

Classificação de variantes de hipercolesterolemia familiar pelo painel de peritos do Clinical Genome Resource

Familial hypercholesterolemia variant classification by the Clinical Genome Resource expert panel

Joana Rita Chora^{1,2}, Mafalda Bourbon^{1,2}; em nome do FH Variant Curation Expert Panel

joana.chora@insa.min-saude.pt

(1) Grupo de Investigação Cardiovascular. Unidade Investigação e Desenvolvimento, Departamento de Promoção da Saúde e Doenças Não Transmissíveis, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

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

_Resumo

A hipercolesterolemia familiar (FH) é a patologia monogénica mais comum e caracteriza-se por valores muito elevados de colesterol em circulação, levando à sua deposição nas artérias e causando aterosclerose prematura. Indivíduos com FH têm variantes patogénicas, principalmente no gene *LDLR* (>90%), mas também nos genes *APOB* e *PCSK9*, genes estes muito importantes no metabolismo lipídico. O diagnóstico genético é o diagnóstico definitivo, mas existem atualmente mais de 3500 variantes diferentes no *LDLR* listadas na ClinVar, e no início deste trabalho, 565 apresentavam classificações conflituosas de patogenicidade, não permitindo assim confirmar o diagnóstico clínico nos indivíduos portadores destas variantes. Neste trabalho apresentamos o progresso da classificação de variantes no *LDLR* pelo FH Variant Curation Expert Panel (VCEP) do Clinical Genome Resource (ClinGen), segundo a recomendação publicada pelo mesmo grupo para classificação de variantes no gene *LDLR*.

No processo de classificação das variantes no gene *LDLR*, laboratórios associados enviam dados internos de casos índice com a variante em estudo, que são colocados no Variant Curation Interface e complementados com evidências publicadas em artigos científicos e outros dados obtidos de outras bases de dados como descrito na recomendação. Cada variante é avaliada por um *biocurador* sénior ou dois juniores e aprovada por três revisores antes de ser publicada oficialmente na ClinVar.

Atualmente avaliamos 531 variantes no gene *LDLR*. O FH VCEP classificou 5% destas variantes como benignas/provavelmente benignas, 39% como patogénicas/provavelmente patogénicas, 48% como variantes de significado incerto, 1% como conflituosas e 7% estão ainda em avaliação. As classificações definitivas aumentaram de 34% para 44%, e as classificações conflituosas diminuíram de 56% para 1%.

O trabalho do FH VCEP visa melhorar o diagnóstico genético da FH, para o qual a classificação correta das variantes no *LDLR* é de extrema importância. As recomendações do FH VCEP diminuem significativamente as classificações conflituosas, melhorando o diagnóstico da FH no mundo inteiro.

_Abstract

Familial hypercholesterolemia (FH) is the most common monogenic disorder and is characterized by very high levels of circulating cholesterol, leading to its deposition in arteries and causing premature atherosclerosis. Individuals with FH have pathogenic variants, mainly in *LDLR* gene (>90%), but also in *APOB* and *PCSK9* genes, which are highly important genes in lipid metabolism. Genetic diagnosis is the definite diagnosis, but there are

currently over 3500 different variants in *LDLR* listed in ClinVar and, at the beginning of this work, 565 had conflicting classifications of pathogenicity, thus not confirming the clinical diagnosis in individuals carrying these variants. In this work, we present the progress of *LDLR* variant classification by the Clinical Genome Resource's (ClinGen) FH Variant Curation Expert Panel (VCEP), according to the *LDLR* consensus variant classification recommendations published by said group.

In the process of classifying *LDLR* variants, associated labs send internal data on index cases with the variants under study, which is uploaded into the Variant Curation Interface (VCI) and supplemented by evidence published in literature and data obtained from other databases, as described in the recommendations. Each variant is assessed by one senior or two junior biocurators and approved by three reviewers before being officially published to ClinVar.

We have currently evaluated 531 *LDLR* variants. FH VCEP classified 5% of the variants as benign/likely benign, 39% as pathogenic/likely pathogenic, 48% as variants of uncertain significance, 1% as conflicting and 7% are still under evaluation. Definite classifications increased from 34% to 44%, and conflicting classifications decreased from 56% to 1%.

Efforts of the FH VCEP aim to improve FH genetic diagnosis, for which the correct *LDLR* variant classification is of utmost importance. FH VCEP's recommendations significantly decrease conflicting classifications, improving the diagnosis of FH worldwide.

_Introdução

Com a incorporação de tecnologias de sequenciação massiva no diagnóstico genético, o número de variantes potencialmente causadoras de doença aumentou significativamente nos últimos anos. No entanto, a identificação de uma variante genética num gene associado ao diagnóstico clínico do indivíduo em estudo não é o passo final no diagnóstico genético desse indivíduo, uma vez que nem todas as variantes raras identificadas são causadoras de doença ⁽¹⁾. O ênfase é agora colocado na correta interpretação da patogenicidade de cada variante identificada, e na rapidez com que se consi-

ga avaliar o significado clínico desse grande número de variantes.

Deste modo, em 2015, a *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)* e a *Association for Molecular Pathology (AMP)* publicaram recomendações para a classificação da patogenicidade de variantes genéticas associadas a patologias com padrão Mendeliano (2). Os dados usados para avaliar a sua patogenicidade incluem o tipo de variante, a sua frequência populacional, se foi estudada funcionalmente, predição *in silico* do impacto da variante ao nível de RNA ou proteína, co-segregação da variante com o fenótipo em famílias, e análise do fenótipo de casos índice. Todas estas informações são utilizadas num algoritmo com diferentes níveis de evidência resultando numa classificação final da variante em 5 classes possíveis: patogénica, provavelmente patogénica, benigna, provavelmente benigna e variantes de significado incerto (VUS). Estas recomendações foram elaboradas de maneira a poderem ser aplicadas a todos os tipos de patologias e, portanto, precisam de ser adaptadas a cada par doença/gene específico.

Nesse sentido, o *Clinical Genome Resource (ClinGen)*, um consórcio internacional especializado na avaliação da relevância clínica de genes e variantes, promoveu a criação de painéis de especialistas em classificação de variantes, os *Variant Curation Expert Panels (VCEP)*, para desenvolver essas adaptações e aplicar essas recomendações às variantes descritas. Foi também criada uma parceria entre a ClinGen e a ClinVar (3), uma base de dados pública de variantes genéticas que contém informação relevante para avaliar o significado clínico de cada variante. A ClinVar recolhe as classificações de patogenicidade de cada laboratório assim como os dados usados na sua interpretação, e agrupa-as numa classificação única. Assim, se houver discrepância na classificação da mesma variante entre os vários laboratórios, esta fica com uma classificação conflituosa (*conflicting*), e marcada com apenas 1 estrela, enquanto classificações concordantes ficam com 2 estrelas (4). As classificações dos VCEPs usando as suas adaptações específicas são apresen-

tadas com 3 estrelas. A classificação dos VCEPs foi aprovada pela *Food and Drug Administration (FDA)* para utilização direta em testes genéticos.

A Hipercolesterolemia Familiar (FH) é a patologia monogénica mais comum e caracteriza-se por valores muito elevados de colesterol em circulação, levando à sua deposição nas artérias e causando aterosclerose prematura (5). O diagnóstico de FH pode ser feito segundo critérios clínicos, que incluem a presença de valores muito elevados de colesterol total e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), história familiar de doença cardiovascular ou hipercolesterolemia e/ou xantomas, deposições lipídicas subcutâneas (6); mas apenas um diagnóstico genético pode confirmar o diagnóstico de FH. A FH é causada por variantes patogénicas nos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*. O gene *LDLR* codifica o receptor das lipoproteínas de baixa densidade, que tem como função internalizar as partículas de LDL, diminuindo assim a sua concentração nos vasos sanguíneos. Cerca de 90% dos casos de FH devem-se a variantes patogénicas no gene *LDLR*, mas este é muito heterogéneo, existindo atualmente mais de 3500 variantes diferentes listadas na ClinVar. À data de início deste trabalho existiam 565 variantes com classificações de patogenicidade conflituosas (3), o que dificulta o diagnóstico genético atempado.

Assim, em 2016 foi criado o VCEP de Hipercolesterolemia Familiar (FH VCEP) incluindo clínicos, geneticistas e investigadores de vários países, e em 2022, foram publicadas as adaptações do FH VCEP para classificar variantes do gene *LDLR* (7).

_Objetivo

Neste trabalho apresentamos o progresso da classificação de patogenicidade de variantes no gene *LDLR* associadas a hipercolesterolemia familiar pelo painel de especialistas em classificação de variantes (FH VCEP) do *Clinical Genome Resource (ClinGen)* segundo a recomendação publicada pelo mesmo grupo.

_ Métodos

Equipa

A equipa de classificação de variantes do FH VCEP (<https://clinicalgenome.org/affiliation/50004/>) é composta atualmente por 13 revisores, 15 *biocurators* e 11 laboratórios associados (**tabela 1**). A formação de *biocurators*, elementos que pesquisam e avaliam a evidência existente para aplicar

as recomendações do FH VCEP e chegar a uma classificação para cada variante, começou em agosto de 2021 e a ronda mais recente (12.ª) terminou em fevereiro de 2024 (**tabela 2**).

Tabela 1: 📄 Equipa atual de classificação de variantes do FH VCEP.

Nome	País	Instituição	Função
Mafalda Bourbon	Portugal	INSA	Codiretor, Revisor
Iftikhar Kullo	EUA	Mayo Clinic	Codiretor, Revisor
Joana Rita Chora	Portugal	INSA	<i>Scientific lead</i> , Revisor
Carolyn McCormick	EUA	University of North Carolina	Coordenadora
Christina Gutierrez Ford	EUA	University of North Carolina	Coordenadora
Emma Owens	EUA	University of North Carolina	Coordenadora
Alain Carrié	França	Pierre and Marie Curie University	Revisor
Amanda Hooper	Austrália	PathWest Laboratory Medicine	Revisor
Heather Zimmermann	EUA	Ambry Genetics	Revisor
Tomas Freiburger	Chéquia	Centre for Cardiovascular Surgery and Transplantation	Revisor
Sarah Leigh	Reino Unido	Genomics England	Revisor
Robert Hegele	Canadá	Robarts Research Institute	Revisor
Damon Bell	Austrália	PathWest Laboratory Medicine	Revisor
Michael Iacocca	Canadá	Deep Genomics	Revisor
Mathilde Di Filippo	França	Centre Hospitalier Universitaire de Lyon	Revisor
Lukas Tichy	Chéquia	University Hospital Brno	Revisor
Ana Medeiros	Portugal	INSA	<i>Biocurator</i> sénior
Jian Wang	Canadá	Robarts Research Institute	<i>Biocurator</i> sénior
Olivier Bluteau	França	Pitié-Salpêtrière Hospital	<i>Biocurator</i> sénior
Alborz Sherafati	EUA	Mayo Clinic	<i>Biocurator</i> sénior
Marwan Hamed	EUA	Mayo Clinic	<i>Biocurator</i> sénior
Jake Petzelka	EUA	Mayo Clinic	<i>Biocurator</i> sénior
Catarina Alves	Portugal	INSA	<i>Biocurator</i> responsável por estudos funcionais
Xiangqiang Shao	EUA	University of Wisconsin	<i>Biocurator</i>
Alessia Di Costanzo	Itália	Sapienza University of Rome	<i>Biocurator</i>
Jessica Chonis	EUA	Stanford Healthcare	<i>Biocurator</i>
Kyle Hilliard	EUA	University of North Carolina	<i>Biocurator</i>
Beatriz Miranda	Portugal	INSA	<i>Biocurator</i>
Oriane Marmontel	França	Centre Hospitalier Universitaire de Lyon	<i>Biocurator</i>
Lan Nguye	Austrália	PathWest Laboratory Medicine	<i>Biocurator</i>
Azin Teymourzadeh	EUA	Mayo Clinic	<i>Biocurator</i>

Seleção de variantes e introdução de dados no VCI

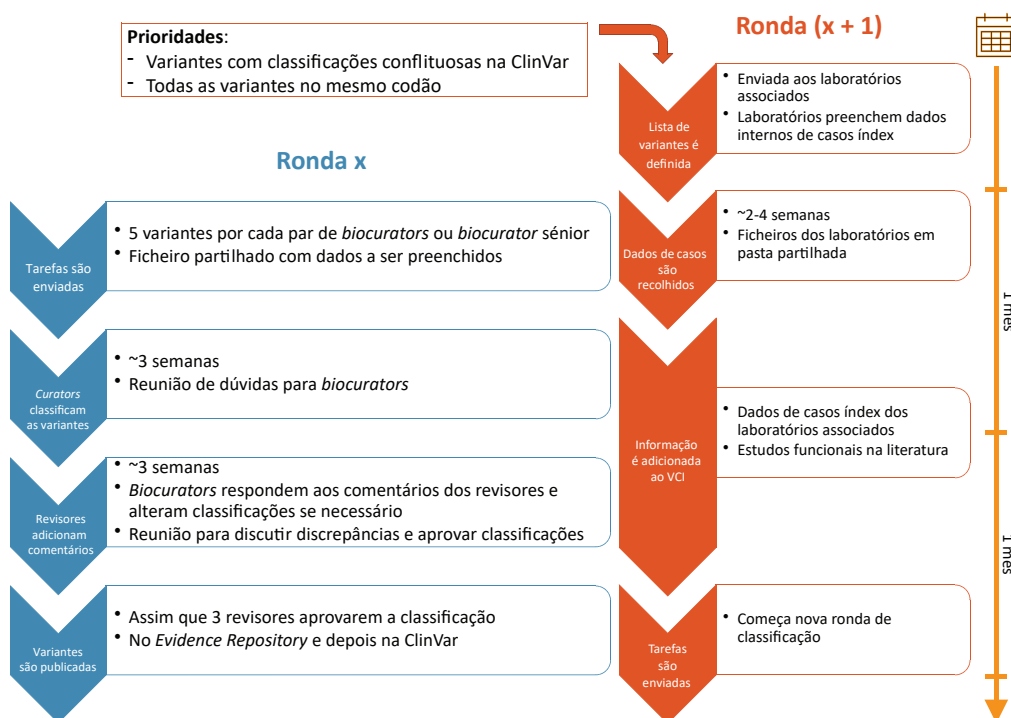
Foi dada prioridade às variantes com classificações conflituosas na ClinVar e outras variantes no mesmo codão, necessárias para classificar adequadamente as variantes conflituosas (figura 1). A lista de variantes de cada ronda é definida com antecedência e enviada aos laboratórios associados, que devolvem dados internos de casos índice que tenham identificado com essas variantes (cumprindo normas de proteção de dados pessoais). Estes dados são carregados no *Variant Curation Interface* (8) (VCI), um *software* da ClinGen que facilita a compilação da informação para a classificação de cada variante, por um *biocurator* que vai alternando em cada ronda. Na equipa de preparação do FH VCEP existe também um elemento dedicado que pesquisa, analisa e insere informações sobre

estudos funcionais publicados das variantes e coloca toda a informação também no VCI, antes da próxima ronda de classificação. Assim, quando a ronda de classificação começa, os *biocurators* já têm informação disponível no VCI que pode depois ser completada com mais evidências encontradas na literatura por cada *biocurator* (figura 1).

Classificação de variantes

Com base nas recomendações publicadas (7), cada variante no *LDLR* é avaliada e classificada por um *biocurator* sénior ou por dois *biocurators* juniores independentemente no VCI, e depois aprovada por três revisores antes de ser publicada oficialmente no Repositório de Evidências da ClinGen (*ClinGen Evidence Repository*) e na ClinVar com status de 3 estrelas (figura 1).

Figura 1: Representação esquemática da metodologia atual de classificação de variantes do FH VCEP.



FH, hipercolesterolemia familiar; VCEP, painel de especialistas em classificação de variantes; VCI, *variant curation interface* da ClinGen.

_Resultados

Até ao final da ronda 12, o FH VCEP avaliou 531 variantes no gene *LDLR* (tabela 2 e gráfico 1). A classificação que estava presente na ClinVar de cada variante antes do FH VCEP as classificar com as recomendações específicas para o gene *LDLR*, encontra-se ilustrada no gráfico 1A, onde se pode ver que 351 variantes (66%) apresentavam uma classificação conflituosa ou de significado incerto e, apenas 178 variantes (34%), apresentavam uma classificação definitiva (benigna ou patogénica).

As classificações do FH VCEP distribuem-se em 26 variantes benignas ou provavelmente benignas (B/LB) (5%), 206 variantes patogénicas ou provavelmente patogénicas (P/LP) (39%), 253 variantes de significado incerto (48%) e apenas 7 variantes com classificação conflituosa (1,3%),

por reunirem evidências ao mesmo tempo benignas e patogénicas (gráfico 1B). Apenas 39 variantes (7%) ainda estão em avaliação. A classificação do FH VCEP aumentou assim o número de variantes com uma classificação definitiva para 232 (44%) e diminuiu assim as classificações conflituosas de 56% para 1%.

No total, as classificações de 338 variantes estão atualmente publicadas tanto na ClinVar, com *status* de 3 estrelas, como no ClinGen *Evidence Repository*, 5 variantes estão publicadas ainda apenas no ClinGen *Evidence Repository*, 150 variantes estão aprovadas e em processo de publicação nas 2 bases de dados, e 39 encontram-se ainda em avaliação (tabela 2).

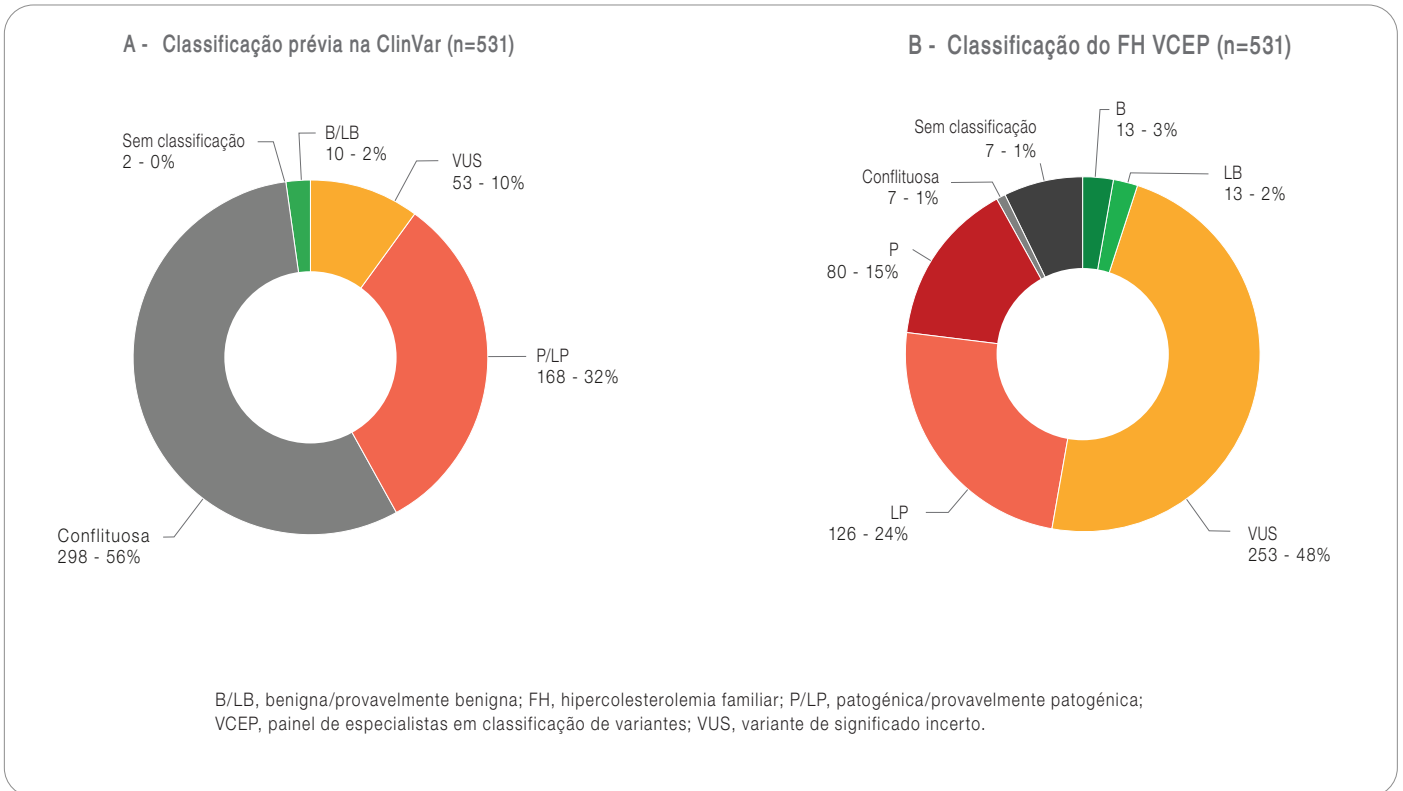
Tabela 2: Características de todas as rondas de classificação, incluindo estudo-piloto, rondas de formação (A), e rondas de classificação (B).

A - Ronda de formação	Piloto	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Data-fim	Ago 2020	Out 2021	Dez 2021	Mar 2022	Ago 2022	Mar 2023	Em curso
<i>Biocurators</i>	3	10	3	4	3	3	5
Revisores	2	8	3	9	5	3	3
Variantes aprovadas	54/54	13/16	4/4	7/7	10/11	3/5	-/10
Variantes publicadas*	54/54	13/16	4/4	5/7	10/11	-	-

B - Ronda de classificação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Data-fim	Dez 2021	Jan 2022	Fev 2022	Mar 2022	Mai 2022	Jul 2022	Out 2022	Jan 2023	Mar 2023	Jun 2023	Out 2023	Fev 2024
<i>Biocurators</i>	11	11	11	12	14	14	16	13	12	14	14	13
Revisores	9	9	10	12	11	12	13	10	12	12	13	13
Variantes aprovadas	20/20	30/30	23/24	29/30	30/30	35/40	49/50	39/40	38/40	38/45	37/45	36/40
Variantes publicadas*	20/20	30/30	23/24	28/30	30/30	35/40	30/50	30/40	26/40	5/45**	-	-

* no repositório de evidências da ClinGen e na ClinVar ** só no repositório de evidências da ClinGen F, Ronda de formação

Gráfico 1: ↓ Classificação das variantes no gene *LDLR* avaliadas pelo FH VCEP até ao momento. (A) classificação prévia na ClinVar, (B) Classificação atual pelo FH VCEP.



_Discussão

A aplicação das adaptações do FH VCEP na classificação de variantes no gene *LDLR* associadas a hipercolesterolemia familiar (7) permitiu-nos distinguir variantes verdadeiramente conflituosas (com evidências tanto patogénicas como benignas) de variantes de significado incerto, ainda com evidências insuficientes para chegar a uma classificação definitiva.

Cerca de metade das variantes que tinham uma classificação prévia conflituosa (n=298), têm agora uma classificação definitiva, ou seja, foram classificadas como provavelmente patogénica/patogénica ou provavelmente benigna/benigna (127/298, 43%). O aparente aumento de variantes de significado incerto, pode ser explicado pelo facto que, em 76% dessas variantes, a sua classificação prévia na ClinVar tinha apenas 0 ou 1 estrelas, ou seja, foram submetidas à

ClinVar sem informação do critério de classificação usado ou por apenas 1 único laboratório (4), não sendo assim a sua classificação prévia suficientemente fidedigna. No total, em 60% das variantes a classificação manteve-se semelhante, em apenas 13% a classificação passou de P/LP ou B/LB para VUS, e em 26% a classificação passou de VUS ou conflituosa para P/LP ou B/LB. O grande avanço nestas classificações deve-se principalmente à partilha de dados entre laboratórios e ao trabalho voluntário de todos os *biocurators* e revisores.

Existem ainda 39 variantes em avaliação por os revisores ainda não terem chegado a um consenso na avaliação de todas as evidências ou por ter sido necessário contactar autores de artigos ou laboratórios para elucidar alguma dúvida na interpretação dos seus dados.

Conclusão

O principal objetivo do painel de especialistas em classificação de variantes de Hipercolesterolemia Familiar (FH VCEP) é melhorar o diagnóstico genético da FH, criando sinergias e meios para standardizar a classificação correta de variantes genéticas identificadas no gene *LDLR* em indivíduos com FH.

O FH VCEP pretende classificar todas as >3500 variantes presentes na base de dados ClinVar com 3 estrelas para facilitar o diagnóstico da FH.

As recomendações do FH VCEP diminuirão significativamente as classificações conflituosas (de ~300 para menos de 10), o que facilitará o diagnóstico presente e futuro e contribuirá, em última análise, para uma melhor identificação e prognóstico de indivíduos com FH.

Referências bibliográficas:

- (1) Cotton RG, Scriver CR. Proof of "disease causing" mutation. *Hum Mutat.* 1998;12(1):1-3. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1998\)12:1<1::AID-HUMU1>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1998)12:1<1::AID-HUMU1>3.0.CO;2-M)
- (2) 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>
- (3) Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D1062-D1067. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKX1153>
- (4) National Center for Biotechnology Information. Review status in ClinVar [online]. [consult. 16/4/2024]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/docs/review_status/
- (5) Akoyamen LE, Genest J, Shan SD, et al. Estimating the prevalence of heterozygous familial hypercholesterolaemia: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2017;7(9):e016461. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-016461>
- (6) Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. *BMJ.* 1991;303(6807):893-96. <https://doi.org/10.1136/bmj.303.6807.893>
- (7) Chora JR, Iacocca MA, Tichý L, et al. The Clinical Genome Resource (ClinGen) Familial Hypercholesterolemia Variant Curation Expert Panel consensus guidelines for LDLR variant classification. *Genet Med.* 2022;24(2):293-306. <https://doi.org/10.1016/J.GIM.2021.09.012>
- (8) Preston CG, Wright MW, Madhavrao R, et al. ClinGen Variant Curation Interface: a variant classification platform for the application of evidence criteria from ACM-G/AMP guidelines. *Genome Med.* 2022;14(1):1-12. <https://doi.org/10.1186/S13073-021-01004-8/FIGURES/6>