

Estudos funcionais no recetor das lipoproteínas de baixa densidade: Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

Functional studies in the low-density lipoprotein receptor: Portuguese Study of Familial Hypercholesterolemia

Ana Catarina Alves^{1,2}, Mafalda Bourbon^{1,2}

catarina.alves@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Investigação e desenvolvimento. Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças não Transmissíveis, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) BioISI – Biosystems & Integrative Sciences Institute, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

_Resumo

A hipercolesterolemia familiar (FH) é uma doença comum do metabolismo dos lípidos. Os indivíduos com FH apresentam níveis elevados de colesterol no sangue desde o nascimento, tendo um elevado risco cardiovascular. A presença de uma variante patogénica no gene *LDLR* é a principal causa de FH, havendo mundialmente mais de 3000 variantes descritas neste gene. Contudo, apenas 15% destas apresentam estudos funcionais *in vitro*, demonstrando que afetam a função do recetor das lipoproteínas de baixa densidade (LDL). O objetivo deste trabalho é apresentar um resumo de todas as variantes caracterizadas funcionalmente no Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar (EPHF). Em 980 indivíduos com diagnóstico clínico de FH, 426 casos com suspeita e 554 familiares, foram encontradas 157 variantes diferentes no gene *LDLR*. No EPHF foram desenvolvidos 2 tipos de estudos funcionais para caracterizar alterações no *LDLR*. Um total de 56 variantes foram já estudadas funcionalmente o que contribuiu para obter um diagnóstico definitivo para 245 indivíduos. Os estudos funcionais permitem aumentar a evidência para a classificação correta das variantes no gene *LDLR*, influenciando assim o diagnóstico, tratamento, bem como o prognóstico dos indivíduos com FH. Estes ensaios contribuem para um diagnóstico mais especializado e de referência nesta área.

_Abstract

Familial hypercholesterolemia (FH) is a common disorder of lipid metabolism. Individuals with FH are at high cardiovascular risk due to having high blood cholesterol levels from birth. The presence of a pathogenic variant in the *LDLR* gene is the main cause of FH, with more than 3000 variants described in this gene worldwide. However, only 15% of them have functional studies *in vitro*, showing that they affect the function of the LDL receptor. The aim of this paper is to present a summary of all functionally characterized variants in the Portuguese Study of Familial Hypercholesterolemia (EPHF). In 980 individuals with a clinical diagnosis of FH, 426 index cases and 554 relatives, 157 different variants in the *LDLR* gene were found. In the EPHF, two types of functional studies were developed to characterize alterations in the *LDLR*. A total of 56 variants have been functionally studied, which contributed to obtain a definitive diagnosis for 245 individuals. Functional studies allow to increase the evidence for the correct classification of variants in the *LDLR* gene, thus influencing the diagnosis, treatment, as well as the prognosis of individuals with FH. These assays contribute to a more specialized and reference diagnosis in this area.

_Introdução

A Hipercolesterolemia familiar (FH) (OMIM 143890) é uma das doenças mais comuns do metabolismo lipídico (1/300 indivíduos) (1), apresenta uma hereditariedade autossómica dominante e foi a primeira doença genética do metabolismo lipídico a ser caracterizada do ponto de vista molecular (2). Os doentes com FH apresentam, desde o nascimento, concentrações elevadas de colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (c-LDL) na circulação sanguínea, acima do percentil 95 para a idade e sexo, dando origem ao aparecimento de doença cardiovascular (DCV) prematura, nomeadamente enfarte agudo do miocárdio (EAM) (2,3).

A FH é diagnosticada com base em critérios clínicos estabelecidos (4), no entanto, apenas o diagnóstico genético confirma a suspeita clínica (5). Existem três principais genes associados à FH: gene recetor das LDL (*LDLR*), responsável por mais de 90% dos casos, gene apolipoproteína B (*APOB*), responsável por 5-8% dos casos e gene pró-proteína convertase subtilisina/quexina tipo 9 (*PCSK9*), responsável por cerca de 1% dos casos (5).

Até agosto de 2022, foram descritas mais de 3000 variantes no gene *LDLR* na base de dados da ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), sendo a maioria variantes *missense*. Apesar do número elevado de variantes reportadas, cerca de 85% necessitam de estudos funcionais para avaliar qual o impacto no ciclo do recetor das LDL (6). Para ultrapassar este obstáculo de falta de evidência funcional para classificar uma variante, o *American College of Medical Genetics and Genomics* e a *Association for Molecular Pathology* (ACMG/AMP) publicou em 2015, um conjunto



de diretrizes para a classificação geral de variantes genéticas (7). Estas diretrizes contribuíram significativamente para uma maior padronização e consistência na interpretação do efeito das variantes e o seu significado clínico. Contudo, estas diretrizes foram concebidas para abordar todas as doenças Mendelianas, e não especificamente a FH. Uma vez que eram necessárias adaptações específicas para uma classificação clara das variantes no *LDLR*, foram publicadas recentemente diretrizes específicas para a classificação de variantes neste gene (8). As variantes podem ser classificadas como "patogénicas", "provavelmente patogénicas", "variantes de significado incerto" (VUS), "provavelmente benignas" e "benignas". Seguindo estas diretrizes, apenas os indivíduos portadores de variantes patogénicas e provavelmente patogénicas podem ter o seu diagnóstico clínico confirmado; os indivíduos com VUS precisam de aguardar que se reúna mais evidência para comprovar a patogenicidade da variante.

No entanto, verificou-se que mesmo com algumas adaptações específicas, 40% das variantes são classificadas como VUS; para estas variantes os estudos funcionais são importantes para avaliar qual o impacto destas variantes no ciclo do recetor das LDL (6).

O diagnóstico molecular da FH é importante para a obtenção de um diagnóstico definitivo e precoce, bem como, para a implementação de uma terapêutica efetiva e direcionada para a gravidade do efeito da variante detetada. Estas medidas podem levar a uma redução da mortalidade, bem como da morbidade neste grupo de indivíduos (9). A implementação generalizada de estudos funcionais, um dos mais fortes níveis de evidência para a classificação de variantes, pode contribuir muito para a melhoria do diagnóstico da FH, contribuindo desta forma também para a prevenção cardiovascular.

O Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar teve início em 1999 e é coordenado pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). No âmbito deste estudo foi implementado o diagnóstico molecular da FH em Portugal e são desenvolvidos métodos de referência na área, de forma a melhorar o diagnóstico da FH em Portugal, bem como, no mundo.

_Objetivo

O objetivo deste trabalho é apresentar um resumo de todas as variantes caracterizadas no âmbito do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar, descrevendo os diferentes tipos de ensaios funcionais que podem ser realizados no ciclo do recetor das lipoproteínas de baixa densidade.

_Métodos

O diagnóstico molecular da FH no INSA, como instituto de referência, é altamente especializado e inclui a caracterização funcional de variantes nos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*. Neste trabalho iremos apenas apresentar resultados de estudos funcionais no *LDLR*.

Ao longo dos últimos 35 anos, dois tipos de ensaios têm sido utilizados para comprovar a patogenicidade das variantes no *LDLR*, avaliando todo o ciclo do *LDLR*. O primeiro método, desenvolvido por Brown e Goldstein, baseia-se na determinação dos níveis de ligação, internalização e degradação de LDL marcado radioativamente com ¹²⁵I na porção proteica da LDL e eram inicialmente realizados em fibroblastos e linfoblastos de indivíduos com FH homocigótica (10,11). Através deste método foi possível estudar o efeito das diferentes variantes detetadas ao longo do gene *LDLR*, avaliando as diferentes fases do ciclo do recetor das LDL (2).

O segundo método, baseado no primeiro, utiliza a citometria de fluxo para determinar a taxa de ligação e internalização de LDL marcado com um fluoróforo lipofílico (Dil ou FITC), ou com recurso a anticorpos específicos para o *LDLR*, marcados secundariamente com fluoróforos, de forma a avaliar os níveis de expressão do recetor na superfície celular (12,13). Com a utilização deste tipo de marcação é também possível analisar a expressão do recetor por microscopia de fluorescência. Vários estudos já demonstraram que este método é fiável para caracterizar mutações no recetor das LDL (13-15), sendo também, mais seguro por não utilizar radioatividade. Este é o método que tem sido desenvolvido no EPHF e que é utilizado para estudar as variantes *missense* no *LDLR*, através de expressão heteróloga *in vitro* em células CHO IdIA7, sem expressão

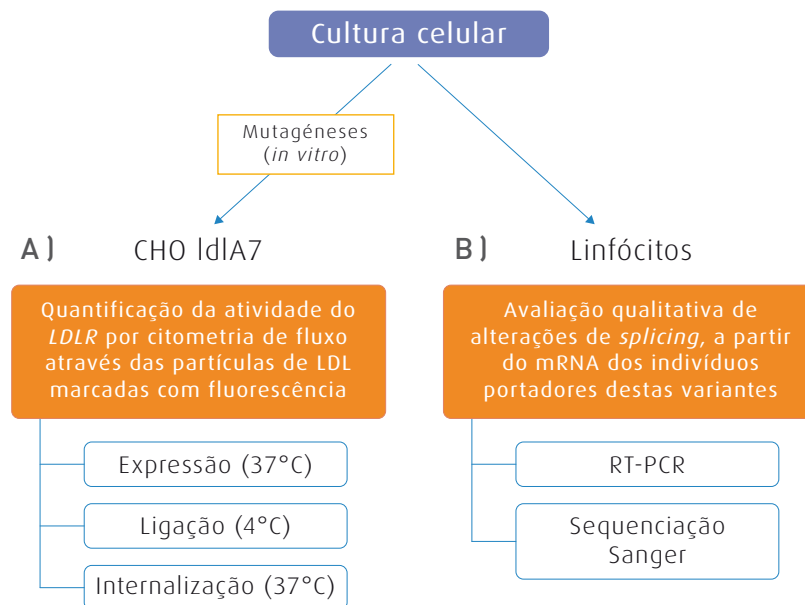


do *LDLR* (figura 1a). O protocolo laboratorial encontra-se descrito em artigos do grupo de investigação cardiovascular (13,16).

Para o estudo de variantes de *splicing* no *LDLR*, o grupo de investigação cardiovascular (17) desenvolveu uma metodologia, através do isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PMBC) dos indivíduos portadores das

das variantes de interesse. A partir das PMBC é isolado o mRNA dos indivíduos e posteriormente sintetizado o cDNA. Através da amplificação do cDNA das zonas de interesse, é possível avaliar se a variante altera o correto processamento do RNA, afetando assim a proteína. (figura 1b). O protocolo laboratorial encontra-se descrito em Bourbon *et al.* (17).

Figura 1: Estudos funcionais realizados no EPHF no gene *LDLR*. A) estudos funcionais para a caracterização de variantes *missense*; B) estudos funcionais para a caracterização de variantes de *splicing*.



_Resultados e discussão

Até setembro de 2021, foram referenciados ao EPHF 1115 indivíduos com diagnóstico clínico de FH e 2081 familiares. Foram encontradas, em 426 casos índices e 554 familiares, 157 variantes no gene *LDLR*, incluindo 40 variantes nulas, 62 variantes com estudo funcional que afetam a função do *LDLR* e 26 variantes que não afetam o ciclo do *LDLR*. As restantes 29 variantes, incluindo 12 variantes classificadas como VUS, não foram ainda estudadas funcionalmente, estando o seu estudo previsto para o próximo ano.

Foram caracterizadas funcionalmente, até agosto de 2022, um total de 56 variantes no grupo de investigação cardiovascular. Com base nesta caracterização funcional, e de acordo com as diretrizes da ACMG, foi criada nova evidência científica tendo sido as variantes novamente classificadas. Foram reclassificadas 36 variantes, incluindo 19 variantes que antes tinham uma classificação de VUS e agora tem uma classificação definitiva.

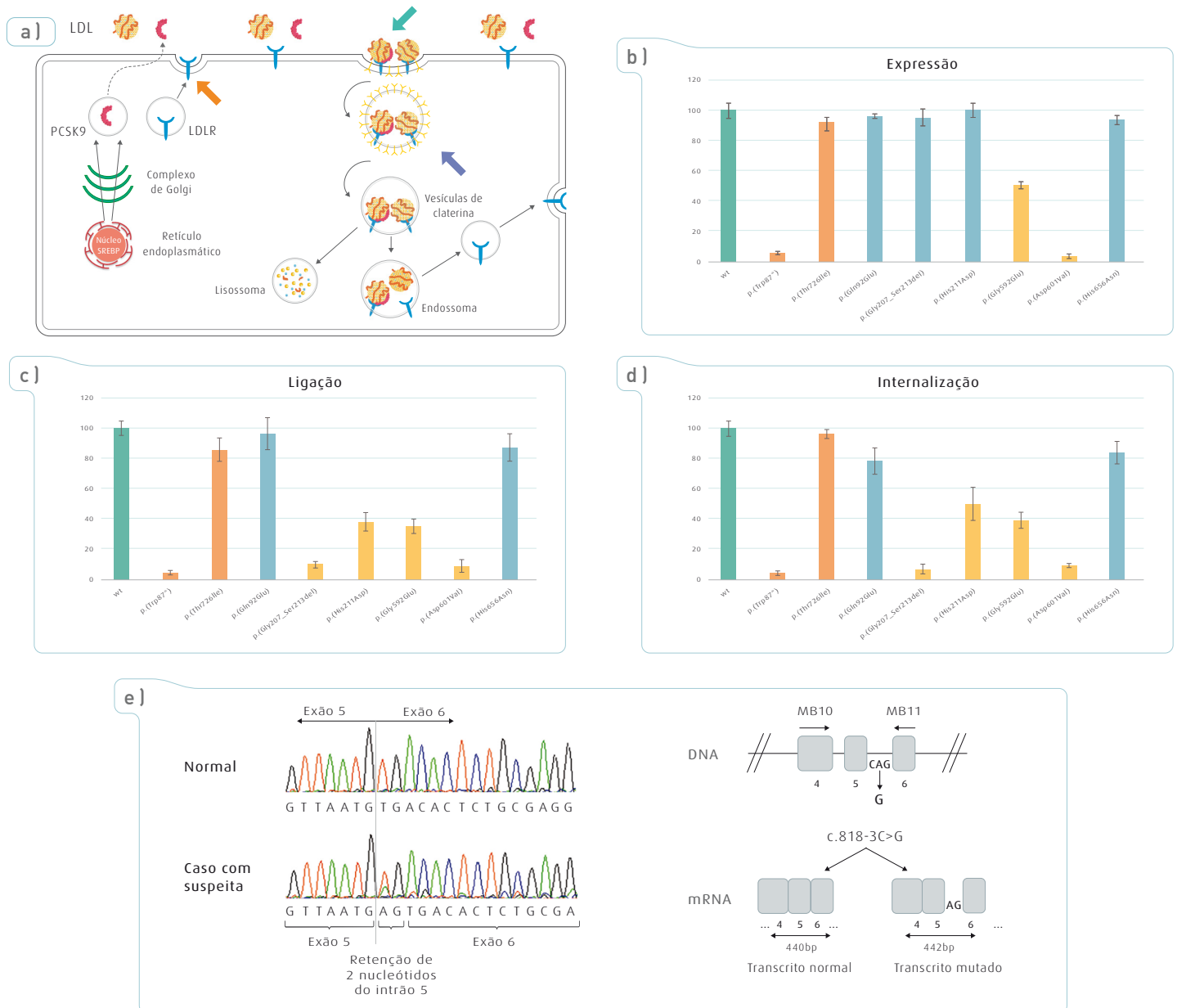


Na **figura 2** pode-se ver exemplos de resultados da caracterização funcional, tanto para variantes *missense* (**figura 2b, 2c, 2d**) como para variantes de *splicing* (**figura 2e**)

Com base nos estudos funcionais no gene *LDLR* desenvolvidos no INSA foi possível obter um diagnóstico defi-

nitivo para 245 indivíduos, que desta forma têm agora um diagnóstico definitivo, o qual deve ser agora incorporado nas decisões terapêuticas.

Figura 2: Caracterização funcional de variantes no gene *LDLR*.



(a) ciclo do *LDLR*; (b) resultado do ensaio de expressão do *LDLR* em células CHO-IdIA7 transfetadas com diferentes variantes do *LDLR* (seta laranja no ciclo); (c) resulta do ensaio de ligação de diferentes variantes no *LDLR*, transfetadas em células CHO-IdIA7 (seta verde no ciclo); (d) resultado ensaio de internalização de diferentes variantes de *LDLR* transfetadas em células CHO-IdIA7 (seta azul no ciclo); (e) Estudo funcional de um caso-index (CI) com a variante c.818-3C>G. Na parte esquerda, encontra-se a sequência nucleotídica de parte do fragmento amplificado do cDNA do CI onde se verificou a retenção de 2 nucleótidos do intrão 5 que leva a introdução de um códon de terminação prematuro. Na parte direita, encontra-se a representação esquemática da localização dos primers utilizados e os 2 fragmentos obtidos.



_Conclusão

As variantes descritas no gene *LDLR* são heterogêneas, quer na população portuguesa (18-21), como na população mundial (22-28). Das mais de 3000 variantes reportadas na base de dados ClinVar, só cerca de 15% foram comprovadas por estudos funcionais como causa de FH, ou seja, que têm um efeito deletério no metabolismo das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) afetando o normal funcionamento do ciclo do recetor das LDL (6,29).

Até agosto de 2022, foram caracterizadas funcionalmente 220 variantes no gene *LDLR* em todo o mundo. No grupo de investigação cardiovascular foram realizados estudos funcionais em 56 destas variantes. Com base nesta caracterização funcional, e de acordo com as diretrizes da *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG), foi criada nova evidência científica, tendo sido as variantes novamente classificadas. Com base na evidência criada, foram reclassificadas 164 variantes, incluindo 98 variantes que antes tinham uma classificação de "variantes de significado incerto" (VUS). Destas 164 variantes, 74 foram encontradas em doentes portugueses e estes estudos contribuíram para um diagnóstico definitivo de 712 doentes.

Uma classificação correta das variantes no gene *LDLR*, influenciará o diagnóstico, tratamento, bem como o prognóstico dos indivíduos com hipercolesterolemia familiar (FH). O grupo de investigação cardiovascular é um dos poucos a nível mundial que realiza estes ensaios contribuindo desta forma para um diagnóstico mais especializado e de referência nesta área.

Qualquer que seja o resultado obtido no estudo funcional, este é importante para o diagnóstico dos indivíduos com diagnóstico de FH, por um lado pode levar ao diagnóstico definitivo do doente, por outro se a variante encontrada não for a causa de doença, levará ao aconselhamento de uma análise mais aprofundada para encontrar a causa genética subjacente ao fenótipo da FH.

O número de novas variantes raras reportadas em indivíduos com FH continuará a aumentar, quer como resultado de uma melhor e mais ampla utilização das novas tecnologias de sequenciação clínica, quer como resultado de uma

melhor caracterização das causas de FH. Sem estudos funcionais, a maioria destas variantes será classificada como variante de significado incerto e a falta de evidência continuará a ser uma grande lacuna no diagnóstico da FH. Desta forma, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge contribui com o desenvolvimento de estudos funcionais no *LDLR*, para um melhor diagnóstico da FH em Portugal, bem como, a nível mundial uma vez que as variantes encontradas em Portugal são, na sua grande maioria, também detetadas em todo o mundo.

Referências bibliográficas:

- (1) Beheshti SO, Madsen CM, Varbo A, et al. Worldwide Prevalence of Familial Hypercholesterolemia: Meta-Analyses of 11 Million Subjects. *J Am Coll Cardiol*. 2020 May 26;75(20):2553-66. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.03.057>
- (2) Goldstein JL, Brown MS. Familial hypercholesterolemia: a genetic receptor disease. *Hosp Pract (Off Ed)*. 1985 Nov 15;20(11):35-41, 45-6. <https://doi.org/10.1080/21548331.1985.11703185>
- (3) Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, et al.; European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J*. 2013 Dec;34(45):3478-90a. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehd273>
- (4) Al-Rasadi K, Al-Waili K, Al-Sabti HA, et al. Criteria for Diagnosis of Familial Hypercholesterolemia: A Comprehensive Analysis of the Different Guidelines, Appraising their Suitability in the Omani Arab Population. *Oman Med J*. 2014 Mar;29(2):85-91. <https://doi.org/10.5001/omj.2014.22>
- (5) Sturm AC, Knowles JW, Gidding SS, et al.; Convened by the Familial Hypercholesterolemia Foundation. Clinical Genetic Testing for Familial Hypercholesterolemia: JACC Scientific Expert Panel. *J Am Coll Cardiol*. 2018 Aug 7;72(6):662-80. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.05.044>
- (6) Chora JR, Medeiros AM, Alves AC, et al. 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*. 2018 Jun;20(6):591-98. Epub 2017 Oct 26. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.151>
- (7) Richards S, Aziz N, Bale S, et al.; 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. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- (8) Chora JR, Iacocca MA, Tichý L, et al.; ClinGen Familial Hypercholesterolemia Expert Panel. The Clinical Genome Resource (ClinGen) Familial Hypercholesterolemia Variant Curation Expert Panel consensus guidelines for *LDLR* variant classification. *Genet Med*. 2022 Feb;24(2):293-306. Epub 2021 Nov 30. <https://doi.org/10.1016/j.gim.2021.09.012>
- (9) Besseling J, Hovingh GK, Huijgen R, et al. Statins in Familial Hypercholesterolemia: Consequences for Coronary Artery Disease and All-Cause Mortality. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Jul 19;68(3):252-60. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.04.054>. Erratum in: *J Am Coll Cardiol*. 2016 Oct 4;68(14):1607.
- (10) Brown MS, Goldstein JL. Familial hypercholesterolemia: model for genetic receptor disease. *Harvey Lect*. 1979;73:163-201



artigos breves_ n. 2

- (11) Knight BL, Patel DD, Soutar AK. Regulation of synthesis and cell content of the low-density-lipoprotein receptor protein in cultured fibroblasts from normal and familial hypercholesterolaemic subjects. *Eur J Biochem.* 1987 Feb 16;163(1):189-96. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb10754.x>
- (12) Jensen HK, Jensen TG, Jensen LG, et al. Characterization of a disease-causing Glu119-Lys mutation in the low-density lipoprotein receptor gene in two Danish families with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat.* 1994;4(2):102-13. <https://doi.org/10.1002/humu.1380040203>
- (13) Etxebarria A, Benito-Vicente A, Alves AC, et al. Advantages and versatility of fluorescence-based methodology to characterize the functionality of LDLR and class mutation assignment. *PLoS One.* 2014 Nov 11;9(11):e112677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112677>
- (14) Raungaard B, Heath F, Brorholt-Petersen JU, et al. Flow cytometry with a monoclonal antibody to the low density lipoprotein receptor compared with gene mutation detection in diagnosis of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Clin Chem.* 1998 May;44(5):966-72.
- (15) Raungaard B, Heath F, Brorholt-Petersen JU, et al. Flow cytometric assessment of LDL receptor activity in peripheral blood mononuclear cells compared to gene mutation detection in diagnosis of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Cytometry.* 1999 May 1;36(1):52-9. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0320\(19990501\)36:1<52::aid-cyto7>3.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0320(19990501)36:1<52::aid-cyto7>3.0.co;2-1)
- (16) Alves AC, Azevedo S, Benito-Vicente A, et al. LDLR variants functional characterization: Contribution to variant classification. *Atherosclerosis.* 2021 Jul;329:14-21. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2021.06.001>
- (17) Bourbon M, Duarte MA, Alves AC, et al. Genetic diagnosis of familial hypercholesterolaemia: the importance of functional analysis of potential splice-site mutations. *J Med Genet.* 2009 May;46(5):352-7. <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.057000>
- (18) Medeiros AM, Alves AC, Francisco V, et al.; investigators of the Portuguese FH Study. Update of the Portuguese Familial Hypercholesterolaemia Study. *Atherosclerosis.* 2010 Oct;212(2):553-8. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.07.012>
- (19) Benito-Vicente A, Alves AC, Etxebarria A, et al. The importance of an integrated analysis of clinical, molecular, and functional data for the genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Genet Med.* 2015 Dec;17(12):980-8. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.14>
- (20) Bourbon M, Alves AC, Medeiros AM, et al.; Investigators of Portuguese FH Study. Familial hypercholesterolaemia in Portugal. *Atherosclerosis.* 2008 Feb;196(2):633-42. Epub 2007 Aug 31. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.07.019>
- (21) Medeiros AM, Alves AC, Bourbon M. Mutational analysis of a cohort with clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia: considerations for genetic diagnosis improvement. *Genet Med.* 2016 Apr;18(4):316-24. Epub 2015 May 28. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.71>
- (22) Santos RD, Bourbon M, Alonso R, et al.; Ibero-American Familial Hypercholesterolemia Network. Clinical and molecular aspects of familial hypercholesterolemia in Ibero-American countries. *J Clin Lipidol.* 2017 Jan-Feb;11(1):160-66. Epub 2016 Nov 23. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2016.11.004>
- (23) Bourbon M, Alves AC, Alonso R, et al. Mutational analysis and genotype-phenotype relation in familial hypercholesterolemia: The SAFEHEART registry. *Atherosclerosis.* 2017 Jul;262:8-13. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.04.002>
- (24) Fouchier SW, Kastelein JJ, Defesche JC. Update of the molecular basis of familial hypercholesterolemia in The Netherlands. *Hum Mutat.* 2005 Dec;26(6):550-6. <https://doi.org/10.1002/humu.20256>
- (25) Grenkowitz T, Kassner U, Wühle-Demuth M, et al. Clinical characterization and mutation spectrum of German patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2016 Oct;253:88-93. Epub 2016 Aug 26. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.08.03>
- (26) Pirillo A, Garlaschelli K, Arca M, et al.; LIPIGEN Group. Spectrum of mutations in Italian patients with familial hypercholesterolemia: New results from the LIPIGEN study. *Atheroscler Suppl.* 2017 Oct;29:17-24. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.07.002>
- (27) Hooper AJ, Nguyen LT, Burnett JR, et al. Genetic analysis of familial hypercholesterolaemia in Western Australia. *Atherosclerosis.* 2012 Oct;224(2):430-4. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.030>
- (28) Futema M, Whittall RA, Kiley A, et al.; Simon Broome Register Group, Humphries SE. Analysis of the frequency and spectrum of mutations recognised to cause familial hypercholesterolaemia in routine clinical practice in a UK specialist hospital lipid clinic. *Atherosclerosis.* 2013 Jul;229(1):161-8. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.04.011>
- (29) Hegele RA, Berberich AJ, Ban MR, et al. Clinical and biochemical features of different molecular etiologies of familial chylomicronemia. *J Clin Lipidol.* 2018 Jul-Aug;12(4):920-27.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2018.03.093>