



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - UFPI  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E SAÚDE**

**HIGO JOSÉ NERI DA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E RELAÇÃO GENÉTICA ENTRE  
DIFERENTES FAMÍLIAS COM DEFICIÊNCIA DA ENZIMA LCAT,  
RESIDENTES NO ESTADO DO PIAUÍ**

Teresina  
2021

**HIGO JOSÉ NERI DA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E RELAÇÃO GENÉTICA ENTRE  
DIFERENTES FAMÍLIAS COM DEFICIÊNCIA DA ENZIMA LCAT,  
RESIDENTES NO ESTADO DO PIAUÍ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde, do Centro de Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí - UFPI, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde.

**Área de Concentração:** Métodos Diagnósticos e Análise das Condições de Saúde

**Orientador:** Prof<sup>o</sup> Dr. Adalberto Socorro da Silva

**Co-orientador:** Dr. Rafael Melo S. de Serpa Brandão

Teresina  
2021

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco  
Serviço de Processamento Técnico

S586c Silva, Higo José Neri da.  
Caracterização molecular e relação genética entre diferentes famílias com deficiência da enzima LCAT, residentes no estado do Piauí / Higo José Neri da Silva. – 2021.  
65 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2021.  
“Orientador: Prof. Dr. Adalberto Socorro da Silva”.  
“Coorientador: Prof. Dr. Rafael Melo S. de Serpa Brandão”.

1. Deficiência de LCAT. 2. Diagnóstico Molecular. 3. Lecitina Colesterol Aciltransferase (LCAT). I. Silva, Adalberto Socorro da. II. Brandão, Rafael Melo S. de Serpa. III. Título.

CDD 616.042

**HIGO JOSÉ NERI DA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E RELAÇÃO GENÉTICA ENTRE OS MEMBROS DE SEIS DIFERENTES FAMÍLIAS COM DEFICIÊNCIA DA ENZIMA LCAT, RESIDENTES NO ESTADO DO PIAUÍ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde, do Centro de Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí - UFPI, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde.

Data de aprovação: 10/02 / 2021

*Adalberto Socorro da Silva*

Prof<sup>o</sup> Dr. Adalberto Socorro da Silva  
Doutor em Imunologia, Universidade de São Paulo - USP  
Universidade Federal do Piauí - UFPI  
Presidente – Orientador

*EMP*

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ester Miranda Pereira  
Doutora em Biotecnologia – RENORBIO / UFPI  
Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular (LIB-UFPI)  
1<sup>o</sup> Examinadora Interna

*MGP*

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria das Graças Prianti  
Doutora em Fisiopatologia Experimental, Universidade de São Paulo - USP  
Faculdade de Tecnologia de Teresina - CET  
2<sup>o</sup> Examinadora Externa

Teresina  
2021

Aos meus exemplos de vida, meus amados pais,  
por tanto AMOR, CARINHO, INCENTIVO, AFETO e  
FORÇA em todos os momentos de minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao nosso Deus. Por estar sempre presente nas nossas vidas, independente de qual momento seja. Por nos ajudar e sempre me guiar para o caminho do bem e da sabedoria.

Aos meu pai José Almir Neri, à minha mãe Eliane Felix, ao meu irmão Iago Neri, à minha especial avó Judith Bezerra por serem pessoas inigualáveis neste mundo. Por conceder tudo que acharem necessário para me verem felizes e realizado. Vocês não têm noção do quanto amo vocês.

À toda minha família (primos, primas, tios e tias), por serem tão especiais e generosos, em especial as minhas primas Luana, Isabella e Isadora.

Aos meus amigos por estarem presentes em quase todos os momentos da minha vida. Amo vocês meus queridos, saibam que podem contar comigo sempre. Em especial Laryssa, Waldelúcio, Ariadne, Samara, Shelly, Kerolyne, Izaura, Rodrigo, Sâmia, Aline, Gutemberg, Marina, Felipe, Thatila, Catarina, Andressa. E as meus amigos Deylane Teles e Ian Jhemes por me ajudarem bastante para que tudo isso se tornasse realidade, vocês não sabem o quanto são especiais na vida das pessoas, nunca poderei recompensar o que vocês fizeram por mim.

Ao Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Piauí – UFPI, na pessoa da professora Dr<sup>a</sup> Semiramis Jamil Hadad do Monte, coordenadora deste laboratório, por nos proporcionar a oportunidade inigualável de usufruímos da estrutura disponível em tal recinto, que por sua vez foi de suma relevância na formação técnica/científica de diversas pessoas que por lá já passaram. Ao corpo de funcionários em nome da Iracy, Deusa e Ana, por simplesmente abrirem não só as portas do laboratório, mas também suas vidas, almas e seus corações. Em especial a Professora Dr. Ester Miranda, por ter me incentivado a seguir por este caminho que é a pesquisa e principalmente por acreditar na minha capacidade. Você é muito especial na minha vida, e qualquer vitória em minha vida, sempre vou lembrar de você.

Ao melhor Orientador que alguém poderia ter, o meu “pai científico” Professor Dr. Adalberto Socorro da Silva, por sempre estar ao meu lado, não só nos momentos

de conquistas dentro da nossa pesquisa, mas nos momentos adversos, e por sempre conduzir tudo com calma e elegância, e por contribuir de forma “gigantesca” na minha formação profissional, pois sem o senhor nada disso seria possível.

Ao meu Co-orientador, Dr. Rafael Melo S de Serpa Brandão, por não medir esforços durante estes dois anos de pesquisa e estudo, por sempre estar disponível para me ajudar no que fosse necessário, por contribuir de forma grandiosa na construção de todo este trabalho. Sem você Rafael, nada disso seria possível. O Daniel tem um pai e tanto.

Ao Prof. Dr. Airton Conde, ex coordenador do Programa de Mestrado em Ciências e Saúde (PPGCS-UFPI), por sua receptividade quando solicitado sua ajuda e pelos ensinamentos em quanto docente. A atual coordenadora do PPGCS Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Zélia Madeira por toda sua atenção, compreensão e generosidade, além de seu grandioso coração.

Não poderíamos deixar de agradecer à Edilene, secretária do Programa, pela sua ajuda, amizade, companheirismo e palavras de conforto em momentos difíceis. Você foi um dos presentes que ganhei no mestrado.

Aos meus professores de graduação, Ana Érica, Ryanni, Eliamara, Taciana, Ester, Ronaldo, Priant, Fernanda Cerqueira, Jairelda, Valdileia, Luciane, Renato. Com vocês pude perceber o quão gratificante é ensinar ao próximo; o quão gratificante é transformar a vida das pessoas por meio do conhecimento. O sonho de ser docente surgiu a partir de seus sonhos. Sem vocês nada disso seria possível, agradeço eternamente por cada ensinamento, por cada puxão de orelha. Início uma nova etapa em minha vida, e sei que muitas coisas boas estão por vir.

Aos Funcionários da Faculdade de Tecnologia de Teresina – CET por serem tão especiais. Vocês estão no meu coração desde a graduação. Especialmente, aos queridos John, Kátia, Aloísio, Rosário, Gardênia, Cleide, Tânia, Luciana e Carlinhos.

Aos colegas de curso pelos melhores momentos durante esta fase. Vocês são demais, me deram muitos momentos de alegria, além do mais me ensinaram muitas coisas dentro da área a qual exercem, a nossa interdisciplinaridade foi fundamental para uma construção extra de conhecimento.

“Não há vida sem correção, sem retificação.”

Paulo Freire



## RESUMO

O metabolismo e o transporte reverso do colesterol extracelular em humanos são realizados pela enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT). Essa proteína é codificada pelo gene de seis éxons GRCh37.p13 localizado no braço longo do cromossomo 16 (16q22). Já foram relatadas cerca de 90 mutações, que resultam em perda de atividade funcional da LCAT. A manifestação fenotípica de tal deficiência se dá pelos sinais patognomônicos de duas patologias: síndrome do olho do peixe (FED) e deficiência familiar de LCAT (FLD). Embora seja considerada uma condição rara (prevalência mundial  $< 1:1.000.000$ ), foram identificadas cinco famílias distintas, em um total de 67 indivíduos portadores de mutação neste gene, todas residentes no estado do Piauí. Porque esta é uma frequência relativamente alta para uma região, começamos a estudar essas famílias com o objetivo de caracterizá-las molecularmente e investigar o grau de parentesco entre elas por meio de marcadores genéticos. Para tanto, casos índices e seus familiares foram convidados a participar do estudo por meio da doação de 5ml de sangue periférico, obtido por punção venosa. Tais células foram utilizadas para a extração de DNA e submetidas a protocolos de sequenciamento para determinação de mutações no gene GRCh37.p13 bem como para a comparação de conjunto de microssatélites de regiões polimórficas do genoma. As análises dos heredogramas das cinco famílias confirmam o caráter autossômico recessivo raro da deficiência de LCAT. Além disso, os testes de endogamia revelaram que, se existe alguma relação com o processo de endogamia, esta não ocorreu de forma recorrente nas últimas gerações e nem foi um fator comum para todas as famílias estudadas. Apesar disso, contudo, a estimativa de parentesco médio nas famílias foi superior ao encontrado no grupo controle, como mostrado pela análise de similaridade genética. No entanto, ao agrupar as famílias em um mesmo cluster para determinar o grau de parentesco, o resultado indica que se houver parentesco, este não é tão expressivo. Além disso, nas análises das distâncias genéticas foi interessante observar que as famílias F1, F2, F3 e F5 são descendentes de um ramo principal. Não é possível confirmar a existência de um efeito fundador, mas é possível que isso possa ter ocorrido há um tempo atrás restringindo a variabilidade genética. A análise *Minimal Spanning Network* demonstrou um possível parentesco entre as famílias F2, F3 e F5. Por fim, a análise Bayesiana corrobora com os outros testes realizados de comparação genética. Os resultados indicam a hipótese de um possível

efeito fundador entre os participantes caso do presente trabalho, sugerindo um certo grau de parentesco entre os mesmos. Além disso, diversos estudos relacionam a proximidade geográfica, bem como casamentos entre indivíduos da mesma região como um fator importante para a ocorrência da baixa variabilidade genética.

**Palavras-chave:** Lecitina Colesterol Aciltransferase (LCAT). Deficiência de LCAT. Diagnóstico Molecular.

## ABSTRACT

The metabolism and reverse transport of extracellular cholesterol in humans are performed by the enzyme lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT). This protein is encoded by the six-exon gene GRCh37.p13 located on the long arm of chromosome 16 (16q22). About 90 mutations have been reported, which results in loss of LCAT functional activity. The phenotypic manifestation of such deficiency consists in two pathologies: fish eye syndrome (FED) and LCAT familial deficiency (FLD). Although considered a rare condition (world prevalence  $< 1:1,000,000$ ), five distinct families were identified, in a total of 67 individuals with mutation in this gene, all residing in the state of Piauí. Because this is a relatively high frequency for a region, we began to study these families with the aim of molecularly characterizing them and investigating their relationship through genetic markers. Therefore, index cases and their relatives were invited to participate in this study by donating 5 ml of peripheral blood obtained by venipuncture. These cells were used for DNA extraction and subjected to sequencing protocols to determine mutations in the GRCh37.p13 gene as well as to the microsatellite set comparison of polymorphic regions of the genome. Heredogram analysis of the five families confirm the rare autosomal recessive character of LCAT deficiency. In addition, inbreeding tests have shown that if there is any relationship to the inbreeding process, it has not occurred relapsing in recent generations and was not a common factor for all families studied. Despite this, however, the average family relationship estimate was higher than that found in the control group, as shown by the genetic similarity analysis. However, when grouping families in the same cluster to determine the degree of kinship, the result indicates that if there is kinship, it is not as expressive. Moreover, in the analysis of genetic distances it was interesting to observe that the families F1, F2, F3 and F5 are descendants of a main branch. It is not possible to confirm the existence of a founding effect, but it is possible that this may have occurred some time ago by restricting genetic variability. Minimal Spanning Network analysis showed a possible relationship between families F2, F3 and F5. Finally, the Bayesian analysis corroborates the other tests performed for genetic comparison. The results indicate the hypothesis of a possible founding effect among the case participants of the present work, suggesting a certain degree of kinship between them. In addition, several studies relate geographic proximity as well as marriages between

individuals from the same region as an important factor for the occurrence of low genetic variability.

**Keywords:** lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT). LCAT deficiency. Molecular diagnosis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Estrutura da LCAT humana.....	20
<b>Figura 2</b> – Reação catalisada pela LCAT. ....	21
<b>Figura 3</b> – Marcador molecular de microsatélite.....	26
<b>Figura 4</b> – Mapa do Piauí – Brasil. ....	30
<b>Figura 5</b> – Cinco municípios piauienses com famílias com deficiência de LCAT. ....	31
<b>Figura 6</b> – Kit Wizard® Genomic DNA Purification. ....	32
<b>Figura 7</b> – NanoDrop® 1000 Spectrophotometer v.3.7.....	33
<b>Figura 8</b> – VeriFiler Express PCR Amplification Kit. ....	34
<b>Figura 9</b> – GeneAmp® PCR System 9700 - Applied Biosystems.....	35
<b>Figura 10</b> – ABI PRISM 3500xl Genetic Analyzer.....	36
<b>Figura 11</b> – Heredograma da família F1.....	39
<b>Figura 12</b> – Heredograma da família F2.....	40
<b>Figura 13</b> – Heredograma da família F3.....	41
<b>Figura 14</b> – Heredograma da família F4.....	42
<b>Figura 15</b> – Heredograma da família F5.....	43
<b>Figura 16</b> – Parentesco médio por família (F1 a F5) e na população controle (CN).46	
<b>Figura 17</b> – Dendograma da análise de agrupamento UPGMA baseado na distância genética entre os cluster analisados. ....	49
<b>Figura 18</b> – Análise discriminante de 4 clusters (casos de LCAT e CNg) .....	51
<b>Figura 19</b> – Mínima rede de abrangência entre as amostras casos e controle .....	52
<b>Figura 20</b> – Análise dos diferentes grupos genéticos por uma abordagem Bayesiana .....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Programa para amplificação da mistura das reações. ....	35
<b>Tabela 2</b> – Total de amostras de portadores de deficiência de LCAT e seus familiares. ....	38
<b>Tabela 3</b> – Estimativas de índices de diversidade genética entre as famílias. ....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LCAT	Lecitina Colesterol Aciltransferase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
Apo A-I	Apolipoproteína A-I
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
mRNA	RNA mensageiro
KDa	Kilodaltons
apoA-II	Apolipoproteína A-II
apoC-I	Apolipoproteína C-I
apoE	Apolipoproteína E
FLD	Deficiência familiar de LCAT
FED	Doença do olho do peixe
SNPs	Polimorfismo de base única
GWAS	Estudo de associação em larga escala
MHC	Complexo de histocompatibilidade maior
HLA	Antígeno humano leucocitário
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
PCR	Reação em cadeia da polimerase
STRs	Repetições curtas em tandem
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
CONEP	Conselho Nacional de Ética e Pesquisa
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
REDOME	Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea
LIB	Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Piauí – LIB/UFPI

DNA           Ácido desoxirribonucleico

DAPC          Análise discriminante de componentes principais



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	17
2 OBJETIVOS .....	19
2.1 Objetivo Geral .....	19
2.2 Objetivos Específicos .....	19
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	20
3.1 Aspectos genéticos da lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) .....	20
3.2 Diagnóstico e Tratamento .....	22
3.3 Polimorfismos.....	23
3.4 Identificação Humana .....	24
3.5 Marcadores Biológicos na Identificação Humana .....	24
3.6 Estudo de Microssatélites em Genética de Populações .....	25
3.7 Marcadores dos Cromossomos X E Y humanos.....	27
4 ASPECTOS METODOLÓGICOS .....	29
4.1 Tipo de estudo .....	29
4.2 População amostral e aspectos éticos.....	29
4.3 Extração, quantificação e determinação de pureza de DNA.....	32
4.4 Análise de fragmento por eletroforese capilar.....	33
4.4.1 Reação de amplificação das regiões de microssatélites.....	34
4.4.2 Preparo das amostras para eletroforese.....	36
4.5 Análise estatística .....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1 Análise das famílias por heredograma.....	38
5.2 Testes de diversidade de informação genética e endogamia .....	44
5.3 Análise de agrupamento (UPGMA).....	47
5.4 Análise discriminante de componentes principais (DAPC) .....	49
5.6 Análise de estrutura de grupos genéticos (Estatística Bayesiana) .....	52
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	54
ANEXOS .....	55
Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) .....	55
REFERÊNCIAS.....	59

## 1 INTRODUÇÃO

A Lecitina Colesterol Aciltransferase (LCAT) é uma glicoproteína que apresenta ação tanto de fosfolipase A2 como aciltransferase. Essa glicoproteína tem papel essencial na maturação, interconversão e rearranjos normais de todas as classes de lipoproteínas, além de estar diretamente envolvida no transporte reverso do colesterol. Sua síntese ocorre no fígado, porém a proteína circula no plasma sanguíneo ligada reversivelmente ao HDL (do inglês, *high density lipoprotein*) e ao LDL (do inglês, *Low density lipoprotein*) (ALBERS et al., 1981; CHEN e ALBERS, 1982; SAEEDI et al., 2015).

A lecitina colesterol aciltransferase catalisa a esterificação do colesterol livre nas superfícies de lipoproteínas. Seu substrato mais comum é o HDL, que contém apolipoproteína A-I (apoA-I), seu mais potente ativador. A ativação da LCAT pela apoA-I, no entanto, depende da composição lipídica do HDL, sendo mais efetiva naquelas partículas cuja razão fosfolípideo:apoA-I é reduzida (HIRASHIO et al., 2014; GU et al., 2016).

Mutações no gene GRCh37.p13, codificador de LCAT, que se localiza no cromossomo 16 humano, podem causar duas condições autossômicas recessivas distintas: (i) a síndrome do olho de peixe, com deficiência parcial de LCAT, (ii) e a Deficiência Familiar de LCAT, quando não há atividade detectável da proteína supracitada (SAEEDI et al., 2015; AKIKO et al., 2016).

Fenotipicamente, indivíduos com síndrome dos olhos de peixe apresentam opacidade das córneas, o que confere aos olhos a aparência de peixe morto, estando associada a baixas concentrações de colesterol HDL (aproximadamente 10% do preconizado como normal). Nessas condições, o LDL é enriquecido em triglicérides e a concentração de VLDL (do inglês, *Very Low Density Lipoprotein*) é aumentada, embora sua composição permaneça normal. Indivíduos com deficiência familiar de LCAT apresentam características clínicas que incluem opacidade da córnea, anemia hemolítica, proteinúria, triglicérides plasmáticos elevados e baixas concentrações de colesterol HDL (MAHAPATRA et al., 2015).

Apesar das concentrações reduzidas de colesterol HDL, a aterosclerose prematura é raramente vista em pacientes com deficiência de LCAT. Portadores heterozigotos carecem de características clínicas, mas têm concentrações de colesterol HDL em torno de 50% acima do normal (CALABRESI et al., 2005).

A deficiência de LCAT resulta em não esterificação de colesterol livre no plasma e, por conseguinte, no acúmulo de colesterol livre em todas as frações lipoproteicas. Por este motivo, pessoas com deficiência de LCAT apresentam partículas de lipoproteínas com tamanho, forma e composições anormais (CONCA et al., 2012).

Diante da natureza incapacitante e progressiva da deficiência de LCAT, é imperativo o conhecimento dos mecanismos mutagênicos e de transferência dos genes mutados dessa enzima, tanto a nível familiar, como a nível populacional. O número expressivo de famílias com uma doença rara como a supracitada, residentes em uma única área fornece oportunidade ímpar para a execução de estudos de genética de populações, permitindo o melhor entendimento da dinâmica e fluxo desses genes dentro da população.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Analisar molecularmente regiões de microssatélites presentes nos cromossomos sexuais de indivíduos de cinco diferentes famílias piauienses portadoras da mesma mutação no gene (GRCh37.p13), codificador da enzima lecitina colesterol aciltransferase.

### 2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar molecularmente, membros familiares de cinco casos índices com suspeita de deficiência de LCAT, residentes no estado do Piauí;
- ✓ Verificar a associação de marcadores genéticos entre as famílias, por meio da análise de microssatélites presentes nos cromossomos sexuais;
- ✓ Construir pedigrees a partir do histórico familiar para identificar uma possível predisposição genética.

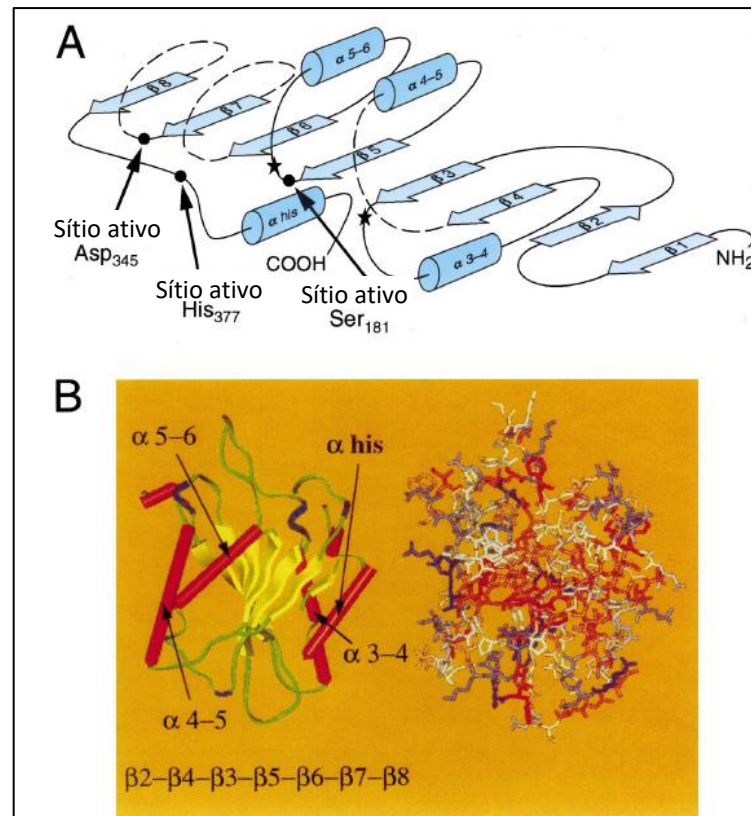
### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Aspectos genéticos da lecitina colesterol aciltransferase (LCAT)

O gene (GRCh37.p13) da LCAT localiza-se no braço curto do cromossomo 16 humano (região 16q22), e é composto por seis éxons. No fígado, onde se expressa com maior intensidade, a síntese da proteína LCAT é aumentada, como pode ser observado pela grande quantidade de transcritos de RNAm (RNA mensageiro). Nota-se, no entanto, que tais RNAm também podem ser encontrados em regiões cerebrais e testiculares (SAEEDI et al., 2015).

Com uma massa molecular de 67 kilodaltons (KDa) (PEELMAN et al., 1998), constituída por 416 resíduos de aminoácidos (Figura 1), a atividade plasmática da enzima LCAT é dependente da concentração. A expressão de LCAT sanguínea apresenta pouca variação em indivíduos com idade, peso, e hábitos similares, sendo sua meia vida de aproximadamente 4-5 dias (CALABRESI et al., 2012).

**Figura 1** – Estrutura da LCAT humana.

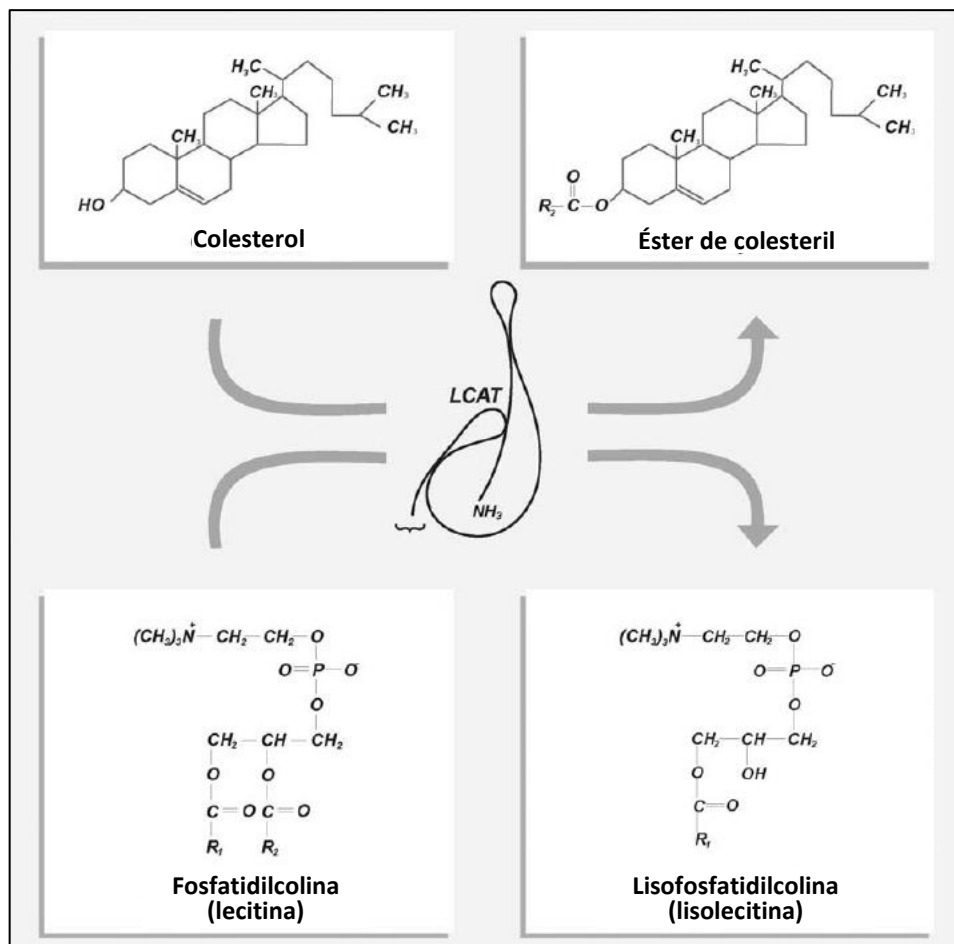


A – Triade catalítica. B – Modelo tridimensional. Fonte: Adaptado de JONAS, 2000.

A LCAT tem como função basal a esterificação do colesterol livre circulante nos fluidos sanguíneos. A referida enzima está exposta na superfície das lipoproteínas, onde catalisa a translocação do grupamento acil do ácido graxo situado na posição 2 da fosfatidilcolina para a posição 3 do colesterol, como evidenciado na **Figura 2** (SAEEDI et al., 2015). A LCAT é principalmente ativada pela lipoproteína apoA-I, mas as enzimas apoA-II, apoC-I e apoE também podem exercer tal função (HIRASHIO et al., 2014).

Após a esterificação, o colesterol migra para o interior das lipoproteínas, o que resulta em uma molécula maior passando subsequentemente pelo processo de maturação (MCINTYRE, 1988).

**Figura 2** – Reação catalisada pela LCAT.



Fonte: Adaptado de LIMA et al., 2004.

Até o presente, já foram descritas cerca de 90 alterações genéticas distintas para o gene GRCh37.p13 (MANTHEI et al., 2017). Tais mutações podem acarretar deficiência total e/ou parcial da síntese de LCAT, e por conseguinte, levar ao comprometimento de processos metabólicos e/ou clínicos do indivíduo portador do gene mutado. As manifestações clínicas apresentadas nas duas síndromes já conhecidas, deficiência familiar de LCAT (FLD), e doença do olho de peixe (FED), não se coadunam quanto à sintomatologia (CONCA et al., 2012).

Ambas as síndromes têm sua gênese na deficiência da síntese da LCAT, portanto, indivíduos portadores têm dificuldade na esterificação do colesterol livre, possuindo assim concentrações muito reduzidas de colesterol HDL. A FLD caracteriza-se pela deficiência total na produção de LCAT, o que leva a muitas alterações fisiológicas, como problemas renais graves, opacificação da córnea, anemias hemolíticas, arteriosclerose moderada, podendo em alguns casos culminar em cardiopatias. Já a FED caracteriza-se pela deficiência parcial de LCAT e manifesta-se clinicamente com a opacificação da córnea e anemias. Apesar de representar a forma menos crítica da patologia, esta não deixa de exprimir grande preocupação (CALABRESI et al., 2005; CARMO et al., 2017).

Por ser uma doença autossômica recessiva rara, a deficiência da LCAT tem uma prevalência inferior a 1:1.000.000, e historicamente, o primeiro caso familiar foi relatado na Noruega em 1967 (TAKAHASHI et al., 2013; MAHAPATRA et al., 2015). Além das síndromes supracitadas, pesquisas recentes apontam para a intercorrência de uma deficiência de LCAT adquirida. Embora o mecanismo pelo qual essa deficiência ocorra ainda não esteja claro, é sugerido que a presença de fatores inibitórios plasmáticos ou anticorpos anti-LCAT, como as imunoglobulinas do tipo IgG, que reconhecem especificamente a enzima LCAT, possam estar inativando-a e levando a uma disfunção. Em contrapartida a essa problemática, para o tratamento, a reposição enzimática e a adequação pra cada paciente é uma prática frequente na clínica (AKIKO et al., 2016; ISHIBASHI et al., 2018).

### 3.2 Diagnóstico e Tratamento

A triagem clínica e laboratorial é a etapa inicial para o diagnóstico da deficiência de LCAT. Nesta última, quantificam-se os valores de colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos, bem como o substrato de LCAT (NANJEE et al., 2003; BAASS et al.,

2009). Além disso, como procedimento padrão para ratificação da suspeita, faz-se necessário a realização de exames de Biologia Molecular, tais como sequenciamento gênico para análise de possíveis mutações no gene da LCAT (CALABRESI et al., 2005).

Pouco se avançou no tratamento de pacientes com deficiência de LCAT, e isso se deu principalmente pela escassez de estudos relacionados, bem como pelo fato de que inibidores plasmáticos podem inativar a ação dos fármacos utilizados na terapêutica. Não obstante, tem-se observado que o uso de anticorpos agonistas podem comprometer a funcionalidade de inúmeros compostos orgânicos, como a LCAT. Adicionalmente, testes que tem como alvo a síntese de proteínas recombinantes similares a LCAT tem se mostrado uma ferramenta promissora na esterificação do colesterol livre (GUNAWARDANE et al., 2016).

### 3.3 Polimorfismos

Nos últimos anos, muito se avançou nas pesquisas direcionadas para a detecção de alterações genéticas na população. Estudos em escala genômica (GWAS – *genome wide association study*) incluindo um grande volume de amostras tem se mostrado muito eficazes na detecção de variantes genéticas únicas, sendo ferramentas muito importantes no diagnóstico de diversas doenças. A identificação de polimorfismos, principalmente os de base única (SNPs, do inglês, *single nucleotide polymorphism*, mudança na sequência do DNA, na qual há alteração de uma base de nucleotídeo) podem fornecer informações importantes acerca do risco associado, correlacionado a características clínicas específicas do indivíduo portador (HAASE et al., 2012).

Em relação ao gene codificador de LCAT, mais de 160 SNPs já foram descritos. Essas variantes polimórficas podem ser semelhantes entre os indivíduos de regiões diferentes. É promissora a realização de pesquisas em determinadas regiões onde o diagnóstico de novos indivíduos com deficiência de LCAT é recente. Com a realização dessas análises moleculares seria possível caracterizar os diferentes perfis genéticos, detectando alterações nucleotídicas existentes no paciente portador da deficiência enzimática de LCAT (AGIRBASLI et al., 2011; NASERI et al., 2015).

A variação genotípica da população brasileira está vinculada, historicamente, ao processo migratório de indivíduos de origens étnicas distintas (SCHWARCZ, 1994).



Não obstante, circunstancialmente, quer seja pelo isolamento geográfico e/ou isolamento reprodutivo, há casos em que essa variação pode diminuir substancialmente, resultando em um fenômeno biologicamente conhecido como efeito do fundador. Este fenômeno restringe a variabilidade genética nas populações, o que é de certa forma preocupante, uma vez que estas podem carrear de forma “contínua” a transmissão de genes mutados culminando em homozigidade (RIDLEY, 2004).

### 3.4 Identificação Humana

A identificação humana é um processo que pode ocorrer em diferentes fases da vida, e é determinada pelo conjunto de características que podem individualizar um ser humano e torná-lo único (FRANÇA, 2017). Este tipo de identificação pode ser utilizado para diversos fins, desde simples testes de paternidade até a resolução de crimes, podendo ser realizado ao longo da vida ou após a morte do indivíduo, utilizando-se para isto amostras biológicas como: sangue, sêmen, urina, cabelo, dentre outros (PRETTY e SWEET, 2001).

Quanto à metodologia, a identificação humana pode proceder de diversas formas, porém cada uma apresenta suas limitações. Como exemplo, a análise de impressões digitais, pode ser inviabilizada pelo estado de deterioração dos corpos quando encontrados. Atualmente, as análises de marcadores genéticos estão sendo bastante utilizadas, possuindo ampla aplicação e sendo consideradas as mais eficazes (CARNEIRO, 2018).

### 3.5 Marcadores Biológicos na Identificação Humana

No que tange as ciências forenses, lançam-se mão dos marcadores biológicos como ferramenta de identificação humana. O uso de biomarcadores, e aqui, podemos destacar os eritrocitários ABO, em meados do século XX que já era globalmente testado e empregado nas análises forenses (JORDE et al., 2004). Os biomarcadores eritrocitários foram utilizados por décadas para auxiliar na elucidação de crimes, como também na investigação de paternidade. Marcadores bioquímicos, como a transferrina, albumina, haptoglobina e dentre outros, também passaram a ter aplicabilidade na identificação humana (BUDOWLE e VAN DAAL, 2008).

Ainda no contexto dos avanços da Ciência quanto aos biomarcadores, o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês, *Major histocompatibility complex*) passou a ser amplamente utilizado na identificação humana. O MHC, que no humano recebe a denominação HLA (do inglês, *Human Leucocyte Antigen*), são moléculas proteicas altamente polimórficas codificadas por um conjunto gênico localizado no braço curto do cromossomo seis. Tais variantes lhe conferem relevante empregabilidade na diferenciação da individualidade biológica humana, quando comparada a outros marcadores biológicos (CALABREZ, 1999).

Com o avançar das pesquisas em Biologia Molecular e a determinação do genoma humano, os cientistas perceberam que sequências, em regiões específicas do DNA, se repetiam, e que ainda, tais sequências de repetições apresentam variação quanto ao número entre os indivíduos. Desde então, o estudo do material genético passou a ser uma ferramenta crucial para a identificação humana na investigação forense (JEFFREYS et al., 1985). Historicamente, desde sua primeira utilização no ano de 1986, o conjunto de técnicas de investigação do DNA, além de ter se tornado rotineiro nos laboratórios forenses, vem passando por constante aprimoramento, visto sua precisão e acurácia, conferindo fidelidade ao caráter investigativo (BUTLER, 2005).

As análises de marcadores biológicos individuais se estabeleceram inicialmente com a metodologia que analisa Polimorfismos de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP, do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism*), conhecidos como microssatélites. No Brasil há cerca de 20 laboratórios com infraestrutura e profissionais capacitados tecnicamente e cientificamente para a solução de crimes com a utilização de microssatélites (KOBACHUK, 2012).

### 3.6 Estudo de Microssatélites em Genética de Populações

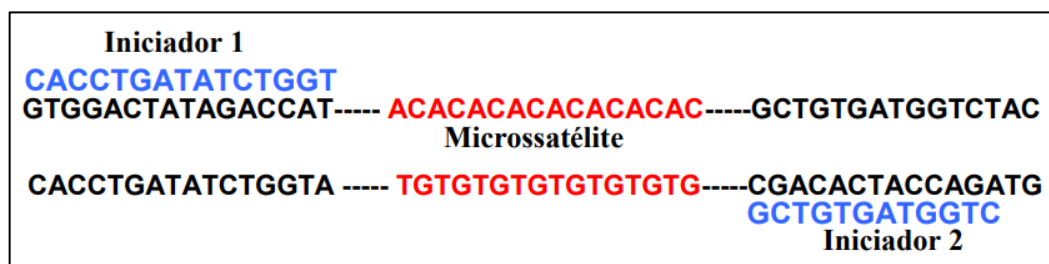
Células eucariotas e/ou procariotas possuem sequências gênicas que se repetem, podendo ser utilizadas como biomarcadores. Fragmentos curtos de pares de bases idênticos que se repetem sequencialmente são conhecidos como repetições *in tandem*. As sequências supracitadas são únicas e conservadas evolutivamente, na maioria dos casos, entre indivíduos da mesma espécie (ELLEGEN, 2004). Por

possuírem grande variabilidade e tamanho de sequência pequeno, as repetições *in tandem* são essenciais na análise de perfis genéticos e representam um grande interesse para toda a área de identificação humana (LEITE et al., 2017).

O DNA humano possui sequências distintas que são compostas por mononucleotídeos (p. ex. GGGG), dinucleotídeos (ex: CA), trinucleotídeos (p. ex. GAT), tetranucleotídeos (p. ex. AAAT), pentanucleotídeos (p. ex. GTCAA) e hexanucleotídeos (p. ex. GATCTA), originando, conseqüentemente, os pontos de repetições. Os STRs (do inglês - *Short Tandem Repeat* ou repetições curtas em tandem), com penta e hexa-nucleotídeos não são tão utilizados na análise forense, por serem menos comuns no genoma humano (BACHER et al., 1999).

Repetições de tetranucleotídeos são frequentemente aplicadas na ciência forense. Devido sua configuração, o risco de que ocorra replicação de artefatos indesejados em alguma das etapas de amplificação é reduzido. O polimorfismo de microsatélites pode ser determinado pela amplificação de regiões do DNA aplicando-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), que utiliza dois iniciadores únicos, complementares à sequências próximas à região de interesse, como pode ser visto na Figura 3. O produto amplificado pode ser visualizado por meio de marcação com corantes fluorescentes em géis de agarose (CAMACHO, 2016).

**Figura 3** – Marcador molecular de microsatélite.



Fonte: CAMACHO, 2016.

Tendo em vista que a amplificação e conseqüente sequenciamento das STRs podem sofrer diversas interferências, principalmente pelo pareamento incorreto dos iniciadores, é imprescindível o conhecimento prévio do fragmento gênico a ser amplificado, como também das regiões que flanqueiam as sequências *in tandem*. É válido salientar que a busca por sequências específicas pode ser feita nos bancos de dados de DNA, como GeneBank, tal recurso se tornou muito importante no estudo do

genoma humano e na identificação de regiões gênicas como biomarcadores putativos (BUTLER, 2005).

Diante do exposto, é possível notar que o uso de microssatélites vigorou nos estudos de genética populacional, e até mesmo, na determinação de paternidade nos últimos anos (VAZQUEZ-LOBO e MORALES, 2014). A relevante aplicabilidade dos marcadores supracitados nos possibilita analisar a gênese e/ou manutenção da diversidade genética nas populações, assim como, a determinação do distanciamento genético entre as mesmas (MARTINS et al., 2006).

### 3.7 Marcadores dos Cromossomos X E Y humanos

Todas as células humanas possuem o DNA distribuído em 23 pares de cromossomos, situados no interior do núcleo, sendo que desses, um par é de cromossomos sexuais. Enquanto os indivíduos do sexo masculino possuem XY, os do sexo feminino possuem XX. Cada par cromossômico é proveniente tanto de herança materna, como paterna.

O cromossomo X possui características únicas. As mulheres herdam um cromossomo X do pai e outro da mãe. Já os homens herdam um cromossomo X apenas da mãe. Este cromossomo representa 5% do conteúdo genético de células femininas e 2,5% das células masculinas. (ROSS et al., 2005). Este cromossomo contém cerca de 3000 genes e codifica cerca de 800 proteínas (BOYD, 2001). Já o cromossomo Y, é bem menor que o cromossomo X, contém aproximadamente 76 genes e codifica proteínas responsáveis principalmente pela determinação do sexo e características masculinas (BRADBURY, 2017). Regiões pseudoautosômicas curtas que são homólogas entre estes cromossomos, como as regiões PAR1 e PAR2, funcionam como um autossomo e sofrem recombinação durante a meiose. Nestas regiões, portanto, os genes são herdados de forma autossômica ao invés de ser ligados ao X (HELENA MANGS e MORRIS, 2007).

No entanto, ainda há um baixo número de estudos publicados sobre polimorfismos no cromossomo X, principalmente quando se pretende realizar estudos comparativos entre populações (SZIBOR et al., 2006), o que por sua vez poderia estar atrasando a utilização deste como um importante marcador.

Geralmente as análises de marcadores X e Y são utilizadas de forma complementar às realizadas nos cromossomos autossômicos. São vantajosas as

análises dos marcadores do cromossomo X no que diz respeito a testes de paternidade e até na identificação de parentes de terceiro grau (SZIBOR et al., 2003). Atualmente, estudos determinam também o elevado grau de polimorfismo nos STRs encontrados no cromossomo Y, se tornando por sua vez uma ferramenta relevante na identificação humana (KURIHARA, 2004). O cromossomo sexual Y está incluso no grupo G e possui uma morfologia específica (acrocêntrica). Além disso, possui um reduzido número de pares de bases, aproximadamente 60 milhões, sendo este considerado um dos menores cromossomos existentes no cariótipo humano. Representa 2% do gradiente total genômico (ALI e HASNAIN, 2002).

Em análises minuciosas do cromossomo Y evidenciou-se 166 novos marcadores, formando um total de 300 microssatélites determinados (KAYSER et al., 2004). A particularidade do sexo masculino existente em grande parte do cromossomo Y e a baixa unidade de recombinação gera uma distribuição alélica particular na população (ROEWER, 2003), tornando assim relevante o uso desses marcadores para avaliação dos arranjos gênicos intra e interpopulações.

## 4 ASPECTOS METODOLÓGICOS

### 4.1 Tipo de estudo

A presente pesquisa é um estudo prospectivo do tipo caso/controle, com enfoque na análise molecular das regiões de microssatélites presentes nos cromossomos sexuais em casos índices com deficiência de LCAT, portadores do gene mutado, bem como seus familiares.

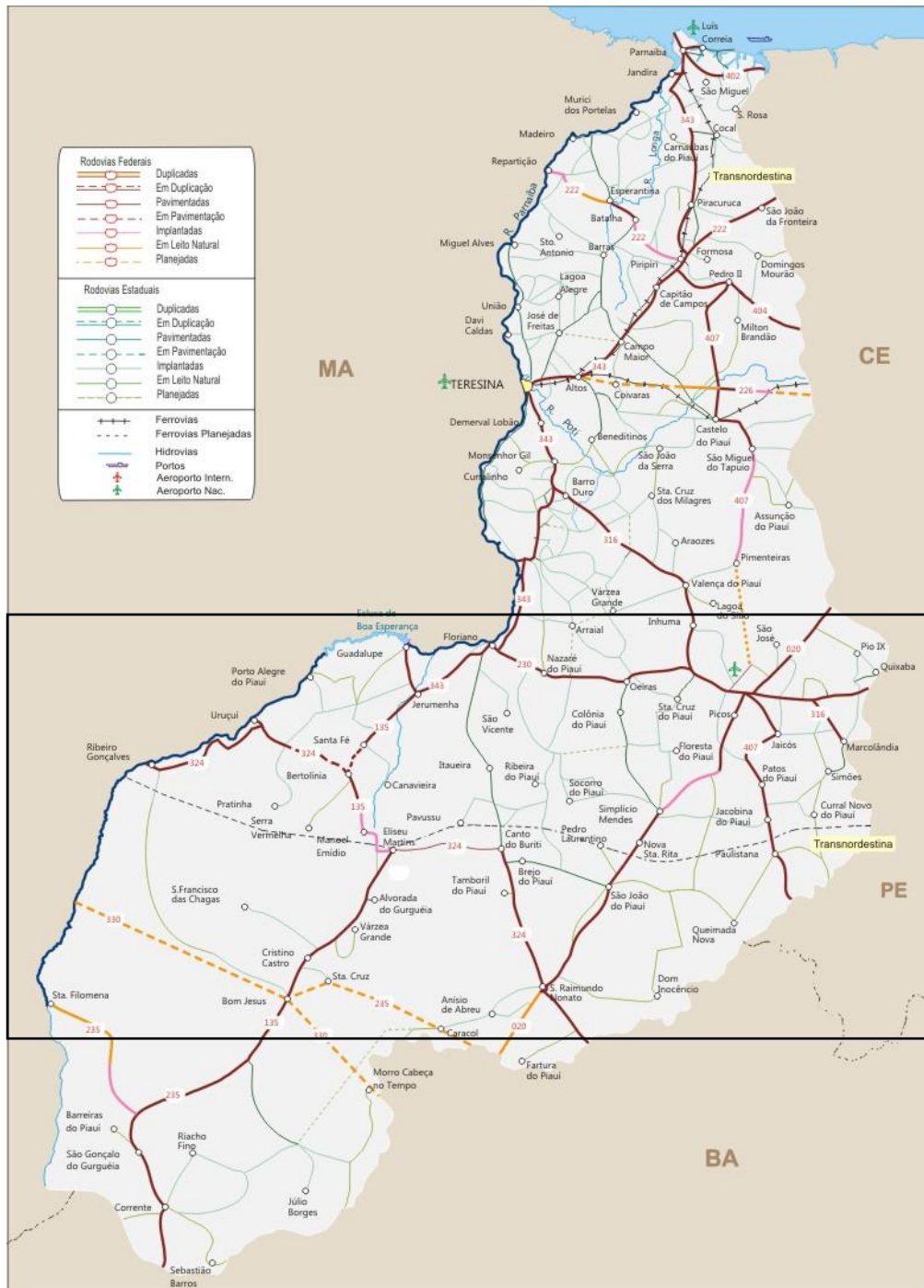
### 4.2 População amostral e aspectos éticos

A pesquisa foi conduzida no Estado do Piauí (Figura 4), localizado no Nordeste do Brasil, entre 2° 44' 49" e 10° 55' 05" de latitude sul e 40° 22' 12" e 45° 59' 42" de longitude oeste, apresentando um total de 224 municípios e, aproximadamente, 3.364.531 habitantes. É uma das vinte e sete unidades federativas do Brasil e possui como capital a cidade de Teresina. Além disso, o Piauí faz fronteira com estados como CE, PE e BA. Estes estados foram considerados como alguns dos principais pontos de entrada de imigrantes em séculos passados (IBGE, 2018; SANTOS et al., 2017).

Participaram do presente estudo indivíduos de cinco famílias distintas, cada uma das quais já possuíam um caso índice determinado por diagnóstico molecular para deficiência de LCAT. Foram utilizados como caso, indivíduos com idades variadas, com diagnóstico molecular confirmatório de deficiência de LCAT (independente da síndrome), com resultados de homozigose, heterozigose ou sem nenhuma das duas variâncias citadas, com ou sem características clínicas evidentes. Além desses foram convidados a participar do estudo familiares de cada probando, todos estes residentes no estado do Piauí.

As diferentes famílias se concentram na região meio-norte do estado do Piauí (representada pela delimitação exposta abaixo - Figura 4). Na Figura 5 é possível observar aproximadamente onde as famílias estão localizadas no que diz respeito a região geográfica. Dos 224 municípios, seis deles (Jerumenha, Paulistana, Canto do Buriti, Rio Grande do Piauí, Patos e Jacobina) possuem indivíduos portadores da doença rara em estudo. O critério base para a seleção desses municípios para este estudo foi a presença de pacientes com suspeita e posterior diagnóstico da deficiência de LCAT.

**Figura 4 – Mapa do Piauí – Brasil.**



Fonte: Ministério dos Transportes, 2018

Utilizando os critérios acima, foi possível selecionar famílias (F) de cinco municípios diferentes: Família F1 - Jerumenha; F2 – Paulistana; F3 – Canto do Buriti e Rio Grande do Piauí; F4 – Patos do Piauí, São Mateus; e F5 – Jacobina do Piauí. Todos os municípios estão destacados pelo círculo vermelho na Figura 5

**Figura 5** – Cinco municípios piauienses com famílias com deficiência de LCAT.



Fonte: Ministério dos Transportes, 2018.

Cada grupo familiar possui seu pedigree desenhado, que por sua vez guiou a obtenção de dados a respeito da transmissão do gene mutado. Como controle foram selecionados indivíduos não portadores da deficiência de LCAT e sem alterações clínicas e laboratoriais característicos desta doença, ou de qualquer outro tipo de doença rara. As amostras foram provenientes do REDOME, tendo o Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Piauí – LIB/UFPI como o fiel depositário. Foram coletados 4 ml de sangue periférico em tubos a vácuo com anticoagulante EDTA, que posteriormente foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , até o momento da etapa de extração do DNA.

Todos os participantes deste estudo e/ou seu responsável legal concordaram em participar da pesquisa, e por sua vez assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A) que continha todas as informações acerca do estudo, finalidade das amostras, resguardo de seus dados e telefone de contato para eventuais questões.

Atendendo as diretrizes da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos, este projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal do Piauí e pelo Conselho Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP) com o CAAE: 03223918.0.0000.5214.



### 4.3 Extração, quantificação e determinação de pureza de DNA

As amostras de sangue periférico foram submetidas à extração do DNA com o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega Inc., USA), de acordo com as especificações do fabricante (Figura 6). Em suma, 300 µl de sangue total de cada amostra foram adicionados à 900 µl de solução de lise celular, que foram homogeneizados e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. Logo, as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 14000 rpm (rotação e tempo padrão), descartado o sobrenadante, e levadas ao vórtex para evitar a formação de grumos nas etapas seguintes. Em seguida, foram adicionados 300 µl de solução de lise nuclear e 100 µl de solução de precipitação de proteínas, onde as amostras foram novamente centrifugadas em rotação e tempo padrão. Adiante, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 300 µl de isopropanol. Para a precipitação do DNA foi necessária a inversão deste tubo repetidas vezes, até que o DNA pudesse ser visualizado. Então, a amostra foi submetida novamente à centrifugação, seguida pelo descarte do sobrenadante e secagem dos tubos sobre papel filtro. A partir dessa etapa seguiu-se a adição de etanol 70% à amostra, sendo realizado uma nova centrifugação e descartado o sobrenadante. O *pellet* resultante foi solubilizado em 100 µl de uma solução de hidratação (H<sub>2</sub>O milliq), e aquecido em banho maria a seco por 10 minutos a 47°C para a evaporação de qualquer substância termolábil.

**Figura 6** – Kit Wizard® Genomic DNA Purification.



Fonte: Promega Inc., 2018.

Para a quantificação do DNA extraído foi utilizado o *NanoDrop® 1000 Spectrophotometer v.3.7* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), Figura 7. A absorvância da amostra foi medida nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm. A pureza do DNA foi determinada como razão de densidades ópticas de absorvância, nos comprimentos de onda 260/280 nm, sendo que a amostra foi considerada satisfatória quando a razão estava entre 1,8 e 2,0. Além disso, foi determinada a concentração de DNA em cada amostra em ng/μl. As amostras permaneceram criopreservadas a -80°C até a realização das próximas etapas.

**Figura 7** – NanoDrop® 1000 Spectrophotometer v.3.7.



Fonte: ThermoFisher Scientific, 2018.

Todas as amostras de DNA tiveram a sua concentração ajustada para 2 ng/μl, a partir das soluções de DNA estoque criopreservadas, para a realização do protocolo *Virefiler Amplification*.

#### 4.4 Análise de fragmento por eletroforese capilar

Atualmente nos centros de pesquisa genética as análises de fragmentos por meio de eletroforese capilar são bastante empregadas. Essa técnica se apoia na definição da extensão de fragmentos amplificados por PCR, no qual se utilizam primers marcados com fluorescência, em comparação com um marcador de comprimento já estabelecido (*size standard*). A análise de diferentes regiões é possibilitada pelas diferentes fluorescências utilizadas (DIAS et al., 2013). Para o

presente estudo foi utilizado o *VeriFiler Express PCR Amplification Kit* (Applied Biosystems) (

**Figura 8).**

**Figura 8 – VeriFiler Express PCR Amplification Kit.**



Fonte: Applied Biosystems, 2018.

#### 4.4.1 Reação de amplificação das regiões de microssatélites

Após a etapa de extração de DNA, os materiais biológicos congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram retirados do freezer e mantidos em temperatura ambiente até o descongelamento parcial (homogeneização realizada utilizando pipetas automáticas). As amostras foram mantidas resfriadas durante todo processo. Resumidamente, foram adicionados em um tubo eppendorf estéril (1,5 ml), 4,0  $\mu\text{L}$  de Master Mix e 4,0  $\mu\text{L}$  de Primer Set (que amplificam os loci STR D3S1358, vWA, D16S539, CSF1PO, TPOX, D8S1179, D21S11, D18S51, Penta E, D2S441, D19S433, TH01, FGA, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, D6S1043, D10S1248, D1S1656, D12S391, D2S1338, Penta D e marcadores de determinação do sexo, Y indel e Amelogenina), sendo esses volumes multiplicados pela quantidade de amostras utilizadas na reação para definir o volume total adicionado ao eppendorf, que por sua vez foi submetido ao vórtex por 3 segundos e centrifugado brevemente. Para todas as reações, foi acrescido ao volume final o total de uma amostra a mais, para fornecer volume em excesso, uma vez que podem ocorrer perdas durante a pipetagem normal dos reagentes.

As reações de amplificação foram realizadas em placas de 96 poços pela adição de 2  $\mu\text{L}$  de DNA e 8  $\mu\text{L}$  de MasterMix / PrimerSet previamente adicionadas em um volume final de 10  $\mu\text{L}$ . Como controle positivo foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  do VeriFiler™ Express Allelic Ladder. As placas foram seladas com película adesiva específica para esta técnica, centrifugadas a 3.000 rpm, por aproximadamente 20 segundos e levadas aos termociclador (*GeneAmp® PCR System 9700* - Applied Biosystems), Figura 9, segundo os ciclos especificados na Tabela 1.

**Figura 9** – *GeneAmp® PCR System 9700* - Applied Biosystems.



Fonte: Applied Biosystems, 2018.

**Tabela 1** – Programa para amplificação da mistura das reações.

Passo	Temperatura	Tempo	Ciclo
Desnaturação inicial	95 °C	1 min.	27x
Desnaturação	95 °C	3 segs.	
Anelamento	59 °C	16 segs.	27x
Extensão	65 °C	29 segs.	
Extensão final	60 °C	5 min.	27x

Fonte: Autoria própria (2018)

#### 4.4.2 Preparo das amostras para eletroforese

As amostras de DNA amplificadas foram preparadas para a etapa de eletroforese capilar. Para a etapa de eletroforese capilar, foram adicionados a um tubo eppendorf estéril 0,4  $\mu\text{L}$  de GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0, e 9,6  $\mu\text{L}$  de formamida Hi-Di™ por amostra, sendo esses volumes multiplicados pela quantidade de amostras utilizadas na reação mais 10% de excesso de volume. Em seguida o tubo foi submetido ao vórtex e centrifugação breve. As reações foram realizadas em placas de 96 poços, onde em cada poço foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  da mistura dos reagentes formamida e Size (9,6 e 0,4  $\mu\text{L}$ , respectivamente), e 1  $\mu\text{L}$  do produto de PCR das amostras, controles negativos e no controle positivo. Nos poços que não foram preenchidos com a reação foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de formamida Hi-Di™. As placas foram seladas, centrifugadas brevemente, aquecidas em um termociclador a 95°C por 3 minutos, em seguida colocadas em gelo e adicionadas ao amostrador automático para iniciar a etapa de eletroforese capilar pelo equipamento sequenciador automático ABI PRISM 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA - US), mostrado na Figura 10, que dispõe de programas específicos para coleta e análise dos dados, gerando arquivo em formato abi, que pode ser interpretado e analisado por programas de análise de sequências e busca de microssatélites.

**Figura 10** – ABI PRISM 3500xl Genetic Analyzer.



Fonte: Applied Biosystems, 2019.

#### 4.5 Análise estatística

As populações caso e controle foram testadas quanto ao seu equilíbrio pela lei de Hardy-Weinberg. As frequências genótípicas e alélicas observadas nos pacientes com deficiência de LCAT e seus familiares foram comparadas com os controles negativos usando: (i) Análise de agrupamento (UPGMA), (ii) Análise discriminante de componentes principais (DAPC), *Minimal Spanning Network* e a Análise de estrutura de grupos genéticos (Estatística Bayesiana). As análises foram realizadas por meio do programa IBM SPSS Statistics 20.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise das famílias por heredograma

A análise das diferentes famílias estudadas evidenciou um padrão autossômico recessivo de transmissão, com 10 membros afetados (homozigotos), 50 não afetados, porém portadores do alelo recessivo (heterozigotos) e 7 que não demonstraram nenhuma característica de herança genética da deficiência de LCAT (Tabela 2). Os pedigrees das famílias são intitulados nas figuras pelas iniciais de cada caso índice, como podem ser observados abaixo.

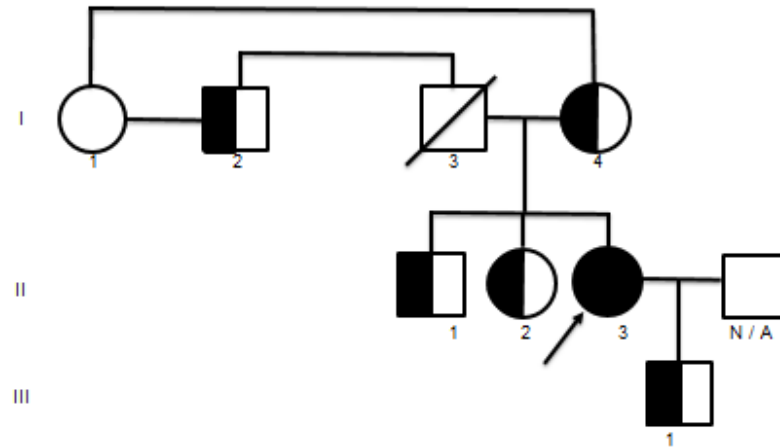
**Tabela 2** – Total de amostras de portadores de deficiência de LCAT e seus familiares.

	<b>Total Amostras</b>	<b>Mulheres</b>	<b>Homens</b>
<b>NÃO PORTADORES</b>	7	4	3
<b>PORTADORES</b>	60	35	25
<b>TOTAL</b>	67	39	28

As figuras a seguir representam pedigrees de 5 famílias brasileiras residentes no estado do Piauí com mutações no gene GRCh37.p13 que é codificador da enzima LCAT.

Na árvore familiar (Figura 11 – Família F1) envolvendo seis indivíduos diagnosticados, sendo três do sexo masculino e três do sexo feminino, foi possível observar a predominância de indivíduos heterozigotos nos diferentes sexos. O caso índice desta família foi uma paciente do sexo feminino (II-3), com a variante homozigota c.803G>A p.(Arg268His). Adicionalmente, também foi encontrada uma paciente do sexo feminino sem nenhuma variante (sem nenhuma mutação) (I-1).

**Figura 11 – Heredograma da família F1.**

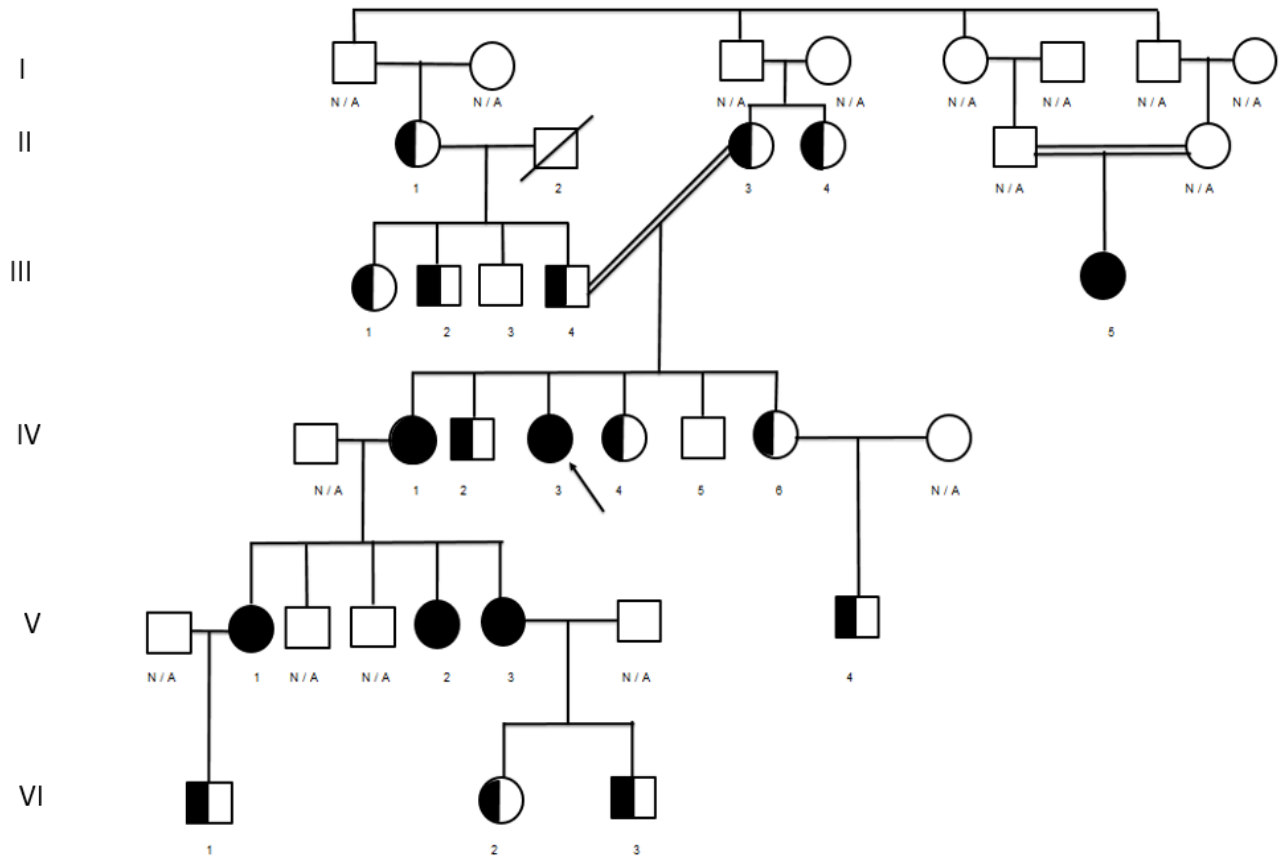


(i) Os probandos são indicados por setas. (ii) Os símbolos preenchidos indicam portadores de variante homozigota (quadrado: sexo masculino; círculo: sexo feminino); (iii) símbolos preenchidos à esquerda indicam portadores de variante heterozigota; (iv) símbolos brancos indicam indivíduos não portadores; (v) símbolos cortados indicam indivíduos falecidos; (vi) N / A indica membros da família não disponíveis para análise e sem informação gerais sobre os mesmos;

Na árvore familiar da família F2 (12) envolvendo vinte e um indivíduos, sendo oito do sexo masculino e treze do sexo feminino, observou-se um maior número de casos com a variante homozigota c.803G>A p.(Arg268His), sendo todos do sexo feminino, incluindo o probando (IV-3). Dois indivíduos do sexo masculino (III-3 e IV-5) não foram diagnosticados com a mutação. E é possível observar que todos os indivíduos afetados (homozigotos) são provenientes de um cruzamento consanguíneo na mesma linhagem familiar.



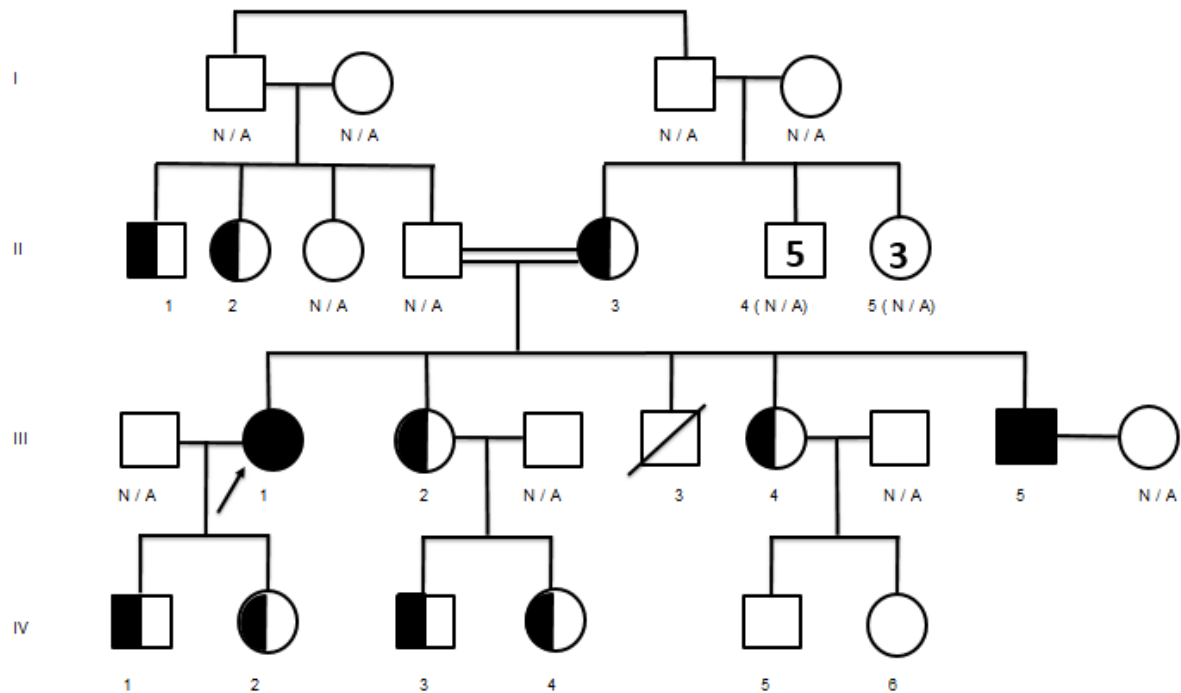
**Figura 12 – Heredograma da família F2.**



(i) Os probandos são indicados por setas. (ii) Os símbolos preenchidos indicam portadores de variante homocigota (quadrado: sexo masculino; círculo: sexo feminino); (iii) símbolos preenchidos à esquerda indicam portadores de variante heterocigota; (iv) símbolos brancos indicam indivíduos não portadores; (v) símbolos cortados indicam indivíduos falecidos; (vi) N / A indica membros da família não disponíveis para análise e sem informação gerais sobre os mesmos;

No heredograma da família F3 (Figura 13) envolvendo treze indivíduos diagnosticados, sendo cinco do sexo masculino e oito do sexo feminino, é observado a predominância de heterocigotos nos diferentes sexos. Um indivíduo do sexo feminino (III-1) e um do sexo masculino (III-5) são homocigotos c.803G>A p.(Arg268His) para a mutação, sendo ambos provenientes de um casamento consanguíneo.

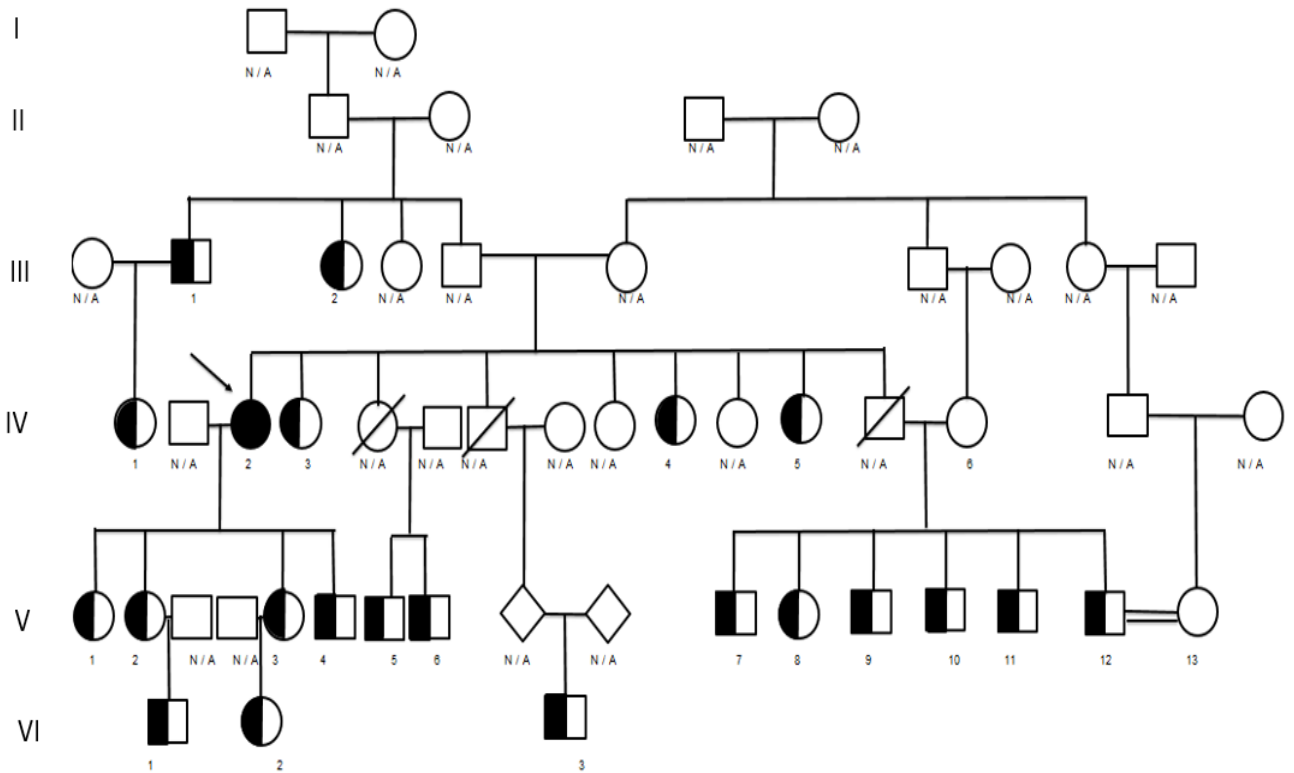
**Figura 13 – Heredograma da família F3.**



(i) Os probandos são indicados por setas. (ii) Os símbolos preenchidos indicam portadores de variante homocigota (quadrado: sexo masculino; círculo: sexo feminino); (iii) símbolos preenchidos à esquerda indicam portadores de variante heterocigota; (iv) símbolos brancos indicam indivíduos não portadores; (v) símbolos cortados indicam indivíduos falecidos; (vi) N / A indica membros da família não disponíveis para análise e sem informação gerais sobre os mesmos; (vii) números dentro dos símbolos representa a quantidade da prole pertencente ao mesmo.

Quanto à família F4, observa-se na árvore familiar (Figura 14) vinte e quatro indivíduos diagnosticados, sendo onze do sexo masculino e treze do sexo feminino. Há a predominância de indivíduos heterocigotos nos diferentes sexos. Apenas um indivíduo do sexo feminino (IV-2) foi diagnosticado com a variante homocigota c.803G>A p.(Arg268His). Ocorreu um casamento consanguíneo na família, porém não há informações sobre a respectiva prole.

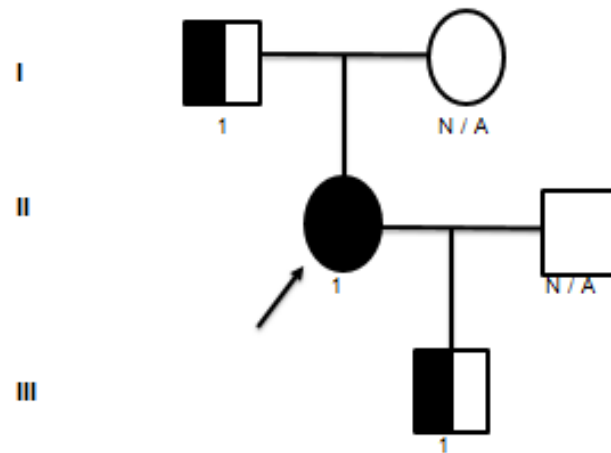
**Figura 14 – Heredograma da família F4.**



(i) Os probandos são indicados por setas. (ii) Os símbolos preenchidos indicam portadores de variante homocigota (quadrado: sexo masculino; círculo: sexo feminino); (iii) símbolos preenchidos à esquerda indicam portadores de variante heterocigota; (iv) símbolos brancos indicam indivíduos não portadores; (v) símbolos cortados indicam indivíduos falecidos; (vi) N / A indica membros da família não disponíveis para análise e sem informação gerais sobre os mesmos.

Por fim, o heredograma da Família F5 (Figura 15) incluiu três indivíduos diagnosticados, sendo dois do sexo masculino e uma do sexo feminino. É observado a heterocigose nos indivíduos do gênero masculino (I-1 e III-1) e a variante homocigota no gênero feminino (II-1).

**Figura 15** – Heredograma da família F5.



(i) Os probandos são indicados por setas. (ii) Os símbolos preenchidos indicam portadores de variante homozigota (quadrado: sexo masculino; círculo: sexo feminino); (iii) símbolos preenchidos à esquerda indicam portadores de variante heterozigota; (iv) símbolos brancos indicam indivíduos não portadores; (v) N / A indica membros da família não disponíveis para análise e sem informação gerais sobre os mesmos.

As doenças raras são caracterizadas por uma ampla diversidade de sinais e sintomas que geralmente são crônicos, progressivos, degenerativos, podendo ser incapacitantes e afetar a qualidade de vida de pessoas e seus familiares (SAÚDE, 2014). Neste contexto enfatizamos uma deficiência metabólica de origem genética que resulta em uma redução extrema dos níveis do colesterol HDL, característico das dislipidemias monogênicas, que incluem hipoalfalipoproteinemia familiar, doença de Tangier e deficiência de lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) (FALUDI et al., 2017).

A deficiência da enzima lecitina-colesterol aciltransferase é definida como uma doença autossômica recessiva muito rara (VAN DEN BOGAARD et al., 2012), sua prevalência mundial é menor que 1:1.000.000 (TAKAHASHI et al., 2013; MAHAPATRA et al., 2015). Até o momento, cerca de 70 famílias com casos isolados de deficiência parcial ou completa de LCAT foram identificadas em todo o mundo (KUNNEN e VAN ECK, 2012). Esta prevalência mundial pressupõe que as quantidades representativas de portadores do alelo defeituoso da LCAT no estado do Piauí deveriam ser numericamente muito pequenas pois trata-se de um estado com uma densidade populacional muito baixa, apresentando um total aproximado de 3.364.531 habitantes segundo o censo demográfico de 2018 (IBGE, 2018).

Porém em dados anteriores não publicados pela nossa equipe de pesquisa foram encontradas um total de 67 indivíduos portadores do alelo defeituoso no estado, mostrando que existe um fator determinante para o aumento expressivo da incidência de casos dessa mutação no estado do Piauí, o que pode ser teorizado como sendo resultante de transmissão familiar com possíveis relações de consanguinidade na população ancestral que levaram a redução da variabilidade genética nessa região (SANTOS et al., 2013).

Em especial para condições autossômicas recessivas existe um papel da herança mendeliana que tem participação decisiva na incidência de casos da doença, o que pode sugerir que existe uma relação intrínseca de um “efeito fundador” com transmissão gênica de alelos defeituosos por indivíduos portadores para seus descendentes (OTTO et al., 1998; SOARES, 2012).

Neste caso, por ser uma doença de herança autossômica recessiva, existe uma relação familiar muito tênue pois o diagnóstico do filho doente revela para os pais a sua condição de portadores de um gene “defeituoso”, que para eles não provoca a doença, mas que representa 25% de chance de gerarem filhos com a doença (CORRÊA e GUILAM, 2006; AURELIANO, 2018).

Este fenômeno pode ser observado nos heredogramas apresentados nos resultados deste estudo. Por ser uma doença autossômica recessiva, é esperado que a mesma apareça de forma inesperada dentro das linhagens familiares. No entanto, nas análises dos heredogramas, foi possível observar que todas as gerações tendem a ter indivíduos portadores, bem como afetados, o que sugeriria por sua vez uma característica autossômica dominante, conforme Queiroz et al., (2013). Entretanto, a literatura postula a hipótese de que também deve-se considerar a baixa variabilidade genética nessas famílias, uma vez que poderia ter ocorrido casamentos consanguíneos nas gerações anteriores, o que confirmaria assim o caráter recessivo da doença (OTTO et al., 1998).

## 5.2 Testes de diversidade de informação genética e endogamia

O coeficiente de endogamia indica a probabilidade de um indivíduo possuir dois alelos idênticos herdados de um ancestral comum (BEIGUELMAN, 2008). Este é calculado pela estimativa “F”, onde o índice varia de -1,0 a +1,0. Os valores em que se considera endogamia são os positivos. Quanto mais próximo de +1,0, maior é a

probabilidade de ter ocorrido relações consanguíneas. Como mostrado na Tabela 3, foram observados valores baixos nos coeficientes de endogamia nas famílias. O que se pode inferir com estes dados contidos na tabela é que, se existe uma tendência na família a “casamentos consanguíneos”, essa tendência ocorre há pouco tempo ou não é recorrente. As análises por microssatélites por si só não nos permitiriam definir muito a respeito do efeito fundador (a não ser que fossem marcadores fortemente ligados aos genes em questão).

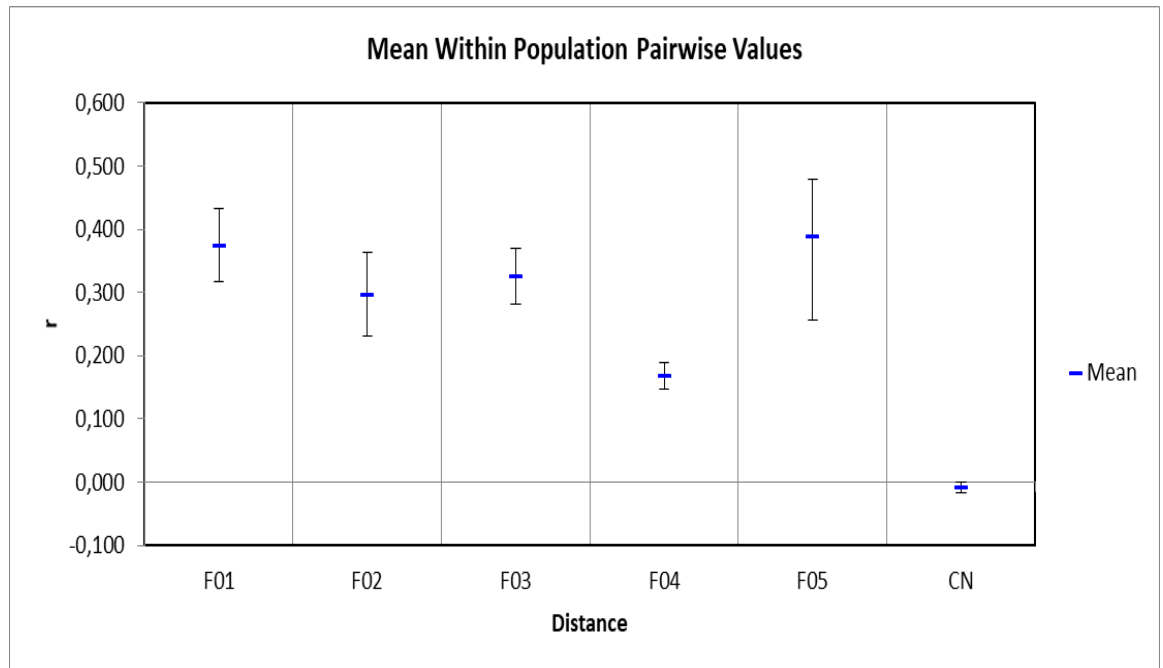
**Tabela 3** – Estimativas de índices de diversidade genética entre as famílias.

GRUPOS	N	Na	Ho	He	F
F01	6	3,739	0,775	0,588	-0,3
F02	11	4,391	0,708	0,619	-0,137
F03	13	4,696	0,729	0,61	-0,194
F04	23	5,87	0,803	0,794	-0,136
F05	3	3,043	0,797	0,548	-0,442
CN	36	8,652	0,826	0,792	-0,045
MÉDIAS	15,333	5,065	0,773	0,644	-0,209

(i) O tamanho amostral é representado pela letra **N**; (ii) o número de alelos é representado pela letra **Na**; (iii) a heterozigose observada é representado pela letra **Ho**; (iv) os dados referente a heterozigose esperada são representados pela letra **He**; seguida da letra **F**, que representa o índice de endogamia, como supracitado.

Para confirmar a ocorrência de similaridade genética entre os indivíduos das famílias, realizou-se uma análise de parentesco (QUELLER e GOODNIGHT, 1989), sendo esta indicada pelo coeficiente **r**. De acordo com a análise, foi confirmada que a estimativa de parentesco médio nas famílias estava acima do parentesco médio encontrado no grupo controle que possui amostras aleatórias, como pode ser observado na Figura 16.

**Figura 16** – Parentesco médio por família (F1 a F5) e na população controle (CN).



Fonte: Programa SPSS (2018).

A variável  $r$ , como pode ser visto na figura acima, que indica a correlação de parentesco variou de 0,17 a 0,39 nas diferentes famílias, enquanto para o controle negativo foi próximo de zero. Os valores dentro das famílias se apresentam um pouco elevados, tendo em vista que valores teóricos esperados entre irmãos, ou entre pai e filho, são de 0,5.

No entanto, quando se agrupa as famílias em um único cluster para verificar se existe algum grau de parentesco entre elas, o coeficiente  $r$  cai para 0,03, indicando por sua vez que o parentesco entre famílias testadas não é tão expressivo.

De acordo com Gutiérrez e Goyache (2005), o coeficiente de parentesco é estabelecido através da probabilidade de um alelo qualquer tomado ao acaso na população pertencer a determinado indivíduo, o que permite compreender a semelhança de ancestralidade, já o coeficiente de endogamia é definido como probabilidade de dois alelos idênticos por descendência estarem presentes em um mesmo indivíduo (PEREIRA, 2017).

Dessa forma foi analisada a diversidade genética em indivíduos de diferentes grupos para o estabelecimento do coeficiente endogâmico. De acordo com Carvalheiro (2004) "o grau de endogamia de um determinado indivíduo é definido pelo

coeficiente de endogamia (F) ou precisamente, pela exequibilidade de dois alelos em um único loco, tomando ao acaso que sejam idênticos por ascendência.

O isolamento geográfico pode ser um ponto importante sobre a baixa variabilidade genética. Este, juntamente com o efeito endogâmico, tem sido evidenciado como fatores relevantes sobre a elevação da taxa de doenças raras nas populações, com base em um suposto efeito fundador disperso na população de determinadas regiões geográficas (MACEDO-SOUZA et al., 2009; SANTOS et al., 2010). Estudos realizados na população do nordeste demonstraram que indivíduos que residem em zonas rurais próximas possuem porcentagens significativas de casamentos entre pessoas aparentadas ou que se localizam na mesma região e portanto isso gera uma falta de variabilidade genética (SANTOS et al., 2010).

### 5.3 Análise de grupamento (UPGMA)

Foi realizada uma análise de grupamento (UPGMA) com base na distância genética de Nei (NEI, 1987) entre indivíduos. Esse procedimento de ligação simples produz um dendograma que prioriza as similaridades entre grupos, reduzindo a capacidade de discriminar os mesmos. Em todas as análises realizadas, o índice de aquele pertencer aos outros agrupamentos foi bastante evidente, como pode ser determinado pelo bootstrap (10.000 repetições) superior a 50 % em todas as análises, dando uma maior confiança aos resultados.

Uma inspeção visual do dendograma demonstra que os ramos formados na Figura 17 possuem pontos interessantes, como, (i) a maior parte dos indivíduos controles (CNg) ficaram agrupados separadamente dos demais; (ii) ao analisar as ramificações é possível observar que a família F4 se agrupa isoladamente; (iii) nos ramos subsequentes temos mais dois pequenos grupos formados por amostras de controles, o que pode ser explicado a partir de dados na literatura que relatam que indivíduos isolados de famílias distintas em alguns casos podem ser mais próximos geneticamente de outras famílias do que da sua, por conta de alelos “pré-históricos” passados ao longo do tempo. (iv) além disso, um ponto importante a se considerar é a formação de outros grupos que abrigam as famílias F1, F2, F3 e F5, demonstrando por sua vez que não há um grau elevado de parentesco entre elas.

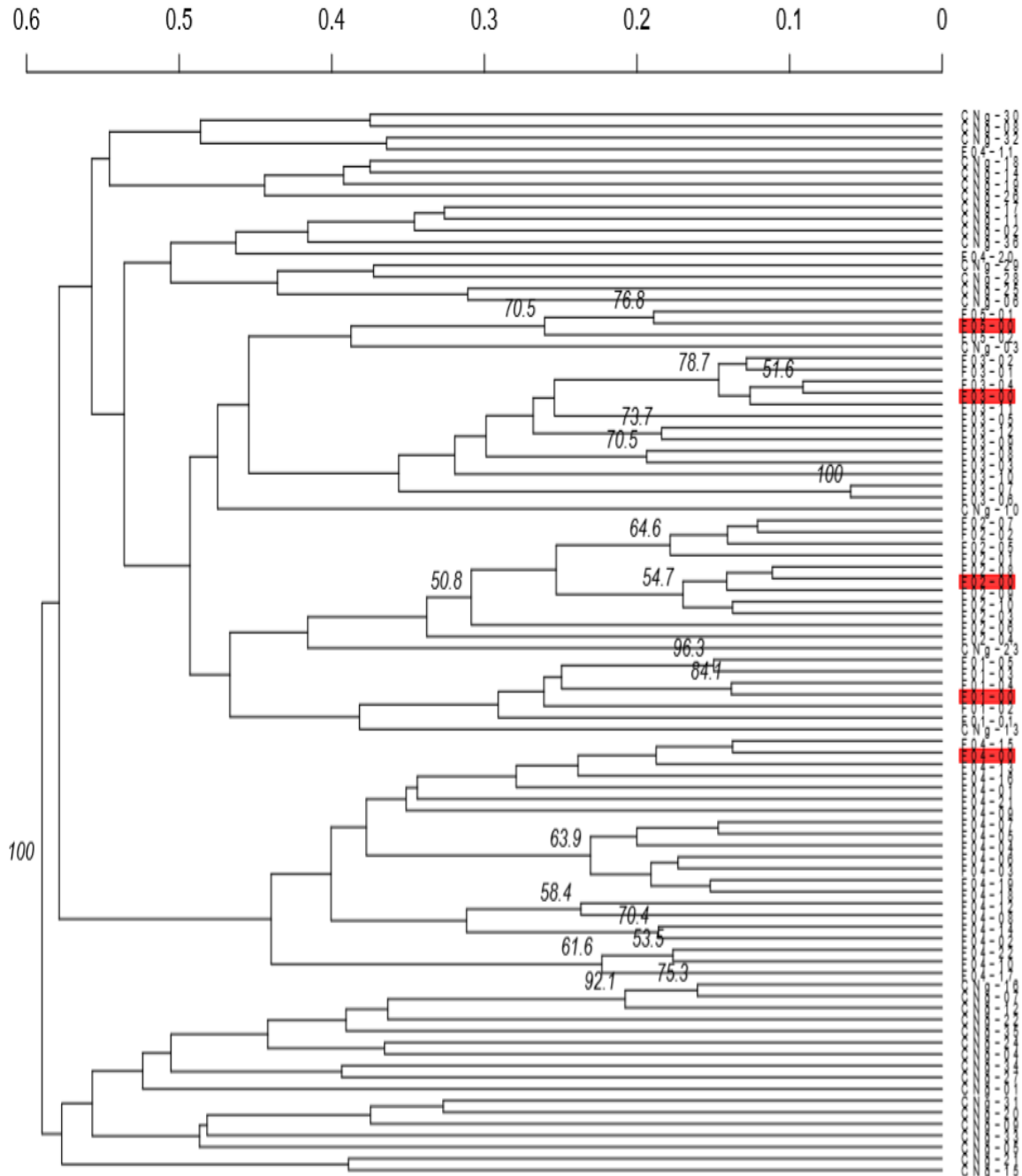
Quanto à origem dos “ramos”, analisando as informações como um todo, é observado de forma evidente que as famílias F1, F2, F3 e F5 são descendentes de



um ramo principal. Apenas a família F4 ficou entre dois ramos de “grupo controle” antes de se agrupar com as demais famílias.

Com base nesses dados não se permite confirmar estatisticamente a existência de um efeito fundador, como objeto inicial da pesquisa, mas demonstra uma possibilidade de que isto possa ter acontecido a algum tempo atrás restringindo a variabilidade genética ao longo das gerações, incluindo como fator determinante também a característica de consanguinidade recente nas diferentes gerações, como supracitado.

**Figura 17** – Dendrograma da análise de agrupamento UPGMA baseado na distância genética entre os cluster analisados.



Fonte: Programa SPSS (2018)

#### 5.4 Análise discriminante de componentes principais (DAPC)

A DAPC é um instrumento excepcional para investigar a estrutura genética das populações sem fazer suposições de panmixia (PRITCHARD et al., 2000). Foi

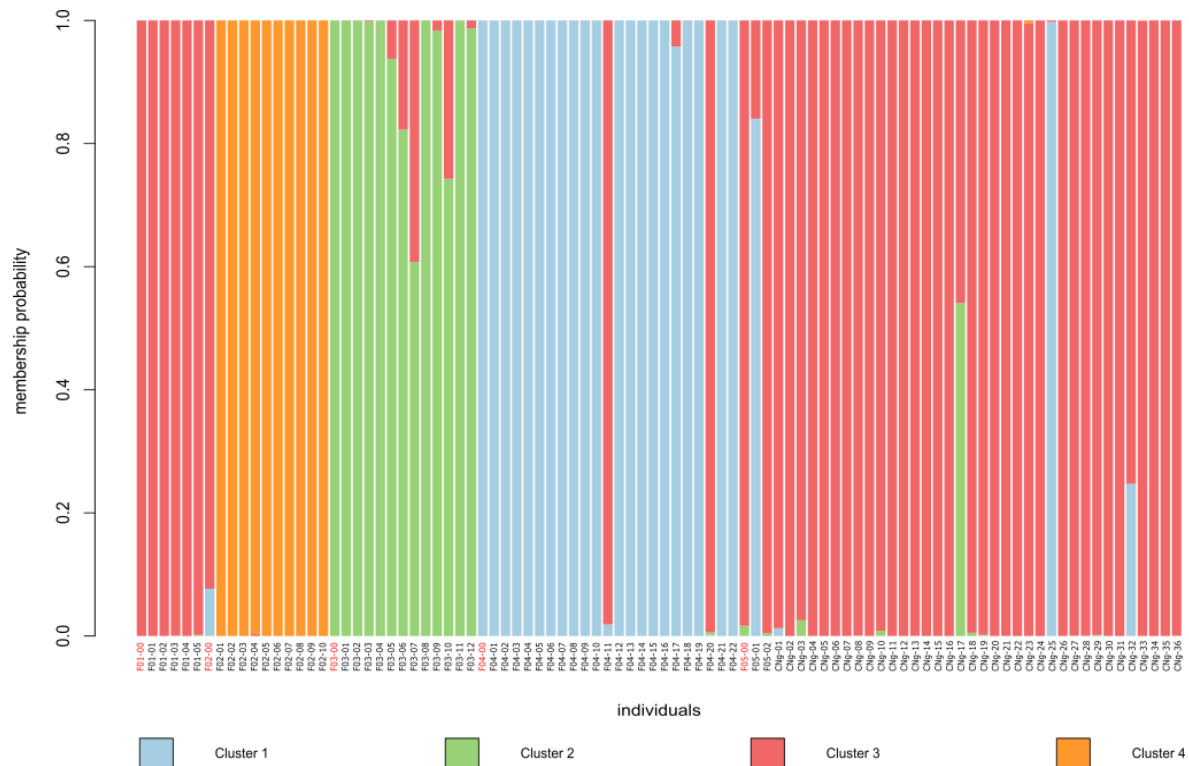
realizada inicialmente uma análise discriminante para definir a presença de grupos genéticos entre as amostras. O teste indicou a presença de 4 grupos que estão arrançados de acordo com as cores mostradas na Figura 18 no qual os indivíduos do grupo vermelho (controles) demonstraram ser muito heterogêneos, assim como a família F1.

O grupo representado pela cor vermelha apresenta quase todas as amostras do grupo controle, mais as famílias F1 e F5, e alguns indivíduos de outras famílias como pode ser observado. Outro fato importante é o grupo vermelho incluir-se nos casos de LCAT das famílias F1, F2 e F5, o que pode ser explicado pela elevada heterogeneidade desses indivíduos. As demais famílias encontram-se bem “estruturadas” em grupos de cores específicas, havendo pouca mistura genética entre estes indivíduos:

- (i) a cor laranja inclui a família F2, com exceção de um caso LCAT (F02-00), que parece não pertencer a mesma, com origem compartilhada entre o grupo vermelho e azul;
- (ii) a cor verde é referente aos indivíduos da família F3 com alguma participação genética do grupo vermelho em alguns indivíduos;
- (iii) o grupo determinado pela cor azul, inclui a família F4, com alguns indivíduos tendo maior probabilidade de se enquadrarem no grupo vermelho. Ainda no grupo azul encontra-se um indivíduo da família F5 (F05-01).

Sugere-se a investigação dos indivíduos que intercambiam entre famílias/grupos de forma isolada, pois estes podem ser os responsáveis por transportar o alelo mutante da LCAT. Uma possível explicação é que indivíduos que não apresentam a deficiência de LCAT, mas que são portadores da mutação (heterozigotos) também podem contribuir com a transmissão de alelos “mutantes”.

**Figura 18** – Análise discriminante de 4 clusters (casos de LCAT e CNg)



Análise discriminante de componentes principais. Cada barra representa um indivíduo e, as cores distintas sobre o mesmo, indicam a probabilidade de ele pertencer a um determinado grupo que não seja o seu de origem.

### 5.5 Minimal Spanning Network

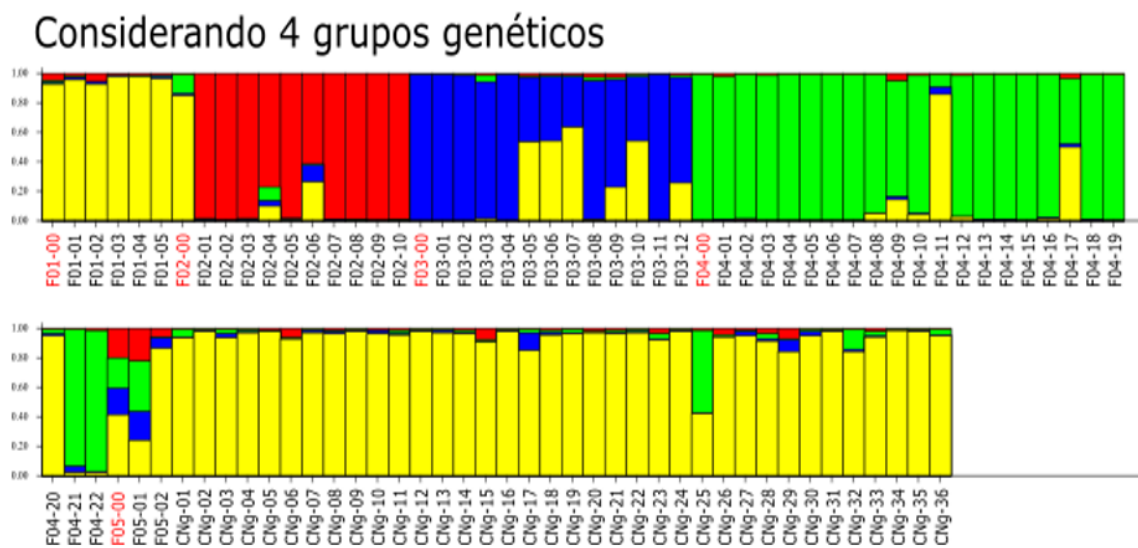
No que diz respeito às origens dos indivíduos, realizou-se uma análise sobre conectividade entre as amostras participantes. A mínima rede de abrangência (*minimal spanning network* – Figura 19) representa a ligação entre as amostras analisadas. Nesta análise, tentou-se demonstrar a conectividade entre os indivíduos utilizando a distância de Bruvo (BRUVO et al., 2004), que leva em consideração um modelo baseado em informações de microssatélites. As distâncias entre dois indivíduos são representadas na figura por meio de círculos, sendo que quanto mais próximos dois círculos estão, maior é a conectividade genética. Quanto maior a linha entre eles, maior a diferença gênica.

Nesta análise pode-se observar que as famílias F3, F4 e F5 aparecem em um “ramo” isolado, indicando uma conectividade entre as famílias “F3 e F4”, e entre a “F4 e F5”. A família F1 e a maior parte da família F2 aparecem próximas uma da outra, indicando também uma proximidade entre estas.



Usando duas abordagens distintas de teste de grupos, foi possível observar a presença de 4 grupos genéticos indicados pelas diferentes cores (veja figura abaixo). Como pode ser observado na família F1 que é representada pelo grupo de cor amarela, que tem alguns indivíduos com uma pequena contribuição genética do grupo vermelho.

**Figura 20** – Análise dos diferentes grupos genéticos por uma abordagem Bayesiana



Fonte: Programa SPSS (2018)

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Todos os indivíduos estudados residem na mesma delimitação geográfica definida pelo estudo, o que gera a hipótese de que a localização é um fator determinante. Observando as cinco famílias, de forma geral, é evidente o caráter autossômico recessivo raro, por meio da baixa variabilidade genética como pode ser observado nos heredogramas. Por mais que seja comum a endogamia na região nordeste do Brasil, e essas uniões possam afetar o desenvolvimento de doenças raras, este fator relacionado a consanguinidade não é responsável pela alta frequência dos casos de LCAT.
- Se existe alguma relação com o processo de endogamia, este não ocorreu de forma recorrente nas últimas gerações e nem foi um fator comum para todas as famílias estudadas. Entretanto, é de responsabilidade do sistema de saúde brasileiro levar informações as comunidades em relação ao risco existente de doenças raras surgirem a partir de casamentos consanguíneos.
- Com os dados dos microssatélites dos cromossomos sexuais não foi possível trabalhar formalmente a hipótese do efeito fundador, uma vez que este atua na maioria dos casos de forma complementar a outras análises genéticas, como o estudo de polimorfismos de base única - SNPS. Um ponto relevante nas análises, é o fato de algumas famílias parecerem ser bem coesas com relação à sua composição genética, formando grupos que, na maioria dos casos, abrigou boa parte dos indivíduos (como pôde ser verificado na análise DAPC e nos grupamentos).
- A análise de *minimum spanning network* demonstra haver uma certa conectividade entre as famílias estudadas, seja pela proximidade genética entre algumas delas (ou seja, famílias diferentes agrupadas entre si e distantes do grupo controle), ou pelo fato de haver alguns indivíduos que tem sua genética mais próxima de outras famílias do que a sua própria.
- Por fim, as análises de grupamento, mostram uma tendência das famílias F1, F2, F3 e F5 possuírem uma origem em comum, porém o bootstrap nestas análises foi baixo. Outras análises realizadas indicam conectividade entre as famílias “F3 e F4”, entre a “F4 e F5” e entre a “F1 e F2”.

## ANEXOS

### Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

1-4



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E SAÚDE  
LABORATÓRIO DE IMUNOGENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR (LIB-UFPI)**

#### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

**Título do projeto:** CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E RELAÇÃO GENOTÍPICA ENTRE OS MEMBROS DE SEIS DIFERENTES FAMÍLIAS COM DEFICIÊNCIA DA ENZIMA LCAT, RESIDENTES NO ESTADO DO PIAUÍ

**Pesquisador responsável:** Dr. Adalberto Socorro da Silva

**Pesquisador participante:** Dr. Rafael Melo Santos de Serpa Brandão

**Telefone para contato (inclusive a cobrar):** (86) 99944-1742

**E-mail:** higoneri@gmail.com / higo\_gprs@hotmail.com

**Instituição/Departamento:** Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular (LIB-UFPI)

O Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa, leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma. Neste presente estudo pretendemos determinar o grau de parentesco por meio da análise do material genético entre as populações estudadas, com o intuito de determinar a existência de um possível ancestral comum entre as famílias que são portadoras da deficiência de LCAT. Será realizado o diagnóstico laboratorial utilizando o DNA dos indivíduos participantes do estudo, será identificado as alterações na sequência do DNA que possam vir a gerar a deficiência de LCAT. Será construído uma árvore genealógica utilizando os dados familiares informados pelos membros da família.

Todas as páginas do presente termo de consentimento serão rubricadas pelo pesquisador responsável ou pessoa por ele delegada e pelo participante da pesquisa, bem como no local indicado na última folha. Para realização do estudo será necessário a consumação de alguns procedimentos: a) participação de entrevistas com a finalidade de verificar possíveis ancestralidades ou localidades vividas em comum para nortear a



2 - 4

construção de possíveis hipóteses; e b) coletas de materiais biológicos para a análise das estruturas genéticas, com o intuito de demonstrar prováveis associações hereditárias entre as famílias. As coletas e as entrevistas serão agendadas a sua conveniência, de acordo com o seu horário disponível, no qual será de suma importância a cooperação do participante, pois assim a pesquisa se tornará mais peculiar, tentando melhorar assim a qualidade de vida dos pacientes portadores da deficiência de LCAT, visto que a escassez da mesma eleva os níveis de colesterol livre, prejudicando assim as ações bioquímicas das células.

#### RISCOS E DESCONFORTOS:

Os possíveis riscos do presente estudo são:

- Divulgação de dados confidenciais;
- Risco a segurança dos prontuários;
- Interferência na vida e na rotina dos sujeitos, referente ao dia da coleta do material biológico;
- Uso da amostra para novas pesquisas sem a autorização do sujeito;
- Estigmatização a partir da divulgação dos resultados;
- Divulgação de dados confidenciais;
- Descarte inadequado do material; e
- Provável invasão de privacidade.

O paciente pode se sentir desconfortável ao ser abordado pelo pesquisador para a explicação e assinatura do TCLE. Mas de forma a minimizar tais riscos, os pesquisadores envolvidos na entrevista sobre a história de seus antepassados explicarão primeiramente do que se trata o projeto e a importância da colaboração da paciente para o estudo, deixando-a a vontade para decidir se deseja ou não fazer parte, de forma a minimizar esse desconforto. O risco na coleta de sangue é inerente ao próprio procedimento de rotina, porém contamos com um profissional qualificado para a realização do procedimento citado, não estando relacionado ao presente projeto de pesquisa. O paciente pode sentir um desconforto no local em que seja colhida a amostra; caso ocorra, o técnico irá realizar o procedimento adequado. O descarte do material deve seguir as normas da ANVISA e o mesmo será informado no TCLE. Será garantido o acesso aos resultados individuais e coletivos. Asseguraremos a confidencialidade e a privacidade, a proteção da imagem e a não estigmatização, garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades. Não existe a probabilidade de ocorrência de um resultado desfavorável, de um dano ou de um fenômeno indesejado, mas caso surja, será tomada as medidas cabíveis a tal situação. O patrocinador e a instituição assumirá a responsabilidade de dar assistência integral às complicações e danos decorrentes dos riscos previstos.

**BENEFÍCIOS:** Por meio do estudo será possível oferecer elevada possibilidade de gerar conhecimento para entender, prevenir ou aliviar tal deficiência e até mesmo seus aspectos genéticos dentro da família, melhorando por vez o bem-estar dos sujeitos da pesquisa e de outros indivíduos futuramente diagnosticados. Será possível retribuir identificando da melhor forma um possível aconselhamento genético, contribuindo para o avanço da saúde, do diagnóstico mais preciso, dos meios profiláticos mais adequados e até mesmo o desenvolvimento de novas tecnologias em virtude das informações coletadas serem utilizadas unicamente com fins científicos, sendo garantidos o total sigilo e confidencialidade, através da assinatura deste termo, o qual o(a) Sr.(a) receberá uma cópia. Gerando por sua vez resultados vantajosos a sociedade e a comunidade científica.

3 - 4

O(a) Sr.(a) terá o direito e a liberdade de negar-se a participar desta pesquisa total ou parcialmente ou dela retirar-se a qualquer momento, sem que isto lhe traga qualquer prejuízo com relação ao seu atendimento nesta instituição, de acordo com a Resolução CNS nº466/12 e complementares. Sendo que a retirada do consentimento de guarda do material biológico e dos dados genéticos obtidos a partir do material biológico armazenados em biorrepositório deverá ser realizada por meio de documentação escrita e assinada, em qualquer período de tempo. Assim como o local em que os dados genéticos serão armazenamento devem ser informados a cada participante. Salientamos ainda, que o armazenamento de material biológico humano em biorrepositório estará de acordo à Resolução CNS nº 441 de 2011 e à Portaria MS nº 2.201 de 2011, seguindo, por sua vez, o período de tempo referente ao cronograma da pesquisa correspondente. Podendo esta armazenagem ser autorizada por até 10 anos. Não obstante, o descarte do material biológico será efetuado caso haja as situações seguintes: (i) pela manifesta vontade do sujeito da pesquisa; (ii) inadequações da amostra por critérios de qualidade e (iii) por iniciativa da instituição enquanto fiel depositário das amostras biológicas.

Ressalta-se que os participantes da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano previsto ou não no termo de consentimento e resultante de sua participação no estudo, além do direito à assistência integral, têm direito à indenização, conforme itens III.2.0,IV.4.c, V.3, V.5 e V.6 da Resolução CNS 466/12. É assegurado, ainda, que se for de sua vontade, os pesquisadores estarão sempre à disposição para manter as informações acerca do estudo atualizadas, bem como os laudos obtidos através do estudo, mesmo que isso afete o seu desejo de participar da pesquisa.

Será garantido o direito à assistência integral e gratuita ao participante, devido aos possíveis danos decorrentes da participação na pesquisa, PELO TEMPO QUE FOR necessário. Será garantido o ressarcimento das despesas tidas pelo participante da pesquisa e de seu acompanhante em caso de deslocamento dos mesmos para comparecimento ao laboratório. Para qualquer esclarecimento no decorrer da sua participação, estarei disponível através do telefone e e-mail citado acima. O senhor (a) também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Piauí, s/n – Bairro Ininga – CEP: 64.049-550 - Teresina/PI, fone: (86) 3237-2332, e-mail: cep.ufpi@ufpi.edu.br. O CEP é um conjunto de pessoas que irão analisar os diferentes tipos de estudo realizados pelos pesquisadores, que por sua vez, irá defender a integridade e a dignidade dos participantes do estudo, contribuindo para o desenvolvimento de pesquisas dentro dos padrões éticos. Desde já agradecemos!

4 - 4

Eu \_\_\_\_\_, RG: \_\_\_\_\_  
 CPF: \_\_\_\_\_ declaro que após ter sido esclarecido (a) pela  
 pesquisadora, lido o presente termo, e entendido tudo o que me foi explicado, concordo  
 em participar da pesquisa intitulada:

“ \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ ”.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
 Assinatura do Pesquisador ou pesquisadores

\_\_\_\_\_  
 Assinatura do participante ou responsável

Caso o participante esteja impossibilitado de assinar:

Eu \_\_\_\_\_, abaixo assinado, confirmo a  
 leitura do presente termo na íntegra para o(a) participante  
 \_\_\_\_\_, o(a) qual declarou na minha  
 presença a compreensão plena e aceitação em participar desta pesquisa, o qual utilizou  
 a sua impressão digital (abaixo) para confirmar a participação.



Polegar direito (caso não assine).

Testemunha n°1: \_\_\_\_\_

Testemunha n°2: \_\_\_\_\_

## REFERÊNCIAS

- AGIRBASLI, D.; CIRAKOGLU, B.; EREN, F.; SUMERKAN, M.; AKSOY, S.; ARAL, C.; AGIRBASLI, M. Effects of lecithin: Cholesterol acyltransferase genotypes, enzyme levels, and activity on high-density lipoprotein levels. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 5, n. 3, p. 152–158, 2011.
- AKIKO, T.; OKURA, T.; NAGAO, T.; KUKIDA, M.; ENOMOTO, D.; MIYOSHI, K.; HIGAKI, J.; KURODA, M.; BUJO, H. A case of acquired lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency with sarcoidosis that remitted spontaneously. **CEN Case Reports**, v. 5, n. 2, p. 192–196, 2016.
- ALBERS, J. J.; CHEN, C. H.; ADOLPHSON, J. L. Lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) mass; its relationship to LCAT activity and cholesterol esterification rate. **Journal of lipid research**, v. 22, n. 8, p. 1206–13, 1981.
- ALI, S.; HASNAIN, S. E. Molecular dissection of the human Y-chromosome. **Gene**, v. 283, n. 1–2, p. 1–10, 2002.
- AURELIANO, W. DE A. Trajetórias Terapêuticas Familiares: doenças raras hereditárias como sofrimento de longa duração. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, n. 2, p. 369–380, 2018.
- BAASS, A.; WASSEF, H.; TREMBLAY, M.; BERNIER, L.; DUFOUR, R.; DAVIGNON, J. Characterization of a new LCAT mutation causing familial LCAT deficiency (FLD) and the role of APOE as a modifier gene of the FLD phenotype. **Atherosclerosis**, v. 207, n. 2, p. 452–457, 2009.
- BACHER, J. W. et al. **Pentanucleotide Repeats: Highly Polymorphic Genetic Markers Displaying Minimal Stutter Artifact**. Proceedings of the Ninth International Symposium on Human Identification. **Anais...Madison, Wisconsin: Promega Corporation**, 1999Disponível em: <[https://www.promega.com/~media/files/resources/conference\\_proceedings/isih09/oral\\_presentations/08.pdf](https://www.promega.com/~media/files/resources/conference_proceedings/isih09/oral_presentations/08.pdf)>. Acesso em: 13 jun. 2019
- BEIGUELMAN, B. Capítulo 5. o efeito da consangüinidade. In: SBG (Ed.). . **Genética de Populações Humanas**. Ribeirão Preto: [s.n.]. p. 93–146.
- BOYD, Y. X Chromosome. In: **Encyclopedia of Genetics**. [s.l.] Elsevier, 2001. p. 2145–2147.
- BRADBURY, N. A. All Cells Have a Sex. In: **Principles of Gender-Specific Medicine**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 269–290.
- BRUVO, R.; MICHIELS, N. K.; D'SOUZA, T. G.; SCHULENBURG, H. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 7, p. 2101–2106, 2004.

BUDOWLE, B.; VAN DAAL, A. Forensically relevant SNP classes. **BioTechniques**, v. 44, n. 5, p. 603–610, 2008.

BUTLER, J. M. (JOHN M. **Forensic DNA typing : biology, technology, and genetics of STR markers**. 2nd. ed. London: Elsevier Academic Press, 2005.

CALABRESI, L. et al. The Molecular Basis of Lecithin:Cholesterol Acyltransferase Deficiency Syndromes. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 9, p. 1972–1978, 2005.

CALABRESI, L.; SIMONELLI, S.; GOMARASCHI, M.; FRANCESCHINI, G. Genetic lecithin: Cholesterol acyltransferase deficiency and cardiovascular disease. **Atherosclerosis**, v. 222, n. 2, p. 299–306, 2012.

CALABREZ, M. C. T. Influência do calor na análise de dna extraído de sangue e tecidos humanos: importância para a identificação do corpos carbonizados. **Saúde, Ética & Justiça**, v. 4, n. 1–2, p. 62, 1999.

CAMACHO, L. M. D. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização da diversidade genética de populações de Chrysolaena obovata (Asteraceae)**. [s.l.] Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, 2016.

CARMO, R.; CASTRO-FERREIRA, I.; OLIVEIRA, J. P. Lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency : a review for clinical nephrologists. **Portuguese Journal of Nephrology & Hypertension**, v. 31, n. 4, p. 286–292, 2017.

CARNEIRO, A. P. C. Identificação humana post mortem. **Olhares Plurais**, v. 1, n. 18, p. 54–63, 2018.

CARVALHEIRO, R.; ASSOCIADOS, G. C.; PIMENTEL, C. G. Endogamia: possíveis conseqüências e formas de controle em programas de melhoramento de bovinos de corte. **II GEMPEC – Workshop em Genética e Melhoramento na Pecuária de Corte**, n. li, p. 1–10, 2004.

CHEN, C.-H.; ALBERS, J. J. Distribution of lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) in human plasma lipoprotein fractions. Evidence for the association of active LCAT with low density lipoproteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 107, n. 3, p. 1091–1096, 1982.

CONCA, P. et al. Novel missense variants in LCAT and APOB genes in an Italian kindred with familial lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency and hypobetalipoproteinemia. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 6, n. 3, p. 244–250, 2012.

CORRÊA, M. C. D. V.; GUILAM, M. C. R. O discurso do risco e o aconselhamento genético pré-natal. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 10, p. 2141–2149, 2006.

DIAS, F. E. F.; NUNES, C. M.; CAVALCANTE, T. V.; DE CASTRO, A. A. P.; FERREIRA, J. L.; GARCIA, J. F. PCR fluorescente associada à eletroforese capilar como ferramenta de diagnóstico de bactérias no semen. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 14, n. 3, p. 366–372, 2013.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 6, p. 435–445, 2004.

FALUDI, A. et al. **Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose-2017**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2017/02\\_DIRETRIZ\\_DE\\_DISLIPIDEMIA\\_S.pdf](http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2017/02_DIRETRIZ_DE_DISLIPIDEMIA_S.pdf)>. Acesso em: 12 jun. 2019.

FRANÇA, G. V. DE. **Medicina Legal**. 11 ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

GU, X. et al. A systematic investigation of structure/function requirements for the apolipoprotein A-I/Lecithin cholesterol acyltransferase interaction loop of high-density lipoprotein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 12, p. 6386–6395, 2016.

GUNAWARDANE, R. N. et al. Agonistic human antibodies binding to lecithin-cholesterol acyltransferase modulate high density lipoprotein metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 6, p. 2799–2811, 2016.

GUTIERREZ, J. P.; GOYACHE, F. A note on ENDOG: a computer program for analysing pedigree information. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 122, n. 3, p. 172–176, 2005.

HAASE, C. L.; TYBJÆRG-HANSEN, A.; ALI QAYYUM, A.; SCHOU, J.; NORDESTGAARD, B. G.; FRIKKE-SCHMIDT, R. LCAT, HDL cholesterol and ischemic cardiovascular disease: A mendelian randomization study of HDL cholesterol in 54,500 individuals. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, n. 2, p. 248–256, 2012.

HELENA MANGS, A.; MORRIS, B. J. The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future. **Current genomics**, v. 8, n. 2, p. 129–36, 2007.

HIRASHIO, S.; UENO, T.; NAITO, T.; MASAKI, T. Characteristic kidney pathology, gene abnormality and treatments in LCAT deficiency. **Clinical and Experimental Nephrology**, v. 18, n. 2, p. 189–193, 2014.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pi/panorama>>. Acesso em: 16 jun. 2019.

ISHIBASHI, R. et al. Immune-mediated acquired lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency: A case report and literature review. **Journal of clinical lipidology**, v. 12, n. 4, p. 888- 897.e2, 2018.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Individual-specific ‘fingerprints’ of human DNA. **Nature**, v. 316, n. 6023, p. 76–79, 1985.

JONAS, A. Lecithin cholesterol acyltransferase. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1529, n. 1–3, p. 245–56, 2000.

JORDE, L. B.; CAREY, J. C.; BAMSHAD, M. J.; WHITE, R. L. **Genética Médica**. 3rd ed. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

KAYSER, M. et al. A comprehensive survey of human Y-chromosomal microsatellites. **American journal of human genetics**, v. 74, n. 6, p. 1183–97, 2004.

KOBACHUK, L. D. G. Estudos de frequências alélicas de dez locos STRs do Cromossomo X na população do Estado do Paraná e sua contribuição na identificação humana. 2012.

KUNNEN, S.; VAN ECK, M. Lecithin:cholesterol acyltransferase: old friend or foe in atherosclerosis? **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 9, p. 1783–1799, 2012.

KURIHARA, C. H. **Demanda de nutrientes pela soja e diagnose de seu estado nutricional**. [s.l.] Minas Gerais, 2004.

LEITE, R. F. S.; MACHADO, A. P. B.; BARCELOS, R. DA S. S. Aplicabilidade do cromossomo X no DNA forense. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 16, n. 2, p. 197–209, 2017.

LIMA, V. L. M.; COELHO, L. C. B. B.; KENNEDY, J. F.; OWEN, J. S.; DOLPHIN, P. J. Lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) as a plasma glycoprotein: An overview. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, n. 2, p. 179–191, 2004.

MACEDO-SOUZA, L. I. et al. Spastic paraplegia, optic atrophy, and neuropathy: new observations, locus refinement, and exclusion of candidate genes. **Annals of human genetics**, v. 73, n. Pt 3, p. 382–7, 2009.

MAHAPATRA, H.; RAMANARAYANAN, S.; GUPTA, A.; BHARDWAJ, M. Co-existence of classic familial lecithin-cholesterol acyl transferase deficiency and fish eye disease in the same family. **Indian Journal of Nephrology**, v. 25, n. 6, p. 362–5, 2015.

MANTHEI, K. A. et al. A retractable lid in lecithin: Cholesterol acyltransferase provides a structural mechanism for activation by apolipoprotein A-I. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 49, p. 20313–20327, 2017.

MARTINS, K.; CHAVES, L. J.; BUSO, G. S. C.; KAGEYAMA, P. Y. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. **Conservation Genetics**, v. 7, n. 6, p. 957–969, 2006.

MCINTYRE, N. Familial LCAT deficiency and fish-eye disease. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 11 Suppl 1, p. 45–56, 1988.

NANJEE, M. N.; STOCKS, J.; COOKE, C. J.; MOLHUIZEN, H. O. F.; MARCOVINA, S.; CROOK, D.; KASTELEIN, J. P.; MILLER, N. E. A novel LCAT mutation (Phe382→Val) in a kindred with familial LCAT deficiency and defective apolipoprotein B-100. **Atherosclerosis**, v. 170, n. 1, p. 105–113, 2003.

NASERI, M.; HEDAYATI, M.; DANESHPOUR, M. S.; BANDARIAN, F.; AZIZI, F. Association of lecithin cholesterol acyltransferase rs5923 polymorphism in Iranian individuals with extremely low high-density lipoprotein cholesterol: Tehran lipid and glucose study. **Iranian Biomedical Journal**, v. 19, n. 3, p. 172–176, 2015.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987.

OTTO, P. G.; OTTO, P. A.; FROTA-PESSOA, O. **Genética Humana e Clínica**. São Paulo: Editora Roca, 1998.

PEELMAN, F. et al. A proposed architecture for lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT): Identification of the catalytic triad and molecular modeling. **Protein Science**, v. 7, n. 3, p. 587–599, 1998.

PEREIRA, L. F. L. **Caracterização demográfica e estrutura genética populacional de equinos da raça Campolina**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

PRETTY, I. A.; SWEET, D. A look at forensic dentistry – Part 1: The role of teeth in the determination of human identity. **British Dental Journal**, v. 190, n. 7, p. 359–366, 2001.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–59, 2000.

QUEIROZ, A. C. C. DE; FRASSON, M.; VELOSO, C. E. DOS R.; ARANTES, R. R.; NEHEMY, M. B. Estudo clínico e padrão de herança em pacientes com retinose pigmentar. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 72, n. 1, p. 26–28, 2013.

QUELLER, D. C.; GOODNIGHT, K. F. Estimating Relatedness Using Genetic Markers. **Evolution**, v. 43, n. 2, p. 258, 1989.

RIDLEY, M. **Evolution**. [s.l.] Blackwell Pub, 2004.

ROEWER, L. The use of the Y chromosome in forensic genetics—current practices and future perspectives. **International Congress Series**, v. 1239, p. 279–280, 2003.

ROSS, M. T. et al. The DNA sequence of the human X chromosome. **Nature**, v. 434, n. 7031, p. 325–337, 2005.

SAEEDI, R.; LI, M.; FROHLICH, J. A review on lecithin: Cholesterol acyltransferase deficiency. **Clinical Biochemistry**, v. 48, n. 7–8, p. 472–475, 2015.

SANTOS, S. C. DOS; MELO, U. S.; LOPES, S. S. DOS S.; WELLER, M.; KOK, F. A endogamia explicaria a elevada prevalência de deficiências em populações do Nordeste brasileiro? **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 4, p. 1141–1150, 2013.

SANTOS, S.; KOK, F.; WELLER, M.; PAIVA, F. R. L. DE; OTTO, P. A. Inbreeding levels in Northeast Brazil: strategies for the prospecting of new genetic disorders. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 2, p. 220–223, 2010.



SAUDE, M. DA. Diretrizes para Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras no Sistema Único de Saúde - SUS. **Ministerio da Saude - Portaria**, p. 41, 2014.

SCHWARCZ, L. M. Espetáculo da miscigenação. **Estudos Avançados**, v. 8, n. 20, p. 137–152, 1994.

SOARES, M. T. DE O. Estimativa da consangüinidade e ocorrência de deficiências causadas por doenças genéticas em municípios da Paraíba. 2012.

SZIBOR, R.; KRAWCZAK, M.; HERING, S.; EDELMANN, J.; KUHLISCH, E.; KRAUSE, D. Use of X-linked markers for forensic purposes. **International journal of legal medicine**, v. 117, n. 2, p. 67–74, 2003.

SZIBOR, R.; HERING, S.; EDELMANN, J. A new Web site compiling forensic chromosome X research is now online. **International Journal of Legal Medicine**, v. 120, n. 4, p. 252–254, 2006.

TAKAHASHI, S. et al. Nephrotic Syndrome Caused by Immune-Mediated Acquired LCAT Deficiency. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 24, n. 8, p. 1305–1312, 2013.

VAN DEN BOGAARD, B.; HOLLEBOOM, A. G.; DUIVENVOORDEN, R.; HUTTEN, B. A.; KASTELEIN, J. J. P.; HOVINGH, G. K.; KUIVENHOVEN, J. A.; STROES, E. S. G.; VAN DEN BORN, B.-J. H. Patients with low HDL-cholesterol caused by mutations in LCAT have increased arterial stiffness. **Atherosclerosis**, v. 225, n. 2, p. 481–485, 2012.

VAZQUEZ-LOBO, A.; MORALES, A. Microsatélites. In: CORNEJO, A. et al. (Eds.). . **Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos**. 1st. ed. Mexico: SEMARNAT, 2014. p. 75–100.