Mata, P.,Badimon, L., 2013. Lipid-lowering therapy with statins reduces microparticle shedding from endothelium, platelets and inflammatory cells indicating protection against cell activation. *Thromb Haem*, 110, 366e377

Varon, D., Shai, E., 2015. Platelets and their microparticles as key players in pathophysiological responses. *J Thromb Haemost*, 13, 40e46

Wagner,K.T.,Radisic, M., 2021. A New Role for Extracellular Vesicles in Cardiac Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Adv Nanobiomed Res*,11, 1e45

Werner, N., Wassmann, S., Ahlers, P., et al., 2006. Circulating CD31p/annexinVp apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26, 112e116.

Zhou, X.L., Qi, M.X., Xu, Y., Mao, M.L., Liu, H.M., Song H., 2014. Microparticles: new light shed on the understanding of venous thromboembolism. *Acta Pharmacol Sin*, 35, 1103e1110

Table 1 – Clinical and demographic characterization of carrier and non-carrier groups of genetic variants related to Familial Hypercholesterolemia.

Variables	Non-carriers (n= 16)	Carriers (n= 16)	P value
GeneticVariants		Asp224Asn(n= 13) Cys34 Arg (n=1) Pro28Leu (n=2)	
LDLc (mg/dL)	139.1± 36.5	294.8±81.7	<0.001*
Lp(a) (mg/dL)	13.4 (10.0-22.10)	19.8 (10.0-48.2)	0.216
Age (years)	31.9 ±21.7	43.6 ±12.2	0.064
Gender (%)			
Male	20	23,5	0.810
Female	80	76.5	
BMI (Kg/m ²)	21.7±5.5	26.3±5.2	0.025*
Corneal arch (%)	0	12	0.486
Xanthomas/ Xanthelasma (%)	0	23	0.104
CVD history (%)	6.7	5.9	0.927
Diabetes mellitus (%)	0	0	1.000
Hipertension (%)	13.3	23.5	0.659
Smoking (%)			
Non-smokers	100	88.2	0.390
Ex-smokers [#]	0	5.9	
Smokers	0	5.9	

*Continuous variables expressed as median (interquartile range - 25th-75th) or mean ± standard deviation, categorical variables expressed as frequency. Data not normally distributed were compared by Mann–Whitney U test. Data normally distributed were compared by Student T-test. BMI=Body Mass Index; CVD=cardiovascular disease. * Significant p<0.05. # up to 1 year before collection.*

Table 2 – Microparticles (MPs) count between carrier and non-carrier groups of genetic variants related to Familial Hypercholesterolemia.

MPs/ μL	Non-carriers (n= 16)	Carriers (n= 16)	P value
Total-MPs	8386 (6600-8386)	10966 (8713-17121)	0.040*
CardioMPs	3922 (2861-5425)	7496 (5456-11439)	0.010*
EMPs	1904 (1138- 2927)	3682 (2441 -5927)	0.010*
TFMPs	1982 (1673-2933)	3908 (2882 -5724)	0.010*
PMPs	2279 (1408-4220)	1200 (635-1708)	0.060

*MPs: microparticles; Total-MPs: MPs marked with AnnexinV-eFluor450; CardioMPs: MPs derived from cardiomyocytes; EMPs: MPs derived from endothelial cells; TFMPs: MPs that express tissue factor in surface; PMPs: MPs derived from platelets. Data not normally distributed were expressed as median (25th-75th) and compared by Mann-Whitney U test. *Significant $p < 0.05$*

Figure 1 – Flowchart of selection the participants

From the Itinerant Hipercol Brazil program, 3 ICs were selected based on Dutch criteria and were sequenced in 9 genes related to FH by NGS or MLPA. After the genetic variant detected in ICs (*Asp224Asn* and *Cys34Arg* in *LDLR* gene, *Pro28Leu* in *APOE* gene), 1st and 2nd degree relatives were included, in a total 29 individuals were sequenced by the Sanger technique to search the variant detected in ICs. 13 individuals carrying the genetic variants (12 in *LDLR* gene *Asp224Asn* and 1 in *APOE* gene *Pro28Leu*) and 3 IC formed the case group and 16 individuals not carrying the genetic variants formed the control group.

Figure 1

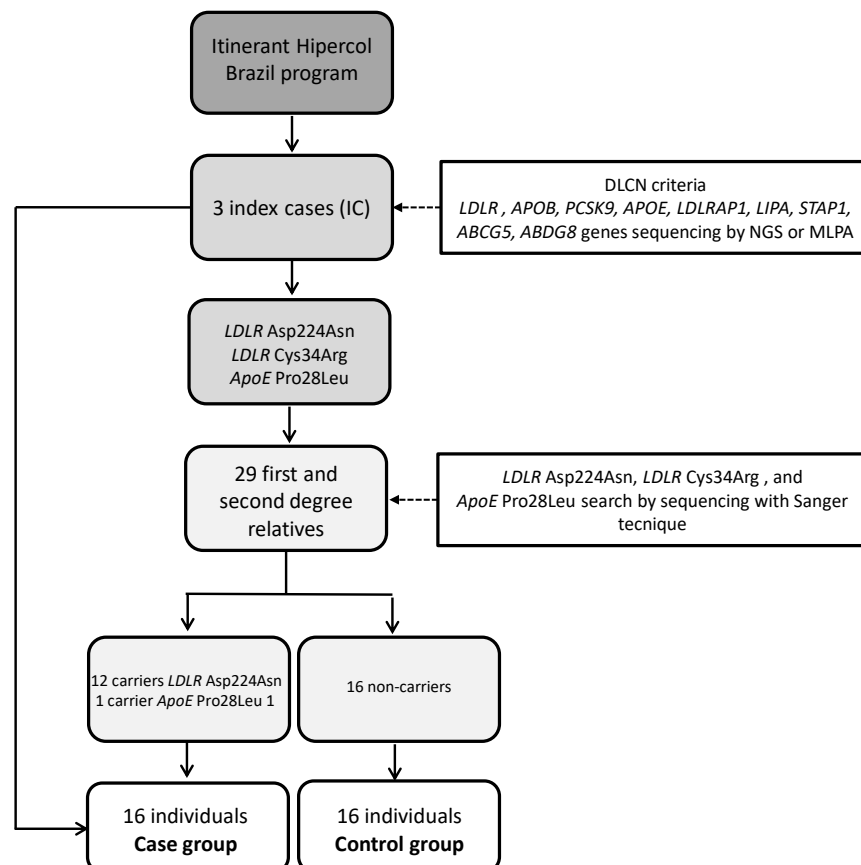


Figure 2a – Total-MPs analyses comparing carriers and non-carriers related the use of statins.

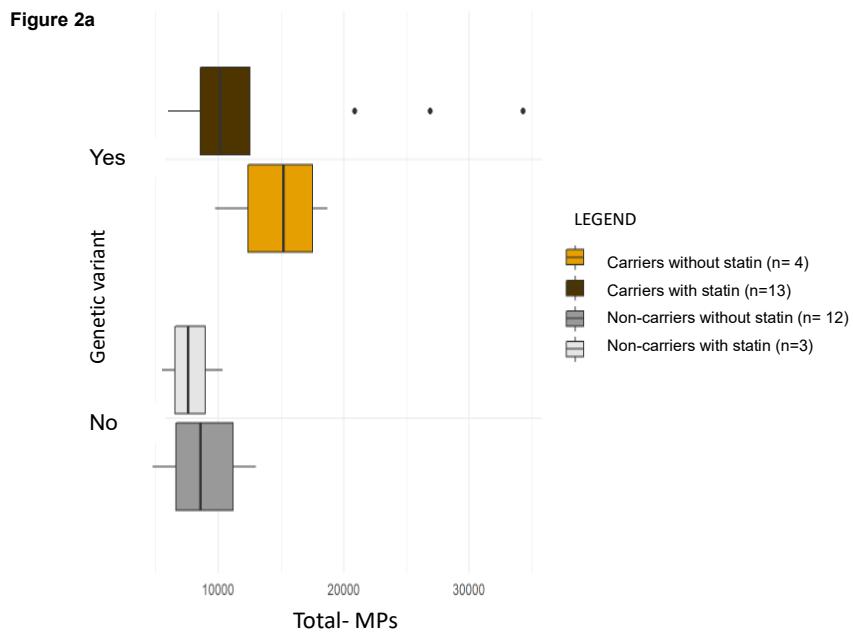


Figure 2b – Cardio-MPs analyses comparing carriers and non-carriers related the use of statins

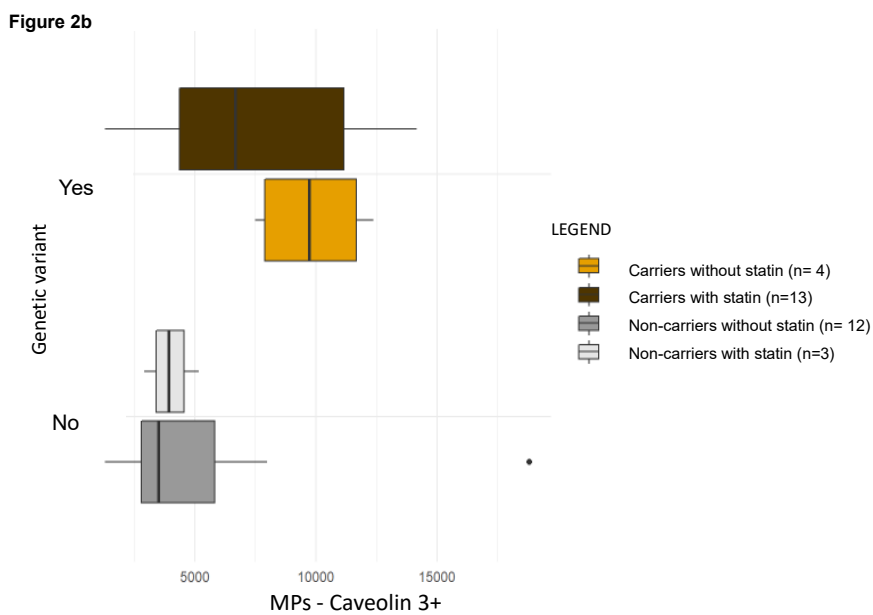


Figure 2c – TFMPs analyses comparing carriers and non-carriers related the use of statins

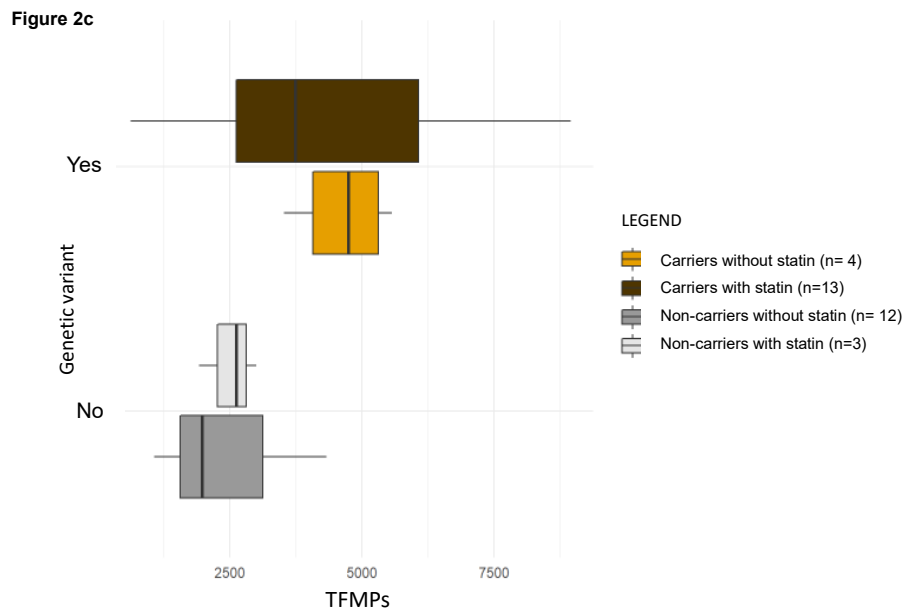
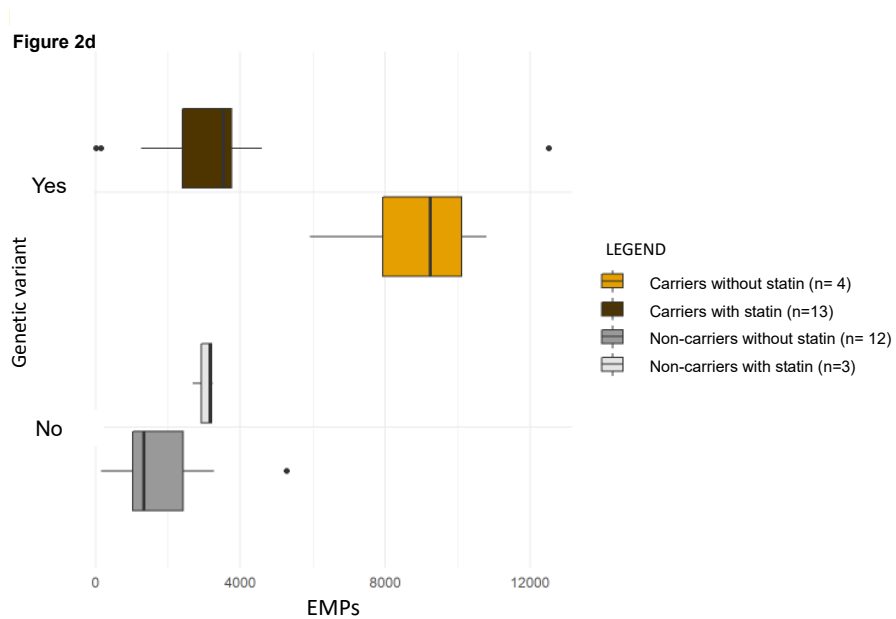


Figure 2d – EMPs analyses comparing carriers and non-carriers related the use of statins



8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo tem como originalidade a avaliação de novos marcadores de risco cardiovascular em indivíduos portadores de HF, os quais ainda não são aplicados na prática clínica de rotina, mas que mostraram ser potenciais no acompanhamento na evolução da doença aterosclerótica, condição esta comum e precoce em pacientes com HF devido à exposição de altos níveis da lipoproteína de baixa densidade desde a infância.

Dessa forma, destacam-se os seguintes resultados do presente estudo:

- A região de Bom Despacho-MG tem uma alta prevalência de HF, servindo como alerta à vigilância de saúde em relação à incidência de desfechos por doenças cardiovasculares nessa população
- Níveis muito elevados de LDLc e Lp(a) podem ser indícios da presença de variantes genéticas relacionadas à hipercolesterolemia familiar
- FABP4 e Lp(a) mostraram-se úteis na distinção entre carreadores e não-carreadores de variantes genéticas relacionadas à HF.
- FABP3 não foi capaz de diferenciar indivíduos carreadores dos não-carreadores de variantes genéticas, mas níveis aumentados foram constatados em usuários de estatinas, requerendo maiores estudos para esclarecimento dessa relação
- Micropartículas originárias de cardiomiócitos, células endoteliais e que expressam fator tissular mostraram-se mais elevadas em indivíduos carreadores de variantes e que não estavam em tratamento com estatinas em comparação aos não-carreadores que não estavam em uso de estatinas

A avaliação dos marcadores de risco cardiovascular GDF-15, CXCL16, FABP4, FAP3, LIGHT, sCD14, ucMGP foi motivada pelo fato de existirem poucos estudos a respeito destes marcadores até o presente momento, mas representa uma etapa preliminar para que novos estudos sejam conduzidos para confirmação dos nossos resultados.

Devido ao risco da doença aterosclerótica se desenvolver de forma precoce na hipercolesterolemia familiar, constatações sobre a relação dos critérios clínicos e bioquímicos em relação ao encontro de variantes genéticas aumentando a acurácia no diagnóstico precoce, bem como o rastreamento familiar, tornam-se cada vez mais desejável na redução de desfechos cardiovasculares em certas populações.

O tratamento com estatinas e seus efeitos pleiotrópicos como redução da inflamação, trombose e disfunção endotelial ficaram evidenciados pela avaliação das MPs oriundas de cardiomiócitos, células endoteliais e expressão de fator tissular de monócitos, mostrando que o tratamento com esses fármacos pode mudar a história natural da HF.

Em conclusão, as observações desse estudo tornam-se relevantes para que novos estudos sejam conduzidos para melhor compreensão da utilidade destes novos marcadores de risco cardiovascular, em uma população geneticamente caracterizada para a HF.

9 PERSPECTIVAS

- 1) Validar os marcadores Lp(a), FABP3, FABP4 e as MPs em uma população amostral maior com HF.
- 2) Estudo de follow-up com estes pacientes para diagnóstico das complicações cardiovasculares.
- 3) Amplificação da testagem para outros membros familiares dos CI
- 4) Correlacionar Lp(a) com Geração de Trombina para avaliar o sistema fibrinolítico
- 5) Criação de serviço de atendimento e educação para Hipercolesterolemia Familiar em parceria com a prefeitura de Bom Despacho para assistência multidisciplinar aos portadores da doença e posterior ampliação para atendimento às formas raras de dislipidemias.

Anexo I- Aprovação do COEP/UFMG




UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE 76387417.6.0000.5149

Interessado(a): Profa. Iêda de Fátima Oliveira Silva
Depto. Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 01 de novembro de 2017, o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação de marcadores bioquímicos, inflamatórios e hemostáticos em portadores de hipercolesterolemia familiar: correlação com tratamento farmacológico"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.


Prof. Dra. Vivian Resende
Coordenadora do COEP-UFMG

Anexo II- Participação em Congresso com Apresentação de Pôster

CBEM 2018
33º Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia
7 a 11 de agosto
Belo Horizonte - MG

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

TRATAMENTO DA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR: RELAÇÃO COM OS VALORES DE COLESTEROL TOTAL E FRAÇÕES

dos autores: JUNEIA PAOLUCCI PAIVA SILVINO; JÚNEIA PAOLUCCI DE PAIVA SILVINO; ANA PAULA LUCAS MOTA; KARINA BRAGA GOMES; ALESSANDRA CÁSSIA LOVATO; MÁRCIO CLÁUDIO GUIMARÃES JARDIM; MARIA DAS GRAÇAS CARVALHO, foi apresentado, na modalidade Pôster Impresso, no evento 33º Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia ocorrido de 07 a 11 de agosto de 2018 no Expominas em Belo Horizonte/MG.

Belo Horizonte, 11 de agosto de 2018

Paulo Augusto Carvalho Miranda
PAULO AGUSTO CARVALHO MIRANDA
Presidente do 33º Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia

Alexandre Hoehl
ALEXANDRE HOHL
Presidente da Comissão Científica do 33º Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia
Vice-Presidente da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM)

Fábio Trujillo
FÁBIO TRUJILLO
Presidente da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM)

Realização
SBEM
Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia
SBEM
Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia Regional Minas Gerais

66407 TRATAMENTO DA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR: RELAÇÃO COM OS VALORES DE COLESTEROL TOTAL E FRAÇÕES

Juneia Paolucci Paiva Silvano¹, Ana Paula Lucas Mota², Karina Braga Gomes², Alessandra Cássia Lovato², Márcio Cláudio Guimarães Jardim², Maria das Graças Carvalho²

¹ Santa Casa Bom Despacho. ² Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) ³ Laboratório Márcio Jardim

Introdução: A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença genética de transmissão autossômica dominante, caracterizada por níveis elevados da LDL-c. No Brasil, estima-se que menos de 1% dos casos de HF é diagnosticado e tratado apropriadamente, uma vez que os pacientes podem apresentar episódios coronarianos precocemente. A recomendação para tratamento de primeira linha seria o uso das estatinas (rosuvastatina, atorvastatina). A ezetimiba é outro fármaco que atua inibindo a absorção de colesterol na borda em escova do intestino delgado. **Objetivo:** Este estudo objetiva avaliar o perfil lipídico em pacientes com HF submetidos a diferentes esquemas terapêuticos. **Método:** Foram selecionados 39 pacientes portadores de HF entre crianças e adultos (faixa etária de 5 a 85 anos), sendo 25% do sexo masculino e 75% do sexo feminino, submetidos à determinação do perfil lipídico. Os pacientes foram classificados em três grupos não tratados e tratados, sendo esse último definido como: 1 = ezetimiba, 2 = estatinas e 3 = estatinas + ezetimiba. A análise estatística foi realizada pelo programa SPSS versão 17. **Resultados:** Os dados foram expressos como média ± SD e mediana e IQ. Não foi observada relação entre as variáveis de perfil lipídico em relação à idade ($p > 0,05$). Foram observados maiores níveis de colesterol total (CT) – 279,7 (188,0) – e HDL-c – 57,0 ± 11,8 – nas mulheres, quando comparadas aos homens – 198,4 (119,0), $p = 0,040$, 48,6 ± 8,9; $p = 0,048$, respectivamente. Níveis de CT, LDL-c, não HDL-c e triglicérides (TG) foram mais elevados em pacientes não tratados – 400,6 (136,0); 322,0 (107,0); 349,3 (115,0); 136,1 ± 43,7, respectivamente –, em comparação aos tratados – 209,9 (98,0); 134,6 (9,0); 153,9 (109,0); 96,3 ± 49,3, respectivamente; $p < 0,001$. Quanto ao tipo de tratamento, foram observados maiores níveis de CT [229,0 (86,0)], LDL-c [146,0 (107,0)] e não HDL-c [173,0 (102,0)] no grupo 2 quando comparado ao grupo 3 – 149,0(67,0) $p = 0,013$; 73,5 (65,0), $p = 0,004$ e 82,50 (63,0), $p = 0,007$. **Conclusão:** As mulheres apresentaram níveis de HDL-c mais elevados em relação aos homens, porém apresentam também maiores níveis de CT. Além disso, pacientes não tratados apresentam perfil lipídico mais desfavorável para a evolução de doença coronariana. Contudo, a terapia combinada (estatinas + ezetimiba) mostrou-se mais eficaz na redução dos níveis lipídicos de pacientes com HF. Agradecimentos: CNPq e Fapemig.

**Anexo III- Participação com Resumo nos Anais do Congresso Internacional
Endo 2020**

**Cardiovascular Endocrinology
PATHOPHYSIOLOGY OF CARDIOMETABOLIC
DISEASE**

*Genetic Variants Related to Familial
Hypercholesterolemia in Clusters from Minas Gerais -
a Southeast State of Brazil*

*Jéssica Paolucci de Paiva Sálcios, MDr¹, Cíntia Elton Jesus,
PhD², Maurício Terezo Tada, PhD², Isabella Ramos Lima, PhD²,
Isela Fátima Oliveira Silva, PhD², Karina Braga Gomes, PhD²,
Alexandre Costa Pereira, PhD²*

¹Faculdade de Medicina UFMG, Belo Horizonte, Brazil, ²Instituto do Coração, São Paulo, Brazil, ³Faculdade de Farmácia UFMG, Belo Horizonte, Brazil.

SUN-561

Familial Hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant genetic disease, characterized by high levels of the cholesterol fraction present in low density lipoprotein (LDL_c). FH is associated to early atherosclerotic coronary disease, which can result in acute myocardial infarction and angina pectoris. Clinical diagnosis of FH in adults is based on elevated LDL_c levels $\geq 4,9$ mmol/L, and total cholesterol (TC) $\geq 7,5$ mmol/L; in untreated children and adolescents LDL_c $\geq 4,0$ mmol/L, and TC $\geq 6,7$ mmol/L, associated or not with physical signs (xanthomas, corneal arch). In Brazil, it is estimated that there are from 402,000 to 607,000 cases of FH. This study aimed to evaluate the genetic variants related to FH in a small region from Minas Gerais, a southeast state in Brazil. Fifteen index cases (IC) were selected in two cities (Bom Despacho and Moema), that comprise 1.416 km² in that region. Family members (n=69) were also selected, when possible, for genetic analysis, which was carried out by the NGS (Next Generation Sequencing) method, using Illumina® technology. Six different genetic variants were identified: 1) Pathogenic variants in LDLR gene - Asp234Asn in 74 individuals (10 IC); Cys34Arg in 1 individual (1 IC); Asp601His in 2 individuals (1 IC); and Ser854Gly in 2 individuals (1 IC); 2) Variant of uncertain significance (VUS) in APOB gene - Met499Val in 1 individual (1 IC); and 3) VUS in PCSK9 gene - Arg237TRP in 4 individuals (1 IC). All variants were identified in heterozygosis. The data suggest that the high

185

JESOCI, Volume 4, Abstract Supplement, 2020

A186 | Journal of the Endocrine Society | doi: 10.1210/endoabstracts046

prevalence of FH in that small region in Brazil is related to inbreeding observed in the families investigated. In addition, a founder effect could also contribute to the elevated frequency of LDLR gene variants, mainly Asp234Asn. The data show the importance of molecular investigation on clinical conduct in FH Brazilian patients and their family members.

Anexo IV- Participação com Resumo no Congresso Multidisciplinar de Análises Clínicas e Toxicológicas



Brazilian Journal of
HEALTH AND PHARMACY

Volume 3, Suplemento 1, 2021

2.3. FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA: ASSESSMENT OF LIPID PROFILE AND CORRELATION WITH TREATMENT

Júnea P.P. Silvino¹; Maria G. Carvalho²; Edna A. Reis¹; Ana P.L. Mota¹; Karina B. Gomes¹; Rita C.F. Duarte¹; Márcio C.J. Guimarães²; Maíra.C.R. Sousa¹; Pâmela S. Azevedo¹; Iêda F.O. Silva¹.

¹Universidade Federal de Minas Gerais, MG; ²Laboratório Márcio Jardim, MG.

Introduction: Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant genetic disease, characterized by high levels of low-density lipoprotein cholesterol (LDLc). The prevalence of FH has previously been reported as 1 in 500 in the general population. **AIM:** This study aimed to evaluate lipid profile in FH patients undergoing treatment or not with lipid-lowering drugs. **Methods:** Eighty individuals with FH were selected in Bom Despacho region from Minas Gerais state and distributed in 2 groups: individuals treated with statins alone or conjugate therapy (statin + ezetimibe) (T= 53) and those non treated (NT= 27). The lipid profile was determined by colorimetric enzymatic method. Statistical analyzes were performed using software Minitab version 17. **Results:** The NT participants presented significantly higher plasma levels compared to the T, for all parameters of the lipid profile including total cholesterol (TC), LDLc and triglycerides ($p < 0.05$), except for the high density lipoprotein cholesterol (HDLc). Individuals treated with conjugate therapy (statin + ezetimibe) showed a significant reduction in the levels of TC and LDLc compared to the treated individuals with monotherapy (statins). **Conclusion:** In general, our findings suggest that combined therapy for the treatment of FH is associated with a significant improvement in lipid profile, and, therefore, more promising compared to the use of statin monotherapy.

Anexo V- Participação no Congresso com Apresentação de Temas Livres – Endorecife 2021



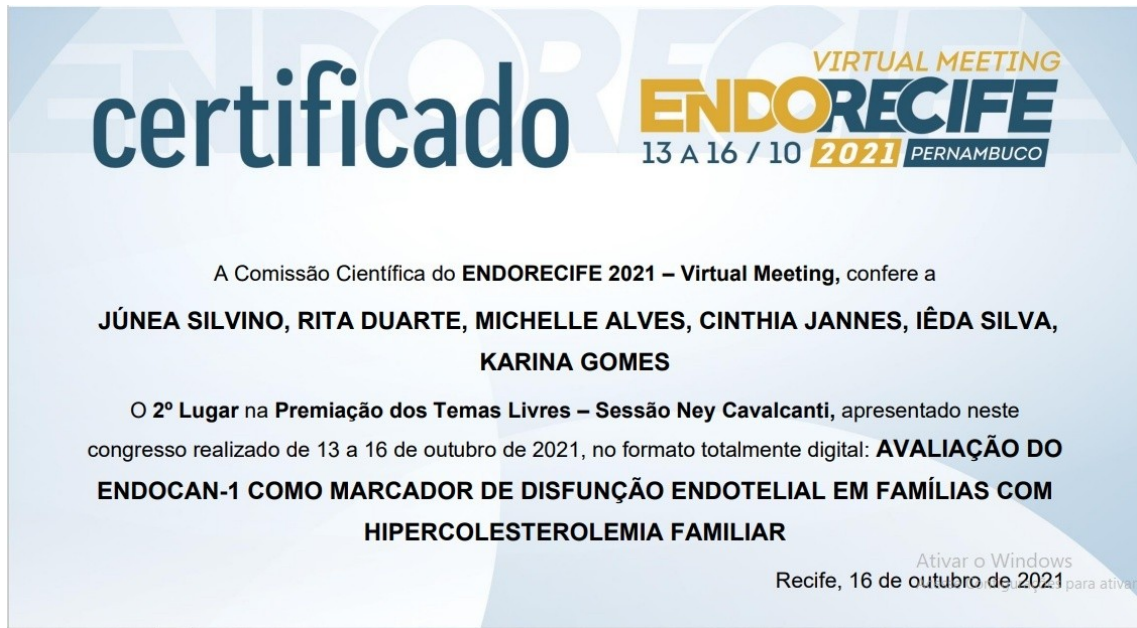
T01 AVALIAÇÃO DO ENDOCAN-1 COMO MARCADOR DE DISFUNÇÃO ENDOTELIAL EM FAMÍLIAS COM HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR

Júnea Silvino¹, Rita Duarte¹, Michelle Alves¹, Cinthia Jannes², Iêda Silva¹, Karina Gomes¹

¹ Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); ² Universidade de São Paulo (USP)

Introdução: A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença genética de transmissão autossômica dominante, caracterizada por níveis elevados da fração de colesterol presente na lipoproteína de baixo peso molecular (LDLc), tendo como consequência a doença coronariana aterosclerótica precoce nesses pacientes. O EndoCan-1 (molécula-1 específica da célula endotelial) é um proteoglicano de sulfato de dermatan solúvel, expresso pelo endotélio vascular, envolvido na adesão celular em distúrbios inflamatórios. Citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento pró-angiogênicos aumentam a expressão e a secreção de EndoCan pelas células endoteliais.

Material e métodos: Foram selecionados 116 indivíduos com níveis elevados de LDLc de famílias com suspeita de HF. Desses, 76 apresentaram variantes genéticas em heterozigose identificadas por sequenciamento NGS nos genes *LDLR* (Asp224Asn, deleção do éxon 15, Ser854Gly, Cys34Arg, Asp601His), *APOB* (Met499Val), *PCSK9* (Arg237Trp) e *APOE* (Pro281Leu) – grupo I. Em 40 indivíduos, não foi identificada a variante genética relacionada à HF – grupo II. A dosagem de EndoCan-1 foi feita por método ELISA. As análises estatísticas foram realizadas em programa SPSS v.21, sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$. O estudo teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. **Resultados:** A idade média dos indivíduos com variante genética identificada ($40,8 \pm 21,3$) não diferiu idade média do grupo sem variante genética ($39,7 \pm 22,6$). Os níveis de EndoCan-1 não mostraram diferença significativa entre os dois grupos – 594 (intervalo interquartilico [IQR] = 1104) para o grupo I; 911 (IQR = 1009) para o grupo II; $p = 0,330$. Para ambos os grupos, os níveis de EndoCan-1 foram correlacionados positivamente com a idade ($p = 0,22$ e $p = 0,05$ para o grupo I, $p = 0,531$ e $p < 0,001$ para o grupo II). **Conclusão:** Os dados sugerem que o nível de lesão endotelial é semelhante entre os familiares com HF, a despeito de variantes genéticas identificadas, e que essa lesão aumenta com a idade dos indivíduos. Os resultados indicam que as medidas preventivas de doenças cardiovasculares devem incluir todos familiares de pacientes com HF. **Palavras-chave:** Variante genética, biomarcadores, lesão endotelial, dislipidemias. **Financiadores:** CNPq e Fapemig.

Anexo VI - Premiação no Congresso Endorecife com 2º lugar em Temas Livres

Anexo VII- Artigo Publicado na *Thrombosis Research*

Thrombosis Research 200 (2021) 156–163



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Thrombosis Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/thromres

Familial hypercholesterolemia: Is there a role for PCSK9 and thrombin generation?

J.P.P. Silvino^a, M.G. Carvalho^a, E.A. Reis^b, A.P.L. Mota^a, K.B. Gomes^a, R.C.F. Duarte^a, M.C. J. Guimarães^c, M.C.R. Sousa^a, P.S. Azevedo^a, I.F.O. Silva^{a,*}

^a Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Departamento de Estatística, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^c Laboratório Bom Despacho, Bom Despacho, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Familial hypercholesterolemia
Thrombin generation
PCSK9
Pharmacological therapy

ABSTRACT

Introduction: Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant genetic disease. The prevalence of FH has previously been reported as 1 in 500 in the general population. This study aimed to evaluate the proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) levels, lipid profile and thrombin generation in FH patients undergoing treatment or not.

Methods: Eighty individuals with FH were selected and distributed in 2 groups: individuals treated with statins alone or conjugate therapy (statin + ezetimibe) ($T = 53$) and those non treated ($NT = 27$). PCSK9 levels were determined by ELISA, the lipid profile by colorimetric enzyme method and thrombin generation assay (TGA) by CAT method.

Results: Individuals treated with conjugate therapy (statin + ezetimibe) showed a significant reduction in the levels of total cholesterol (TC) low density lipoprotein cholesterol (LDLc) and in the potential for thrombin generation (ETP with low and high concentration of tissue factor), compared to the treated individuals with monotherapy (statins). PCSK9 was positively correlated with increased levels of TC, LDLc and triglycerides, while TGA parameters were positively correlated with PCSK9 and lipid profile.

Conclusion: PCSK9 levels appear to be associated with components of the lipid and hemostatic profiles, in addition to being influenced by age. In general, our findings suggest that combined therapy for the treatment of FH is associated with a significant improvement in both lipid and hemostatic profiles assessed by TGA, suggesting a reduction in atherogenic and thrombotic risks and, therefore, more promising compared to the use of statin monotherapy.

Anexo VIII- Artigo Publicado na *Research, Society And Development*

Research, Society and Development, v. 11, n. 9, e38411931975, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i9.31975>

COVID-19, dyslipidemia and familial hypercholesterolemia: an up-date

COVID-19, dislipidemia e hipercolesterolemia familiar: uma atualização

COVID-19, dislipidemia e hipercolesterolemia familiar: una actualización

Received: 06/20/2022 | Reviewed: 06/29/2022 | Accept: 07/03/2022 | Published: 07/13/2022

Júnea Paolucci de Paiva Silvino

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8024-5486>

Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

E-mail: juneapaolucci@gmail.com

Jéssica Abdo Gonçalves Tosatti

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8690-3707>

Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

E-mail: jesstosatti@gmail.com

Cynthia Elim Janes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8791-642X>

Universidade de São Paulo, Brazil

E-mail: cejanes@hotmail.com

Iêda de Fátima Oliveira Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1843-2632>

Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

E-mail: iedafos@farmacia.ufmg.br

Karina Braga Gomes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6870-2063>

Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

E-mail: karinabgb@ufmg.br

Abstract

COVID-19 (coronavirus disease 2019) is an infection caused by the SARS-CoV-2 coronavirus, which can evolve into a severe respiratory condition, affecting the world population in a pandemic manner. In this study, we aimed to update the findings of the mechanisms that associate dyslipidemia with COVID-19 infection, the evolution of severe form and the influence of lipid-lowering treatment on outcomes. The search was performed in the PubMed and Embase databases and the selection was based on dyslipidemia and COVID-19 studies, which resulted in 31 articles. In results, the evidence in changes in cholesterol metabolism was found in SARS-CoV-2 virus infection with variations in high-density lipoprotein (HDL) levels. In addition, it provided an increase in triglycerides (TG) and very-low-density lipoprotein cholesterol (VLDLc). Patients with familial hypercholesterolemia (FH) with COVID-19 representing a group of individuals who develop early atherosclerotic disease with a higher risk of cardiovascular event, which should intensify the lipid-lowering treatment due to the potential risk of coronary endothelial dysfunction caused by viral infection. Cholesterol modifying drugs have a potential to change the life cycle of the virus, resulting in a range of pleiotropic effect on infectivity, immunity and inflammation, such as statins, fibrates, ezetimibe, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibitors (iPCSK9), omega-3 fatty acids, bile acids sequestrants and nicotinic acid. As dyslipidemia is one of the main risk factors for the severe form of COVID-19, causing endothelial dysfunction previously installed in dyslipidemic patients, the use of lipid-lowering drugs can reduce the risk factors for the unfavorable outcome in these patients.

Keywords: Dyslipidemia; Familial Hypercholesterolemia; COVID-19; SARS-CoV-2; Hypolipidemic.

Anexo IX- Artigo Publicado com Co-Autoria nos *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*



Artigo Original

Rastreamento para Hipercolesterolemia Familiar em Pequenos Municípios: A Experiência do Programa HipercolBrasil em 11 Municípios Brasileiros

Screening for Familial Hypercholesterolemia in Small Towns: Experience from 11 Brazilian Towns in the HipercolBrasil Program

Cynthia Elim Jannes,¹ Júnea Paolucci Paiva Silvino,² Pâmela Rodrigues de Souza Silva,³ Isabella Ramos Lima,¹ Mauricio Teruo Tada,¹ Theo Gremen Mimary Oliveira,⁴ Raul D. Santos,⁵ José Eduardo Krieger,¹ Alexandre da Costa Pereira¹

Universidade de São Paulo Instituto do Coração - Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular,¹ São Paulo, SP - Brasil

Universidade Federal de Minas Gerais - Faculdade de Medicina,² Belo Horizonte, MG - Brasil

Universidade Federal de Mato Grosso - Faculdade de Enfermagem,³ Cuiabá, MT - Brasil

Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina - Instituto do Coração,⁴ São Paulo, SP - Brasil

Hospital Israelita Albert Einstein Ringgold,⁵ São Paulo, SP - Brasil

Resumo

Fundamento: A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença genética dominante que se caracteriza por níveis sanguíneos elevados de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), e está associada à ocorrência de doença cardiovascular precoce. No Brasil, o HipercolBrasil, que é atualmente o maior programa de rastreamento em cascata para HF, já identificou mais de 2.000 indivíduos com variantes genéticas causadoras de HF. A abordagem padrão baseia-se no rastreamento em cascata de casos índices referidos, indivíduos com hipercolesterolemia e suspeita clínica de HF.

Objetivos: Realizar rastreamento direcionado de 11 pequenos municípios brasileiros com suspeita de alta prevalência de indivíduos com HF.

Métodos: A seleção dos municípios ocorreu de 3 maneiras: 1) municípios em que houve suspeita de efeito fundador (4 municípios); 2) municípios em uma região com altas taxas de infarto do miocárdio precoce, conforme descrito pelo banco de dados do Sistema Único de Saúde (2 municípios); e 3) municípios geograficamente próximos a outros municípios com alta prevalência de indivíduos com HF (5 municípios). A significância estatística foi considerada como valor $p < 0,05$.

Resultados: Foram incluídos 105 casos índices e 409 familiares de primeiro grau. O rendimento dessa abordagem foi de 4,67 familiares por caso índice, o qual é significativamente melhor ($p < 0,0001$) do que a taxa geral do HipercolBrasil (1,59). Identificamos 36 CIs com variante patogênica ou provavelmente patogênica para HF e 240 familiares de primeiro grau afetados. Conclusão: Nossos dados sugerem que, uma vez detectadas, regiões geográficas específicas justificam uma abordagem direcionada para a identificação de aglomerações de indivíduos com HF.

Palavras-chave: Hipercolesterolemia Familiar; Testes Genéticos; Doenças Cardiovasculares.

Anexo X- Participação em Orientação de Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) de Graduação


CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, PARA OS DEVIDOS FINS QUE

Iêda de Fátima Oliveira Silva – orientadora, **Júnea Paolucci de Paiva Silvino** – co-orientadora, **Ana Paula Lucas Mota** e **Kathryna Fontana Rodrigues**, participaram como membros da Comissão Examinadora da Monografia de Conclusão de Curso, intitulada “Perfil inflamatório em mulheres com hipercolesterolemia familiar em uso de terapia hormonal e estatina” apresentada pela aluna **Donária Beatriz de Souza**.

Belo Horizonte, 13 de novembro de 2019.


Prof. Dra. Cristina Mariano Ruas
 Coordenadora do Colegiado de Coordenação Didática do Curso de Farmácia



FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha – CEP 31270-901 – Fone: 31 3409-6742/6743/6744

22/11/2022 16:13

SEI/UFMG - 1911898 - Certificado



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 FACULDADE DE FARMÁCIA
 COLEGIADO DE COORDENAÇÃO DIDÁTICA DO CURSO DE FARMÁCIA

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, PARA OS DEVIDOS FINS QUE

Professora Dra. Iêda de Fátima Oliveira Silva – orientador(a), Doutoranda **Júnea Paolucci de Paiva Silvino** - co-orientadora, **Profa. Dra. Claudia Natália Ferreira**, e **meorando Breno Augusto dos Santos**, participaram como membros da Comissão Examinadora da Monografia de Conclusão de Curso, intitulada “CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE PACIENTES PORTADORES DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR”, apresentada pelo(a) aluno(a) **Ana Luisa Ribeiro**, no dia 25 de novembro de 2022.

Belo Horizonte, 25 de novembro de 2022.

MÁRCIO DE MATOS COELHO
 COORDENADOR DO COLEGIADO DE COORDENAÇÃO DIDÁTICA DO CURSO DE FARMÁCIA

 Documento assinado eletronicamente por **Marcio de Matos Coelho**, Coordenador(a), em 21/11/2022, às 21:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

 A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1911898** e o código CRC **D46020C1**.

Referência: Processo nº 23072.209159/2021-82

SEI nº 1911898

Anexo XI- Participação em Bancas de Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC) de Graduação

UFMG
UNIVERSIDADE FEDERAL
DE MINAS GERAIS

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, PARA OS DEVIDOS FINS QUE

lêda de Fátima Oliveira Silva – orientadora, **Alessandra de Cássia Lovato** – coorientadora, **Cláudia Natália Ferreira** e **Júnea Paolucci de Paiva Silvino**, participaram como membros da Comissão Examinadora da Monografia de Conclusão de Curso, intitulada **"COLESTEROLEMIA FAMILIAR: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E O IMPACTO DA DESCOBERTA DA PCSK9"** apresentada pela aluna **Juliana Patrícia Andrade Uberaba**.

Belo Horizonte, 07 de novembro de 2018.


Profa Dra. Cristina Mariano Ruas
Coordenadora do Colegiado de Coordenação Didática do Curso de Farmácia



FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha – CEP 31270-901 – Fone: 31 3409-6742/6743/6744
cografar@farmacia.ufmg.br www.farmacia.ufmg.br



UFMG
UNIVERSIDADE FEDERAL
DE MINAS GERAIS

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, PARA OS DEVIDOS FINS QUE

Ana Paula Lucas Mota - orientadora, **Júnea Paolucci de Paiva Silvino** e **Lorraine Vieira Alves**, participaram como membros da Comissão Examinadora da Monografia de Conclusão de Curso, intitulada **"DISLIPIDEMIAS E OS DESAFIOS DO TRATAMENTO, COM FOCO NOS INIBIDORES DA PCSK9"** apresentada pela aluna **Alice Pereira Mendes Corsino**

Belo Horizonte, 29 de março de 2019.


Profa Dra. Cristina Mariano Ruas
Coordenadora do Colegiado de Coordenação Didática do Curso de Farmácia



FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha – CEP 31270-901 – Fone: 31 3409-6742/6743/6744
cografar@farmacia.ufmg.br www.farmacia.ufmg.br



Anexo XIII- Aprovação no Concurso de Professor Efetivo em Magistério Superior



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
INSTITUÍDA PELA LEI Nº 10.425 DE 19/04/2002 – D.O.U. DE 22/04/2002
PRÓ-REITORIA DE GESTÃO E DESENVOLVIMENTO DE PESSOAS
DIVISÃO DE DESENVOLVIMENTO DE PESSOAS
SETOR DE CONCURSOS E PROCEDIMENTOS ADMISSIONAIS

HOMOLOGAÇÃO DO CONCURSO PÚBLICO PARA PROVIMENTO DE CARGO DA CARREIRA DO MAGISTÉRIO SUPERIOR - CPD 062/2019

O Pró-Reitor de Gestão e Desenvolvimento de Pessoas da Universidade Federal de São João del-Rei – UFSJ, no uso de suas atribuições, HOMOLOGA o concurso público para provimento de cargo da Carreira de Magistério Superior, Edital 062/2019, na área de CLÍNICA MÉDICA, para o Campus Centro-Oeste Dona Lindu (CCO), edital publicado no DOU de 03/12/2019 – seção 3, pág. 99, e torna público seu resultado, a saber:

1º LUGAR: JUNEA PAOLUCCI DE PAIVA SILVINO;

2º LUGAR: ANA GABRIELA DE MAGALHAES;

3º LUGAR: ALINE DE FREITAS LOPES.

São João del-Rei, 14 de março de 2022.

LUCAS RESENDE AARÃO
Pró-Reitor de Gestão e Desenvolvimento de Pessoas

Anexo XIV- Caracterização dos Casos-Índices (CI) quanto à idade, sexo, critério de DLCN, variante genética, nº familiares, tratamento, nível de LDLc basal e classificação ACMG

Caso-índice	Idade	Sexo	DLCN	Variante genética	Nº familiares	Tratamento	LDLc mais alto	Classificação ACMG
1	53 anos	Fem	Possível	Ser854Gly gene LDLR	1 com variante	Sinvastatina 40 mg	223 mg/dL	Provavelmente patogênica
2	55 anos	Masc	Definitivo	Asp224Asn gene LDLR	2 com variante	Atorvastatina 40 mg + Ezetimiba 10 mg	243 mg/dL	Patogênica
3	45 anos	Fem	Provável	Asp 601His gene LDLR	3 com variante e 1 sem variante	Rosuvastatina 40 mg + Ezetimiba 10 mg	263 mg/dL	Provavelmente patogênica
4	56 anos	Masc	Definitivo	Cys34Arg gene LDLR	2 sem variante	Atorvastatina 40 mg + Ezetimiba 10 mg	261 mg/dL	Provavelmente patogênica
5	13 anos	Masc	Definitivo	Asp224Asn gene LDLR	sem familiar	Ezetimiba 10 mg	194 mg/dL	Patogênica
6	58 anos	Fem	Definitivo	Asp224Asn gene LDLR	14 com variante e 6 sem variante	sem tratamento	489 mg/dL	Patogênica
7	27 anos	Fem	Definitivo	Asp224Asn gene LDLR	4 com variante e 2 sem variante	Atorvastatina 20 mg + Ezetimiba 10 mg	214 mg/dL	Patogênica
8	49 anos	Fem	Definitivo	Asp224Asn gene LDLR	9 com variante e 4 sem variante	Rosuvastatina 20 mg	283 mg/dL	Patogênica
9	42 anos	Fem	Provável	Asp224Asn gene LDLR	19 com variante e 22 sem variante	Rosuvastatina 20 mg	228 mg/dL	Patogênica
10	30 anos	Fem	Definitivo	Asp224Asn gene LDLR	8 com variante e 7 sem variante	sem tratamento	393 mg/dL	Patogênica
11	36 anos	Fem	Possível	Asp224Asn gene LDLR	2 sem variante	Atorvastatina 40 mg	219 mg/dL	Patogênica
12	63 anos	Fem	Definitivo	Asp224Asn gene LDLR	2 com variante e 2 sem variante	Atorvastatina 20 mg	263 mg/dL	Patogênica
13	33 anos	Fem	Possível	Met499Val gene APOB	2 com variante e 1 sem variante	sem tratamento	223 mg/dL	VUS
14	58 anos	Fem	Definitivo	Pro28Leu gene APOE	2 com variante e 1 sem variante	Atorvastatina 20 mg + Ezetimiba 10 mg	247 mg/dL	VUS
15	86 anos	Fem	Provável	Asp224Asn gene LDLR	1 com variante e 1 sem variante	Atorvastatina 80 mg	266 mg/dL	Patogênica
16	26 anos	Masc	Definitivo	Asp224Asn gene LDLR	sem familiar	Atorvastatina 40 mg	213 mg/dL	Patogênica
17	42 anos	Fem	Definitivo	Deleção exon 15 gene LDLR	2 com variante	Atorvastatina 80 mg	330,6 mg/dL	Patogênica