



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JEAN GABRIEL VIEIRA COUTINHO

**AVALIAÇÃO DE VARIANTES ALÉLICAS NOS GENES
ABCG5 E ABCG8 ASSOCIADAS A CORRELAÇÕES
CLÍNICO-LABORATORIAIS EM UMA FAMÍLIA COM
SITOSTEROLEMIA**

Londrina
2023

JEAN GABRIEL VIEIRA COUTINHO

**AVALIAÇÃO DE VARIANTES ALÉLICAS NOS GENES
ABCG5 E ABCG8 ASSOCIADAS A CORRELAÇÕES
CLÍNICO-LABORATORIAIS EM UMA FAMÍLIA COM
SITOSTEROLEMIA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre José Faria Carrilho

Londrina
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Coutinho, Jean Gabriel Vieira.

Avaliação de variantes alélicas nos genes ABCG5 e ABCG8 associadas a correlações clínico-laboratoriais em uma família com sitosterolemia / Jean Gabriel Vieira Coutinho. - Londrina, 2023.
43 f.

Orientador: Alexandre José Faria Carrilho.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2023.

Inclui bibliografia.

1. dislipidemias - Tese. 2. fitosteróis - Tese. 3. mutação com perda de função - Tese. 4. aterosclerose - Tese. I. Carrilho, Alexandre José Faria. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 61

JEAN GABRIEL VIEIRA COUTINHO

**AVALIAÇÃO DE VARIANTES ALÉLICAS NOS GENES
ABCG5 E ABCG8 ASSOCIADAS A CORRELAÇÕES
CLÍNICO-LABORATORIAIS EM UMA FAMÍLIA COM
SITOSTEROLEMIA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre José Faria Carrilho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a Dra. Cíntia Magalhães Carvalho Grion
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Guilherme Figueiredo Marquezzine
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, ____ de _____ de ____.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alexandre José Faria Carrilho, meu orientador e professor na graduação, que me forneceu a oportunidade de relatar o caso clínico presente neste trabalho, além de ter me guiado nesse processo com a paciência e sabedoria que sempre entregou aos seus alunos.

Ao Prof. Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge, Prof^a. Dra. Edna Regina Nakandakare, Prof^a Dra. Elisângela Pereira de Souza Quedas e Ana Caroline Santos Costa, bem como demais profissionais envolvidos dos Laboratórios de Investigação Médica 10, 25 e 42 da Faculdade de Medicina da USP por me receberem e por realizarem toda a árdua tarefa de análise bioquímica e molecular que possibilitou a entrega dos resultados desta dissertação.

Ao paciente, cuja história clínica foi apresentada neste trabalho, bem como sua família, que sempre se mostraram dispostos a contribuir com as análises laboratoriais e avaliações clínicas realizadas, contribuindo desta forma com a ciência e, possivelmente, com o tratamento de outros pacientes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade de aprimoramento de qualidade, bem como aos professores envolvidos por todas as valiosas lições ensinadas.

Aos colegas mestrandos e doutorandos do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela troca de experiências e apoio durante as atividades desenvolvidas.

À minha esposa Carolina por me acompanhar em todo esse processo, com seu amor e carinho, além de me ajudar com seus conhecimentos de pós-graduada.

À minha mãe por acreditar nos meus sonhos e ser meu amparo no caminho até aqui.

Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.

Carl Jung

RESUMO

COUTINHO, Jean Gabriel Vieira. **Avaliação de variantes alélicas nos genes ABCG5 e ABCG8 associadas a correlações clínico-laboratoriais em uma família com sitosterolemia.** 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

Introdução: a sitosterolemia é uma doença autossômica recessiva rara caracterizada pelo acúmulo de esteróis vegetais na corrente sanguínea e tecidos devido ao aumento da absorção e diminuição da excreção biliar dessas substâncias. É causada por variantes em ambos os alelos dos genes ABCG5 ou ABCG8, localizados no cromossomo 2p21. Os pacientes costumam apresentar xantomas tuberosos e tendíneos, além de aterosclerose coronariana precoce e, assim como nas hipercolesterolemias familiares, aumento do risco para infarto agudo do miocárdio e morte súbita. A terapia farmacológica inclui sequestradores de ácidos biliares e inibidores da absorção intestinal de esteróis; orientações dietéticas fazem parte do tratamento. Entender melhor os mecanismos de transmissão gênica de uma patologia rara, bem como avaliar a eficácia dos tratamentos instituídos, contribui para o tratamento e aconselhamento genético do paciente e familiares. **Objetivo:** verificar a presença de variantes alélicas nos genes ABCG5 e ABCG8 em um paciente com diagnóstico de sitosterolemia e seus familiares, bem como analisar alterações no perfil lipídico e de sitosteróis. Além disso, pretendeu-se avaliar a resposta do tratamento instituído ao paciente durante o período de acompanhamento. **Método:** relato de caso de um paciente com sitosterolemia em acompanhamento por 17 anos. Foi realizada a coleta e análise de DNA obtido por esfregaço oral e sangue periférico do paciente índice e nove familiares, bem como dosagem de perfil lipídico e sitosteróis. Também foi realizada avaliação clínica e exames de imagem para verificação da resposta clínica ao tratamento realizado. **Resultados:** o paciente avaliado apresentou mutação em heterozigose composta no gene ABCG5 e em relação aos seus familiares de primeiro grau, três apresentaram uma variante alélica cada sem apresentação do fenótipo da doença. O paciente foi tratado ao longo dos 17 anos de acompanhamento com ezetimiba 20mg/dia, bem como seguiu orientações dietéticas, não tendo havido aumento dos xantomas tendíneos nem desenvolvimento de aterosclerose carotídea significativa, embora as concentrações de sitosterol tenham permanecido elevadas. **Conclusão:** a sitosterolemia permanece como uma doença rara e pouco diagnosticada. Os achados relacionados às variantes alélicas podem servir para entender melhor a expressão fenotípica da patologia. O tratamento prescrito ao paciente não normalizou as concentrações plasmáticas de fitosteróis, porém foi capaz de estabilizar a progressão dos xantomas e da doença aterosclerótica.

Palavras-chave: dislipidemias, fitosteróis, mutação com perda de função, aterosclerose, ezetimiba

ABSTRACT

COUTINHO, Jean Gabriel Vieira. **Evaluation of allelic variants in the ABCG5 and ABCG8 genes associated with clinical-laboratory correlations in a family with sitosterolemia. 2023.** Dissertation (Master in Health Sciences) – Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, 2023.

Introduction: sitosterolemia is a rare autosomal recessive disease, mentioned by the accumulation of plant sterols in the bloodstream and tissues due to increased absorption and decreased biliary excretion of these substances. It is caused by variants in both alleles of the ABCG5 or ABCG8 genes, located on chromosome 2p21. Patients usually present tuberous and tendon xanthomas, in addition to early coronary atherosclerosis and, as in familial hypercholesterolemia, an increased risk of acute myocardial infarction and sudden death. Pharmacological therapy includes bile acid sequestrants and inhibitors of intestinal sterol absorption; dietary guidelines are part of the treatment. Better understand the mechanisms of gene transmission of a rare pathology, as well as evaluate the effectiveness of established treatments, contribute to the treatment and genetic counseling of patients and families.

Objective: to verify the presence of allelic variants in the ABCG5 and ABCG8 genes in a patient diagnosed with sitosterolemia and his family members, as well as to analyze changes in the lipid and sitosterol profile. Furthermore, it was a objective to evaluate the response to the treatment given to the patient during the follow-up period. Method: case report of a patient with sitosterolemia followed for 17 years. A collection and analysis of DNA obtained from oral swabs and peripheral blood from the index patient and nine family members was performed, as well as lipid profile and sitosterol measurements. Clinical evaluation and imaging exams were also carried out to verify the clinical response to the treatment performed. Results: the patient evaluated presented a compound heterozygous mutation in the ABCG5 gene and in relation to his first-degree relatives, three presented an allelic variant each without presenting the disease phenotype. The patient was treated over 17 years of follow-up with ezetimibe 20 mg/day, as well as dietary guidelines, without an increase in tendon xanthomas or development of significant carotid atherosclerosis, although sitosterol concentrations were permanently elevated. Conclusion: sitosterolemia remains a rare and uncommon disease. Findings related to allelic variants can serve to increase understanding the phenotypic expression of the pathology. The treatment prescribed to the patient did not normalize plasma concentrations of phytosterols, but was able to stabilize the progression of xanthomas and atherosclerotic disease.

Keywords: dyslipidemias, phytosterols, loss of function mutation, atherosclerosis, ezetimibe

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ILUSTRAÇÕES DA DISSERTAÇÃO

Figura 1 - Mutações e polimorfismos nos genes ABCG5 e ABCG8.....15

Quadro 1 - Critérios diagnósticos para sitosterolemia18

Quadro 2 - Volumes da reação da padronização da PCR.....26

ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO

Figure 1 - Tendon xanthomas.....31

Figure 2 - Pedigree of the family with sitosterolemia.....32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCG	<i>ATP Binding-Cassette</i> , subfamília G
Arg	Arginina
°C	Graus Celsius
CP	Campesterol
CT	Colesterol total
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetra acetic acid</i>
eV	Eletrovolts
GC	<i>Gas chromatography</i>
Gln	Glutamina
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A
KOH	Hidróxido de potássio
L	Litro
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LIM	Laboratório de investigação médica
µg	Micrograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
µL	Microlitro

mM	Milimol
MS	<i>Mass spectrometry</i>
n	Valor de referência – do inglês <i>normal range</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de amônio
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
Rpm	Rotações por minuto
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
ST	Sitosterol
TG	Triglicerídeos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	PATOLOGIA	13
1.2	GENÉTICA	14
1.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	15
1.3.1	Hipercolesterolemia	15
1.3.2	Xantomas	16
1.3.3	Aterosclerose	16
1.3.4	Manifestações hematológicas	17
1.3.5	Outras manifestações clínicas	17
1.4	DIAGNÓSTICO	18
1.5	TRATAMENTO	19
1.5.1	Dieta	19
1.5.2	Terapia farmacológica	19
2	JUSTIFICATIVA.....	21
3	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVOS GERAIS	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1	AVALIAÇÃO CLÍNICA E COLETA DE DADOS	23
4.2	EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA	23
4.2.1	Extração de DNA a partir de Sangue Periférico	24
4.2.2	Extração de DNA a partir de Swab Oral	24
4.3	SEQUENCIAMENTO GENÉTICO	25
4.3.1	Padronização dos Primers	25
4.3.2	Amplificação Gênica por PCR	26
4.3.3	Sequenciamento de Sanger	26
4.4	MEDIDA DOS ESTERÓIS PLASMÁTICOS	27
5	RESULTADOS – CASE REPORT.....	28

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....36

REFERÊNCIAS37

APÊNDICES.....39

Apêndice A.....39

1 INTRODUÇÃO

A sitosterolemia, ou fitosterolemia, é uma doença rara, hereditária e de caráter autossômico recessivo. Estima-se que o número aproximado de pacientes portadores seja de 1 a cada 200.000 indivíduos, porém a maioria dos casos acaba sendo subdiagnosticado e, assim, a prevalência pode ser bem maior¹. Esta patologia foi descrita pela primeira vez em um relato de 1974 de duas irmãs apresentando xantomas e níveis plasmáticos e teciduais anormalmente altos de esteróis vegetais².

1.1 PATOLOGIA

Os sitoesteróis são estruturalmente muito semelhantes ao colesterol, mas diferem quimicamente pela presença de um grupo etil ou metil (sitosterol e campesterol, respectivamente) ou uma ligação dupla (estigmasterol). O sitosterol é geralmente o esteroide vegetal mais abundante na dieta e a forma predominante encontrada em indivíduos com sitosterolemia^{3,5}. Esses pacientes absorvem 15% a 60% do sitosterol ingerido, o que leva a um aumento de 50 a 200 vezes em seus níveis séricos, sendo seu transporte realizado pelas lipoproteínas de baixa densidade (*low density lipoprotein* - LDL)⁵.

A sitosterolemia leva a uma alteração do metabolismo dos lipídeos caracterizada pela diminuição da excreção biliar e aumento da absorção dos sitoesteróis da dieta, levando a um aumento dessas substâncias, bem como colesterol, no organismo¹. Embora geralmente a absorção de esteróis esteja moderadamente aumentada em pacientes heterozigotos para sitosterolemia, eles costumam ser assintomáticos e apresentarem concentrações normais ou levemente aumentadas de colesterol e esteróis vegetais³.

Alimentos como óleos vegetais, germens de trigo, nozes, sementes, abacate, chocolate e margarina são ricos em esteróis vegetais. Menos de 5% destas substâncias são absorvidas em indivíduos normais – alguns modelos em mamíferos sugerem que o acúmulo destes compostos é tóxico, gerando uma resposta de defesa do organismo. Sua ingestão em excesso por seres humanos não sitosterolêmicos parece ser segura, muito provavelmente devido a presença de mecanismos eficazes que limitam sua absorção pelo intestino, bem como promovem a excreção biliar. Alguns autores sugerem que a ingestão de fitoesteróis por pacientes saudáveis pode levar a competição com o colesterol, o que levaria a um efeito benéfico sobre o organismo, mas isto ainda não está bem estabelecido^{3,4}.

1.2 GENÉTICA

A doença está relacionada a mutações bialélicas (homozigóticas/heterozigóticas compostas) com perda de função nos genes ABCG5 ou ABCG8 responsáveis pela codificação das proteínas ABC (do inglês, *ATP-binding cassette*). A maioria dos pacientes com sitosterolemia reconhecida veio de casamentos consanguíneos, o que levou a mutações homozigóticas nestes genes⁴. No entanto, avanços recentes na análise genética revelaram que também há vários casos com mutações heterozigóticas compostas nestes genes^{6,7}.

Embora seja uma patologia de caráter recessivo, pacientes com mutações em heterozigose podem apresentar um perfil fenotípico mais brando com manifestações clínicas não tão severas¹. Os pacientes asiáticos apresentam, com maior frequência, mutações no gene ABCG5, enquanto, os caucasianos no ABCG8. Independentemente da etnia, as mutações nestes genes devem ser investigadas se houver suspeita de sitosterolemia². Os polimorfismos e mutações descritas até o presente estão representadas na figura 1.

Estes genes codificam, respectivamente, o transportador de efluxo de esteróis ABCG5 (esterolina 1) e ABCG8 (esterolina 2) que bombeiam esteróis para o lúmen intestinal ou para a bile. Defeitos bialélicos resultam em aumento da absorção intestinal junto com diminuição da excreção biliar de fitoesteróis, levando a concentrações plasmáticas extremamente elevadas dessas substâncias³.

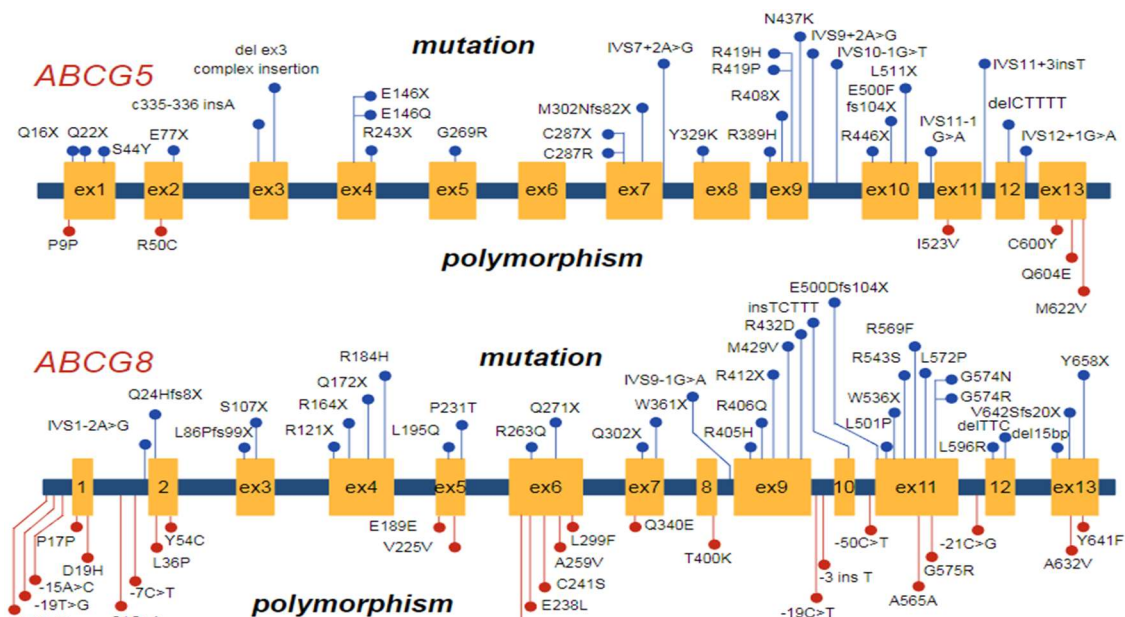


Figura 1 - Mutações e polimorfismos nos genes ABCG5 e ABCG8.

Fonte: TADA et al. (2018, p. 795)

1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As manifestações clínicas apresentam grande variedade fenotípica: enquanto alguns pacientes homocigotos se mostram praticamente assintomáticos, outros apresentam hipercolesterolemia severa com repercussão cardiovascular fatal^{8,9}. Este mecanismo da heterogeneidade fenotípica ainda não está totalmente esclarecido³.

A gravidade dos fenótipos de sitosterolemia parece ser mais variável do que para hipercolesterolemia familiar, possivelmente devido à sua maior dependência da ingestão de esteróis na dieta⁴.

1.3.1 Hipercolesterolemia

A sitosterolemia é conhecida por apresentar níveis elevados de sitosterol e colesterol LDL. Em alguns estudos foi verificado que a sitosterolemia pode estar relacionada a uma hipercolesterolemia às custas de LDL até em bebês recebendo amamentação - e, após o desmame, os níveis de LDL diminuem, ao contrário dos sitosteróis¹. Isso se deve ao fato do

intestino imaturo poder absorver maiores quantidades de colesterol em comparação com os adultos³.

A relação do sitosterol no desenvolvimento da aterosclerose ainda permanece pouco conhecida, ao contrário do LDL. Parentes de pacientes com sitosterolemia ou portadores de mutações heterozigóticas geralmente apresentam concentrações de colesterol LDL e sitosterol elevados^{1,4}.

Embora tenha sido originalmente relatada em pacientes normolipêmicos apresentando xantomas, alguns pacientes com sitosterolemia, especialmente crianças, apresentam hipercolesterolemia grave^{3,10}.

1.3.2 Xantomas

Xantomas tendinosos ou tuberosos em áreas extensoras, como tendão de Aquiles, tendões extensores da mão, cotovelos e joelhos são as principais manifestações clínicas da sitosterolemia. Os xantomas evoluem como aglomerados de células espumosas na pele e os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do xantoma parecem ser semelhantes aos dos estágios iniciais das placas ateroscleróticas. A fisiopatologia do aparecimento dessas alterações pode estar relacionada a pequenos traumas prévios em áreas articulares^{3,7}.

Os xantomas tendíneos podem ter seu aparecimento nos primeiros anos de vida, mas não costumam ser comuns em crianças, já os xantomas intertriginosos podem ser mais comuns nessa faixa etária. Eles podem regredir ou desaparecer completamente após a normalização dos níveis de colesterol, mesmo que os níveis de sitosteróis ainda permaneçam altos^{3,4,7}.

O xantelasma das pálpebras era considerado apenas uma lesão estética até recentemente, porém estudos prospectivos recentes mostraram que está relacionado com um aumento do risco cardiovascular e redução da expectativa de vida³.

1.3.3 Aterosclerose

Tanto o colesterol plasmático elevado quanto os níveis de esteroides vegetais podem contribuir para a doença vascular prematura em pacientes com sitosterolemia⁸. Os dados atualmente disponíveis, bem como o fato de que pacientes sitosterolêmicos com doença cardiovascular aterosclerótica prematura tendem a exibir hipercolesterolemia por aumento no

colesterol LDL, sugerem que este último, e não o sitosterol, é o principal fator causal para a aterogenicidade⁴.

As reações inflamatórias que levam à formação da placa de ateroma estão relacionadas à estabilidade das lipoproteínas, o que é influenciado pelo acúmulo de colesterol e de fitoesteróis. A ruptura dessas placas com consequente trombose local pode levar ao infarto agudo do miocárdio e morte súbita. Macrófagos incubados com lipoproteínas contendo sitosterol acumulam esteróis livres e sofrem morte celular, o que pode contribuir para a formação de placas mais sensíveis à ruptura^{3,5}.

A doença coronariana prematura pode se desenvolver em pacientes sitosterolêmicos com níveis normais de colesterol, entretanto já foi relatado que alguns pacientes com sitosterolemia não desenvolveram aterosclerose precoce apesar dos níveis elevados de colesterol e sitosteróis³.

1.3.4 Manifestações hematológicas

Hemólise estomatocítica, plaquetas grandes, esplenomegalia e sangramento anormal são manifestações hematológicas que podem ser encontradas e, algumas vezes, podem ser o único sinal clínico de sitosterolemia⁵.

Como ABCG5 e ABCG8 são expressos apenas no intestino e no fígado, o acúmulo adquirido de esteróis vegetais circulantes e sua incorporação em glóbulos vermelhos e plaquetas parece resultar em morfologia e função anormais. Os fitoesteróis séricos devem ser analisados em pacientes com anemia hemolítica sem causa aparente com macrotrombocitopenia de forma a evitar uma esplenectomia desnecessária^{5,12}.

1.3.5 Outras manifestações clínicas

São referidos alguns casos de artralgia inespecífica em membros e eventualmente, artrite⁶.

1.4 DIAGNÓSTICO

Muitos pacientes são diagnosticados tardiamente, evoluindo com quadros avançados de aterosclerose que poderiam ser evitados com medidas farmacológicas e dietéticas⁵.

Os métodos laboratoriais de rotina não distinguem os esteróis vegetais do colesterol, sendo necessário um método mais preciso, como a cromatografia gasosa com espectrometria de massa. Valores de sitosterol acima de 10 µg/mL costumam estar associados ao diagnóstico, embora alguns estudos sugiram que 15 µg/mL possa ter um valor preditivo mais adequado^{4,14}.

A confirmação genética pode ser dada por sequenciamento direto de éxons e limites de intronéxons dos genes ABCG5 e ABCG8, cada um composto por 13 éxons e localizados no cromossomo 2p21, além de documentar as mutações homozigóticas ou heterozigóticas compostas em ABCG5 ou ABCG8¹⁵.

Diretrizes recentes recomendam a triagem de todas as crianças aos 9–11 anos e novamente aos 17–21 anos para encontrar aquelas com hipercolesterolemia. Alguns dos rastreados podem, de fato, ter sitosterolemia, e esses pacientes podem ser distinguidos por uma resposta notável à modificação da dieta ou uma resposta ruim às estatinas^{3,6}.

São diagnósticos diferenciais, embora também raras, a hipercolesterolemia autossômica recessiva e a xantomatose cerebrotendinosa, que são mais comuns em decorrência de relações consanguíneas⁴.

De forma prática, o diagnóstico pode ser estabelecido com a presença de todos os critérios abaixo:

Manifestações clínicas
1. Xantomas cutâneos ou tendíneos
2. Doença arterial coronariana precoce (homens < 45 anos e mulher < 55 anos)
Diagnóstico laboratorial
1. Sitosterol sérico > 1mg/dL (10 µg/mL)
Análise genética
1. Mutações patogênicas nos genes ABCG 5 ou ABCG 8

Quadro 1 - Critérios diagnósticos para sitosterolemia

Fonte: TADA et. al (2021, p. 795)

1.5 TRATAMENTO

O manejo da sitosterolemia visa reduzir as concentrações de esterol vegetal plasmático e as concentrações de colesterol para poder prevenir ou reduzir xantomias e doenças cardiovasculares ateroscleróticas¹⁶.

1.5.1 Dieta

A base da terapia é a restrição dietética de colesterol e esteróis vegetais. Os alimentos ricos em esteróis vegetais incluem óleos vegetais, germens de trigo, nozes, sementes e abacate, por exemplo, sendo a maioria destes saudáveis do ponto de vista cardiovascular. Margarina, gordura e chocolate também devem ser evitados. Mariscos e algas marinhas contêm quantidade significativa de esteróis vegetais que também são hiperabsorvidos nesses pacientes devendo ser excluídos da dieta^{3,16}.

No entanto, uma dieta isenta de fitoesteróis é quase impossível de conseguir porque são substâncias encontradas em quase todos os alimentos à base de plantas, e sua implementação resultou em apenas 30% de diminuição nas concentrações plasmáticas de sitosteróis³. Além dos esteróis vegetais, eles também precisam evitar alimentos ricos em colesterol, incluindo vísceras de animais e ovos⁴.

1.5.2 Terapia farmacológica

Várias medicações foram introduzidas para tentar reduzir as concentrações de LDL e sitosteróis dos pacientes com sitosterolemia, porém a ezetimiba e a colestiramina se mostraram mais eficazes. No entanto, a baixa adesão e os efeitos colaterais gastrointestinais limitam o uso de colestiramina, permanecendo a ezetimiba como a principal medicação utilizada, que age como um inibidor da absorção intestinal de colesterol e esteróides vegetais. O tratamento a longo prazo com ezetimiba 10 mg/dia foi seguro, tolerável e eficaz na redução das concentrações plasmáticas de fitoesteróis em pacientes com sitosterolemia^{3,5,20}.

A ezetimiba sofre glicuronidação no intestino e no fígado, e tanto o composto parental quanto seu glicuronídeo localizam-se na borda em escova do intestino delgado, onde bloqueiam a absorção de fontes dietéticas e biliares de colesterol sem afetar a absorção de

triglicerídeos, ácidos biliares ou vitaminas lipossolúveis. Ainda não se sabe se as complicações da sitosterolemia, incluindo aterosclerose, hemólise e plaquetopenia, podem ser revertidas com o tratamento com ezetimiba^{17,18}. Entretanto, é interessante ressaltar que a espessura do tendão de Aquiles por radiografia, usada para avaliar a alteração no xantoma do tendão de Aquiles, diminuiu no grupo tratado com ezetimiba em relação ao grupo placebo após 8 semanas de tratamento^{17,21}.

As estatinas também podem reduzir os níveis de LDL destes pacientes¹. No entanto, pacientes com sitosterolemia geralmente respondem pouco às estatinas porque a atividade da HMG-CoA redutase já está inibida²².

Para pacientes com lesões ateroscleróticas avançadas e resistência aos tratamentos mencionados, a aférese de LDL pode ser considerada^{4,23}.

2 JUSTIFICATIVA

A sitosterolemia permanece como uma doença rara com mecanismos de expressão ainda não totalmente elucidados que traz grande morbidade para seus portadores, apresentando tentativas de tratamento muitas vezes ineficazes.

Seu diagnóstico é difícil e costuma ser de exclusão, o que pode levar a que pacientes jovens sejam subtratados e desenvolvam aterosclerose precocemente. Há a necessidade então de avaliar pacientes em tratamento constantemente e verificar o resultado dos tratamentos instituídos para sedimentar ou alterar as estratégias terapêuticas existentes, melhorando a qualidade de vida e diminuindo a mortalidade dos portadores desta patologia.

Entender os mecanismos de transmissão e expressão gênica da fitosterolemia, bem como a apresentação fenotípica nos indivíduos afetados, leva a um melhor entendimento desta doença hereditária, bem como consegue direcionar melhores estratégias de aconselhamento genético para os pacientes e seus familiares.

Este relato de caso justifica-se pelo acompanhamento por 17 anos de um paciente caucasiano sitosterolêmico com mutação no gene ABCG5 em heterozigose composta com sintomas marcantes da patologia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença de variantes alélicas nos genes ABCG5 e ABCG8, além de determinar as concentrações de esteróis plasmáticos em um paciente com sitosterolemia e nos seus parentes de primeiro grau, bem como avaliar a estratégia de tratamento oferecida ao longo de seu acompanhamento clínico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar presença de variantes alélicas nos genes ABCG5 ou ABCG8 em um paciente com sitosterolemia e em familiares de primeiro grau.
- Realizar dosagem de esteróis plasmáticos no paciente e em seus familiares de primeiro grau deste;
- Avaliar resposta clínica ao tratamento com dieta e ezetimiba, instituído por 17 anos de um paciente com sitosterolemia através da dosagem plasmáticas de esteróis, bem como a mensuração dos xantomas e da presença de doença aterosclerótica arterial por métodos de imagem;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA E COLETA DE AMOSTRAS

O diagnóstico de sitosterolemia do paciente índice foi feito em 2004 por ocasião de uma consulta médica. F.L.F., sexo masculino, caucasiano, autônomo, sem outras comorbidades, apresentava 23 anos na época da primeira avaliação. Naquele momento, amostras de sangue periférico foram enviadas a um laboratório especializado e foram verificados níveis elevados de sitoesteróis com perfil lipídico normal, entretanto, houve perda desses resultados. Considerando o quadro clínico apresentado de xantomatose em mãos e tendões calcâneos, trombocitopenia, visualização de esplenomegalia por ultrassonografia abdominal, associado aos resultados laboratoriais, o diagnóstico de fitosterolemia foi proposto. Desde então, o paciente vem sendo tratado com ezetimiba 20mg/dia.

Em 2011, com o paciente já apresentando 30 anos, uma nova avaliação laboratorial foi feita e amostras de sangue foram coletadas na cidade de origem do paciente, por laboratório de análises clínicas local, e enviadas ao Laboratório de Investigação Médica 10 da Universidade de São Paulo - USP (LIM-10), onde análises bioquímicas de sitoesteróis plasmáticos e perfil lipídico foram feitas. Um novo ultrassom abdominal foi solicitada para verificar se havia persistência de esplenomegalia.

A proposta do presente estudo foi investigar a ocorrência das variantes alélicas, mensurar as concentrações de fitoesteróis plasmáticos e a apresentação fenotípica nos familiares de primeiro grau do caso índice, além de descrever a evolução do paciente após 17 anos de seguimento.

As coletas ocorreram em laboratório de análises clínicas localizado no município de residência do paciente e familiares. Esse material foi enviado por correio, em reservatórios adequados, novamente para o LIM-10, onde foram feitas as análises dos lípidos, e também agora para os Laboratório de Investigação Médica 25 e 42 da Universidade de São Paulo - USP (LIM-25 e LIM-42) onde foram realizadas as análises genéticas. A privacidade dos participantes foi inteiramente assegurada e as coletas e análises foram autorizadas pelos pacientes ou responsáveis legais, mediante aplicação de termo de consentimento livre e esclarecido.

Além disso, os exames de imagem (doppler de artérias carótidas) para avaliar a presença de placa ateromatosa em leito arterial do paciente também foram realizados na cidade de domicílio e enviados para os pesquisadores via e-mail.

Esta pesquisa foi iniciada após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina (parecer 4.989.252 – 21/09/21).

4.2 EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA

4.2.1 Extração de DNA a partir de Sangue Periférico

O método de extração de DNA genômico de células de sangue periférico utilizado foi modificado visando melhorar a qualidade do DNA obtido, portanto, as amostras do projeto foram extraídas usando o método *Salting Out* adaptado, realizada em dois dias.

1. Na etapa inicial foi necessário nomear os tubos de plástico cônico tipo Falcon de 50 mL para não ocorrer trocas de pacientes durante o processo. As amostras de sangue haviam sido colhidas em tubos com ácido etileno diamino tetracético (EDTA) 25mM. Após a nomeação, despejou-se os tubos de sangue coletado (aproximadamente 10mL) nos tubos cônicos e acrescentou-se *Bloodlysis Buffer* (NH₄Cl 114mM + NH₄HCO₃ 1mM – pH 7,4) uma vez até completar 50mL. O material foi tampado e agitado vigorosamente e, em seguida, acondicionou-se os tubos Falcon no gelo por 30 minutos para que ocorresse a hemólise.
2. Após o tempo no gelo, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 2500rpm a 4°C. Após o término, o sobrenadante foi descartado e a parede do tubo lavada com *Bloodlysis Buffer* uma única vez.
3. As amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 2500rpm, descartou-se o sobrenadante e a parede do tubo foi lavada com *Nucleolysis Buffer* (Tris-HCl 10 mM + NaCl 150 mM + EDTA 10 mM, pH 8,0) uma vez. Em seguida, adicionou-se 5 mL de *Nucleolysis Buffer* novamente e 100µL de proteinase K (20mg/mL). Por fim, adicionou-se 300µL de dodecil sulfato de sódio 10% (SDS) e misturou-se novamente, deixando-se a amostra incubada *overnight* a 60°C em banho maria.
4. A primeira parte do segundo dia consistiu em avaliar a lise adequada das amostras (translúcidas e sem grumos) e limpas. Após checagem, adicionou-se 1 mL de solução de NaCl 6M em cada tubo e agitou-se vigorosamente por 15 segundos.
5. Centrifugou-se as amostras a 2500rpm por 30 minutos e em seguida transferiu-se o sobrenadante para um tubo cônico de 15mL para repetir a centrifugação até que o sobrenadante estivesse bem claro. A partir desse momento, adicionou-se etanol absoluto para que o DNA flutuasse até a superfície do tubo cônico e pudesse ser

captado e diluído em 500µL de tampão de eluição para posterior armazenagem em freezer.

4.2.2 Extração do DNA a partir de esfregaço oral

As amostras de DNA foram obtidas a partir de esfregaço oral coletado pelo próprio paciente em sua residência, em tubos com conservante TEN (TRIS 2M, pH 8 + EDTA 0,5M, pH 8 + NaCl 6M) enviados pelo laboratório, com instruções de coleta anexadas ao kit. Posteriormente os esfregaços foram extraídos, seguindo o protocolo padronizado no laboratório e, em seguida, armazenados em freezer.

As etapas pormenorizadas do protocolo são:

1. Transferiu-se o conteúdo dos tubos de coleta inicial para um microtubo de 1,5µl que foi centrifugado em vórtex por 1 minuto a 14.000rpm.
2. Retirou-se todo o conservante com uma pipeta, sem tocar/retirar o pellet no fundo do microtubo, e acrescentou-se 200µl de tampão TES (TRIS 2M, pH 8 + EDTA 0,5M, pH 8 + SDS 10% + água ultrapura) e 20µl de proteinase K com nova centrifugação em vórtex por aproximadamente 15 segundos.
3. Incubou-se por 2 horas a 42 °C em banho-maria e, após 2 horas, retirou-se a amostra, acrescentou-se 42µl de NaCl saturado e agitou-se bem, manualmente.
4. Centrifugou-se 1 minuto a 14.000rpm e foi transferido o sobrenadante para outro microtubo com cerca de 250µl. Acrescentou-se volume de etanol absoluto para lavagem até o preenchimento do tubo com o sobrenadante e, sem seguida, homogeneizando manualmente a solução. Novamente foi centrifugada a amostra por 1 minuto, descartado o sobrenadante e repetido o processo por mais uma vez.
5. Adicionou-se etanol 70% até preenchimento do tubo, centrifugou-se novamente com descarte do sobrenadante por mais duas vezes. Secou-se o etanol e acrescentou-se TE (tampão de eluição - TRIS 2M + EDTA 0,5M) de acordo com o tamanho do pellet.

4.3 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

A partir do melhor alinhamento possível, foi realizada a genotipagem da amostra, que consistiu em determinar, com bases estatísticas, por métodos moleculares, todos os alelos do

genoma da amostra (as bases de cada par do cromossomo para uma dada posição). Foram então identificadas as mutações dos éxons 1 e 9 do gene *ABCG5*, não sendo detectadas mutações no gene *ABCG8*. A partir disto, as análises focaram-se em confirmar as mutações encontradas apenas nos gene *ABCG5*.

4.3.1 Padronização dos *Primers*

Os *primers* utilizados para amplificar a sequência alvo das regiões codificadoras do gene *ABCG5* (éxon 1 e 9) foram desenhados e testados durante o projeto, tendo em vista que ainda não estavam padronizados no laboratório. Eles foram os seguintes:

1. ***ABCG5***(NM_022436.3):c.64C>T p.(Gln22*) (exón 1)
2. ***ABCG5***(NM_022436.3):c.1217G>A p.(Arg406Gln) (exón 9)

Inicialmente identificou-se as sequências de referência dos genes *ABCG5* nos bancos de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e delimitou-se a região de interesse: éxons 1 e 9 do gene *ABCG5*, através dos dados presentes no *Ensembl*, uma plataforma genômica. Utilizando a ferramenta em sílico NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), os *primers* de interesse para os exóns foram selecionados e solicitada síntese. Uma vez sintetizados os *primers* foram diluídos a concentração de 100 pmol/μL e depois para uma concentração de 10 pmol/μL para facilitar seu uso.

4.3.2 Amplificação gênica por PCR

As reações de reação em cadeia da polimerase (PCR) foram feitas de acordo com as orientações do fabricante (para uma reação com volume final de 25μL – quadro 2), porém adaptadas ao padrão do laboratório:

Componente	Volume
DNA genômico	2μL
Taq Green Master Mix (Promega);	12,5μL
H2O Nuclease Free	8,5μL
Primer Foward (Invitrogen)	1μL
Primer Reverse (Invitrogen)	1μL
Volume Total	25μL

Quadro 2 - Volumes da reação da padronização da PCR

Fonte: protocolo de laboratório LIM-25, 2022

4.3.3 Sequenciamento de Sanger

Após a verificação da qualidade e purificação das amostras, os produtos amplificados foram utilizados para o sequenciamento gênico automático através do kit *Big Dye Terminator v.3.1* da *Applied Biosystems*, CA, o qual contém nucleotídeos marcados com fluorescência.

As reações foram feitas com um volume final de 10 μL , contendo 3 μL de produto de PCR purificado, 1 μL de primer (*Forward ou Reverse*) e 6 μL de Mix *Big Dye* (Tampão *Big Dye*, Água e *Big Dye Terminator v.3.1*). Após essa etapa, as amostras foram direcionadas para a etapa de precipitação:

1. Para cada amostra contendo 10 μL de reação de sequenciamento, foram acrescentados 27 μL de etanol a 100% (não gelado), 01 μL de acetato de sódio 3M e 01 μL de EDTA 125mM.
2. Após esta etapa, foi realizada a homogeneização no vórtex e um rápido *spin* na centrífuga à 4200rpm. Em seguida, as amostras foram incubadas durante 15 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz.
3. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 45 minutos a 4200rpm à 4°C e logo após o sobrenadante foi descartado. Foram então acrescentados 35 μL de etanol a 70% (não gelado) e as amostras foram homogeneizadas no vórtex e centrifugadas novamente a 4200rpm durante mais 15 minutos à 4°C. Após a centrifugação, foi feito o descarte do sobrenadante. Essa etapa repetiu-se por mais uma vez.
4. Após segunda centrifugação com etanol a 70%, o sobrenadante foi descartado, as amostras foram acondicionadas em banho seco a 95°C durante 5 minutos e armazenadas em freezer protegidas da luz.

As amostras, após re-suspensão, foram sequenciadas no aparelho Sequenciador *ABI Prism 3130XL* (16 capilares), *Applied Biosystems*, CA.

As análises dos eletroferogramas foram feitas manualmente através do auxílio de softwares de edição de sequência (*Sequencher 5.0*) e as mutações encontradas foram confirmadas através de *softwares* de predição in silico e bancos de dados (*Mutation Taster*, *Human Genomic Mutation Databases*, *InterVar*, *ClinVar* e *Ensembl*).

4.4 MEDIDA DOS ESTERÓIS PLASMÁTICOS

Os esteróis do plasma, marcadores de absorção do colesterol intestinal (campesterol e beta-sitosterol) e marcadores de síntese de colesterol (desmosterol e latosterol), foram medidos por cromatografia gasosa no cromatógrafo a gás (GC) acoplado ao

espectrofotômetro de massa (MS) marca *Shimadzu GCMS-QP2010 plus* (Kyoto, Japão) utilizando versão 2.5 do *software GCMS solution*²⁵.

O padrão interno 5 α -colestane foi adicionado às amostras do plasma (200 mL) e saponificadas com 1 mL de KOH diluído em etanol (1mol/L) a 60°C por 1 hora. Em seguida, as amostras foram misturadas com 1 mL de água e extraídas por duas vezes com 3 mL de hexana. O extrato de hexana contendo os esteróis foi secado sob fluxo de nitrogênio e derivatizado com solução silanizante, composta por 100 μ L de piridina e 100 μ L de BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida)+ 1% TMCS (trimetilclorosilane) (1:1, v/v) e incubada por 1 hora a 60°C.

Um microlitro da amostra derivatizada foi injetada no cromatógrafo pelo injetor automático em modo de injeção *split* com taxa de *split* 1:3 e a temperatura do injetor foi mantida 280°C. A separação foi realizada na coluna capilar *Restek* (100% *dimethyl polysiloxane* - Rxi13323) 1ms, 30 metros de comprimento, diâmetro interno 0,25 mm, por 30 minutos, usando hélio como fase móvel com velocidade linear constante de 45,8 cm/s e a temperatura do forno foi mantida em 280°C. O espectrômetro de massa atuou em modo de elétron de impacto a umavoltagem de ionização de 70eV com a temperatura da fonte de íons e da interface a 300°C. Os íons foram identificados e monitorados no espectrômetro de massa pelo método SIM (*Single Ion Monitoring* – monitoramento de íon selecionado). A quantificação pelo GCMS/SIM foi feita pela comparação com as áreas dos picos e os espectros de massa da curva padrão de íons com correção pelo padrão interno²⁵.

5 RESULTADOS

Journal of Clinical Lipidology – Case Report

EVALUATION OF ALLELIC VARIANTS IN THE GENES ABCG5 AND ABCG8 IN A FAMILY WITH SITOSTEROLEMIA.

Authors: Jean Gabriel Vieira Coutinho¹; Ana Caroline Santos Costa²; Alexandre José Faria Carrilho³

1. Master's Student of the Postgraduate Program in Health Sciences, State University of Londrina, Londrina-Paraná-Brazil
2. Specialization in Clinical and Advanced Application in Molecular Biology Techniques, Genetic Endocrinology Unit, Hospital das Clínicas, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo-São Paulo-Brazil.
3. Professor of the Postgraduate Program in Health Sciences, State University of Londrina, Londrina-Paraná-Brazil

Correspondence Address: Alexandre José Faria Carilho; Hospital Universitário Regional Norte do Paraná. Avenida Robert Koch, 60. VL Operaria - Londrina/PR CEP: 86038-440, Londrina, Paraná, Brazil. Email: acarilho@uel.br

ABSTRACT

Sitosterolemia is a rare autosomal recessive disease characterized by the accumulation of plant sterols in the bloodstream and tissues due to increased absorption and decreased biliary excretion of these substances. It is caused by variants in both alleles of the ABCG5 or ABCG8 genes, located on chromosome 2p21. Patients often present with tuberous and tendinous xanthomas, in addition to early coronary atherosclerosis with increased cardiovascular risk. We present a clinical case of a patient diagnosed with sitosterolemia, with a heterozygous mutation in the ABCG5 gene, who was followed up for 17 years. First-degree relatives were also analyzed and showed only one allelic variant or none at all, with some showing changes in sitosterol dosage, even without presenting the disease phenotype. The patient was treated with ezetimibe 20mg/day, as well as non-pharmacological guidelines throughout this period, with no increase in tendon xanthomas or development of significant carotid atherosclerosis, although sitosterol concentrations remained elevated.

Keywords: dyslipidemias, phytosterols, loss of function mutation, atherosclerosis, ezetimibe

Introduction

Sitosterolemia (OMIM #210250), also known as phytosterolemia, is a rare autosomal recessive disease characterized by the accumulation of plant sterols, such as sitosterol and campesterol, in tissues due to increased absorption and decreased biliary excretion of these substances¹. It has been shown to be caused by mutations in either of two genes, adenosine triphosphate-binding cassette subfamily G members 5 and 8 (ABCG5 and ABCG8)^{1,2}. Mutations in ABCG8 seem to be more common than those related to the ABCG5 gene^{3,4,5}. Recent data indicate a prevalence of approximately 1 among 200,000 individuals in the general population, but its prevalence may be underestimated due to the fact that it is commonly underdiagnosed^{1,6,7}. Patients usually present tuberous and tendinous xanthomas, in addition to early coronary atherosclerosis as in familial hypercholesterolemia^{8,9}. Arthralgia, hematological abnormalities (anemia and thrombocytopenia), changes in liver function and, especially in children, severe hypercholesterolemia can also be found^{1,10,11,12}.

We described a patient diagnosed with sitosterolemia at the age of 23 and treated with ezetimibe over 17 years of follow-up. In addition, we found compound heterozygous mutation of the ABCG5 gene, one of them previously described as a variant of uncertain significance (VUS)¹³. Besides, we also confirmed the segregations of these mutations from his parents and first-degree relatives, who had mild elevations of sitosterol levels, but without signs or symptoms of the disease.

Methods

Blood and spittle samples were collected at a clinical analysis laboratory in the city where the patient and family reside and sent to Medical Investigation Laboratories of the University of São Paulo, São Paulo/SP-Brazil for genetic and lipid profile analysis, as well as dosage of phytosterols.

Aiming at evaluating disease control with the established treatment, carotid doppler was performed to estimate the volume of xanthomas and to detect the presence of atheromatous plaque in the arteries (carotid Doppler) of the patient at the beginning of the follow-up and again after 17 years.

Biochemical analysis

Plasma sterols, intestinal cholesterol absorption markers (campesterol and beta-sitosterol) and cholesterol synthesis markers (desmosterol and lathosterol), were measured by gas chromatography on a gas chromatograph (GC) coupled to a mass spectrophotometer (MS) brand Shimadzu GCMS-QP2010 plus (Kyoto, Japan) using version 2.5 of the GCMS solution25 software¹⁴.

Genetic analyses

After DNA extraction from the samples, the genes of interest ABCG5 and ABCG8 were sequenced. The analyzes of the electropherograms were performed manually using sequence editing software (Sequencher 5.0) and the mutations found were confirmed using *in silico* prediction software and databases (*Mutation Taster, Human Genomic Mutation Databases, InterVar, ClinVar and Ensembl*).

Results

A 23-year-old man showed typical xanthomas on the extensor surfaces of his hands and Achilles tendons, in addition to splenomegaly and thrombocytopenia. Serum cholesterol and triglyceride levels were normal and sitosterolemia was suspected by a tendon biopsy. The diagnosis was confirmed by high serum concentrations of β -sitosterol and campesterol, and the patient was advised to follow a low plant-sterol diet and to take ezetimibe 20 mg daily. Seven years later, there was no significant change in xanthoma size, abdominal ultrasound showed normal spleen, and plasma lipid levels were: total cholesterol (TC) 147 mg/dL, HDL

cholesterol (HDL) 44 mg/dL, LDL cholesterol (LDL) 61 mg/dL, triglycerides (Tg) 206 mg/dL, desmosterol 0.137 $\mu\text{g/mL}$ ($n < 1.6 \mu\text{g/mL}$), lanosterol 0.368 $\mu\text{g/mL}$ ($n < 2.2 \mu\text{g/mL}$), campesterol 39.65 $\mu\text{g/mL}$ ($n < 5.5 \mu\text{g/mL}$), β -sitosterol 87.53 $\mu\text{g/mL}$ ($n < 1.7 \mu\text{g/mL}$) and platelet count 109,000/mL. Seventeen years after diagnosis, at age 40, there was no significant change in xanthoma size (figure 1) and the patient remained without cardiovascular symptoms (normal echocardiography and exercise stress test), however ultrasound showed bilateral carotid-intimal-medial thickening (0.1cm on the right and 0.17cm on the left, $n < 0.1$) and serum lipid concentrations were: TC 232 mg/dL, LDL 130 mg/dL, HDL 46 mg/dL, Tg 115 mg/dL, campesterol 21.34 $\mu\text{g/mL}$ (median value of pool: 30.49; standard deviation: 12.94) ($n < 5.5 \mu\text{g/mL}$) and β -sitosterol 65.13 $\mu\text{g/mL}$ (median value of pool: 76.33; standard deviation: 15.83) ($n < 1.7 \mu\text{g/mL}$). Then, atorvastatin 20 mg was added to ezetimibe 10 mg daily.

Two mutations were identified in the index patient, by oral smear as well as by peripheral blood: 1) ABCG5(NM_022436.3):c.64C>T p.(Gln22*) in éxon 1, classified as pathogenic; 2) ABCG5(NM_022436.3):c.1217G>A p.(Arg406Gln) of éxon 9, classified as probably pathogenic¹⁴. Regarding the other family members, the patient's mother presented the mutation in éxon 1 and the father the mutation in éxon 9, indicating the heritability of the variant in the patient. However, among the other eight relatives tested, only one sister had the éxon 9 mutation (figure 2).



Figure 1 – Tendon xanthomas. Tendon xanthomas in hands and Achilles tendons maintaining the same size and quantity since the initial evaluation. “A” and “C” are from 2004 and “B” and “D” are from 2021.

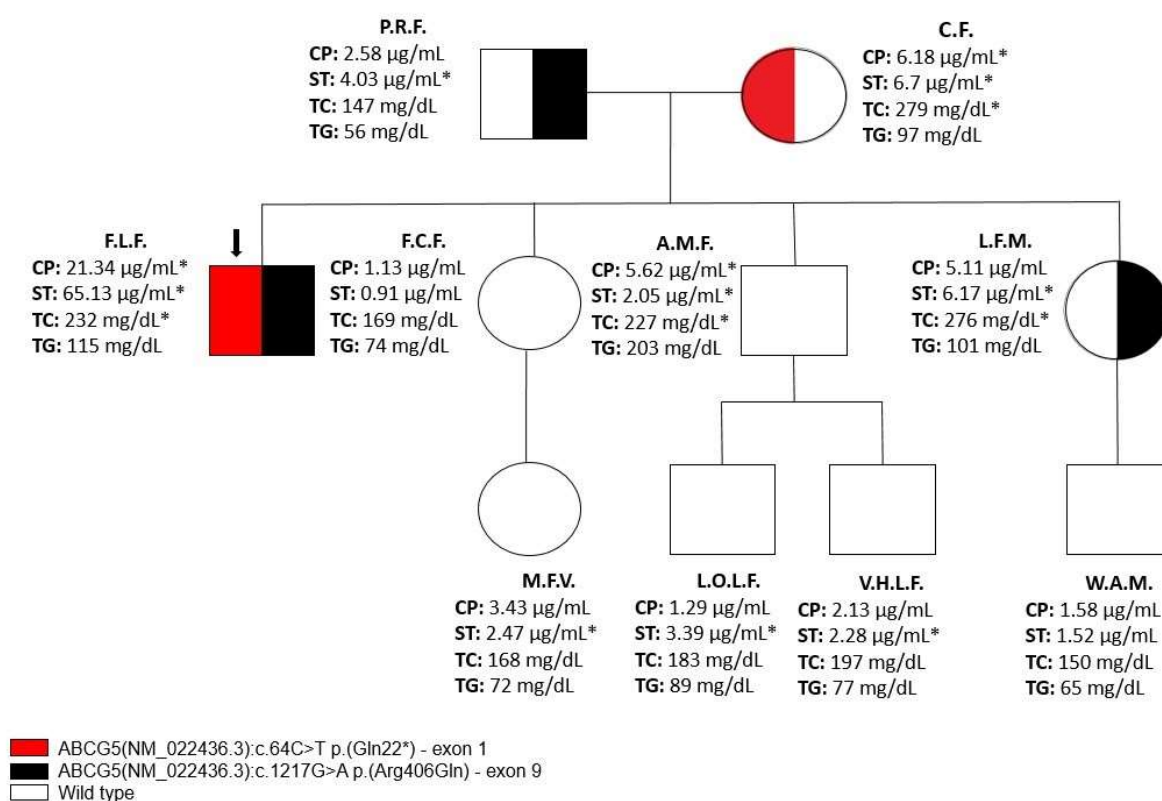


Figure 2: Pedigree of the family with sitosterolemia.

(↓) indicates the index case; (*) indicates values below the normal; CP = campesterol ($n < 5.5$ µg/mL); ST = beta-sitosterol ($n < 1.7$ µg/mL); TC = total cholesterol ($n < 200$ mg/dL); TG = triacylglycerols ($n < 150$ mg/dL).

Discussion

The findings in the formation of the pedigree corroborate the information registered in the literature that relate the mutations in the ABCG5 gene, even in heterozygosity, as responsible for the phenotype related to sitosterolemia. The index patient has both allelic variants in this gene and clinical characteristics compatible with the disease, unlike their first-degree relatives who have only one or no variant. It is important to emphasize that mutations in this gene are more common in patients of Asian ethnicity⁵, however, as reported by the patient and his family, there is no known close ancestry.

Another controversial finding is that the mutation referred to in exon 9 of the ABCG5 gene is referred to as potentially pathogenic¹³, but even so, in heterozygosity with the pathogenic variant of exon 1, it managed to express the pathology phenotype. It is also possible to note that the patient's father and sister, carriers of mutation only in exon 9, do not express the characteristics of the disease, but have sitosteroid values higher than the reference values,

which leads to the questioning whether this mutation is pathogenic, in fact. Most variants are believed to be benign, but virtually none of those likely to be pathogenic or of uncertain significance have been experimentally or clinically validated - the number of ABCG5/ABCG8 variants is sure to grow as additional genomes and exomes are sequenced, as well as the need for better tools to predict which variants are pathogenic¹⁵. The classification of mutations according to their pathogenesis varies between databases and takes into account factors such as their clinical relevance, functional analysis, population frequency and evolutionary conservation – although, currently, the mutation found in exon 9 is classified as “potentially pathogenic”, it is believed that the data from this study may corroborate the future classification change to “pathogenic mutation”¹³.

It can be seen that only the index patient who has the two variants of the ABCG5 gene has alterations in sterols (campesterol and sitosterol) compatible with the pathology of sitosterolemia, which remain above the reference values even with adequate use of the treatment offered. Relatives who have only one allelic variant, at first, do not express the disease phenotype, as well as those who do not have any variant, even though they may have results above the reference values for cholesterol, triglycerides and phytosterols. Recent studies have shown that patients heterozygous for the mutation may have a milder disease phenotype².

During the patient's follow-up period until the last evaluation, it was verified that the index patient did not show a response in the control of sitosterols with the proposed treatment, despite having referred to follow the pharmacological and non-pharmacological measures oriented. Even so, there was no increase in tendon xanthomas, nor carotid alterations or cardiovascular events compatible with the evolution of the disease described in the literature^{3,11}. Thus, one might even question the role of plant sterols in the development of atherosclerotic diseases, even in the face of the multicausal role of these pathologies. In contrast to LDL cholesterol, the pathogenicity of sitosterol in the development of atherosclerosis remains unclear - only a few studies have systematically investigated this issue and the serum level of sitosterol itself does not seem to be the causal factor, requiring larger studies for this elucidation⁵.

Conclusions

Sitosterolemia remains a rare and underdiagnosed disease, mainly due to the general population's difficulty in accessing specific tests for measuring plasma phytosterols, as well as research into genetic tests.

It could be seen from the 17-years follow-up of the patient since diagnosis that the prescribed treatment did not normalize the plasmatic concentrations of phytosterols, but

apparently it was able to stabilize the progression of the xanthomas and keep the patient free of atherosclerotic disease. In addition, the verification of genetic alterations in family members who did not present a phenotype related to the disease can increase the understanding of their role in the clinical manifestations of the disease.

Interest conflicts

The authors of this article have no conflicts of interest.

Financing fund

This research did not receive any specific grants from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Contribution declaration

All authors contributed significantly to the research: JGVC performed the literature review and organized the case study; ACSC was in charge of the laboratory analysis of genetic evaluation and AJFC is the specialist in dyslipidemias, monitored and evaluated the patient throughout this period, in addition to carrying out the final review of this manuscript.

Referências

1. Veit L, Machado GA, Bürer C, Speer O, Häberle J. Sitosterolemia—10 years observation in two sisters. *JIMD reports*. 2019;48(1):4-10. doi: 10.1002/jmd2.12038.
2. Kojima N, Tada H, Usui S, Sakata K, Hayashi K, Nohara A, et al. Serum sitosterol level predicting ABCG5 or ABCG8 genetic mutations. *Clinica Chimica Acta*. 2020;507:11-16. doi: 10.1016/j.cca.2020.04.003.
3. Yoo EG. Sitosterolemia: a review and update of pathophysiology, clinical spectrum, diagnosis, and management. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2016;21(1):7. doi: 10.6065/apem.2016.21.1.7.
4. Hubacek JA, Berge KE, Cohen JC, Hobbs HH. Mutations in ATP-cassette binding proteins G5 (ABCG5) and G8 (ABCG8) causing sitosterolemia. *Hum Mutat*. 2001;18(4):359-360. doi: 10.1002/humu.1206.
5. Tada H, Nohara A, Inazu A, Sakuma N, Mabuchi H, Kawashiri M. Sitosterolemia, hypercholesterolemia, and coronary artery disease. *J Atheroscler Thromb*. 2018;25(9):783-789. doi: 10.5551/jat.RV17024.
6. Xu L, Wen W, Yang Y, Xie J, Li R, Wu Y. Features of sitosterolemia in children. *Am J*

Cardiol. 2020;125(9):1312-1316. doi: 10.1016/j.amjcard.2020.01.048.

7. Keller S, Prechtel D, Aslanidis C, Ceglarek U, Thiery J, Schmitz G, et al. Increased plasma plant sterol concentrations and a heterozygous amino acid exchange in ATP binding cassette transporter ABCG5: a case report. *Eur J Med Genet.* 2011;54(4):e458-e460. doi: 10.1016/j.ejmg.2011.05.003.
8. Hegele RA, Ginsberg HN, Chapman MJ, Nordestgaard BG, Kuivenhoven JA, Averna M. The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: implications for definition, diagnosis, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014;2(8):655-666. doi: 10.1016/s2213-8587(13)70191-8.
9. Truong PK, Lao TD, LE Tha. The major molecular causes of familial hypercholesterolemia. *Asian J Pharm Res Health Care.* 2018;10(Spl 2):60-68. doi: 10.18311/ajprhc/2018/20031.
10. Niu DM, Chong KW, Hsu JH, Wu TJT, Yu HC, Huang CH, et al. Clinical observations, molecular genetic analysis, and treatment of sitosterolemia in infants and children. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33:437-443. doi: 10.1007/s10545-010-9126-2.
11. Tada H, Nomura A, Ogura M, Ikewaki K, Ishigaki Y, Inagaki K, Tsukamoto K, et al. Diagnosis and management of sitosterolemia 2021. *J Atheroscler Thromb.* 2021;28(8):791-801. doi: 10.5551/jat.RV17052.
12. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016;17(6):333-351. doi: 10.1038/nrg.2016.49.
13. National Center for Biotechnology Information. ClinVar; [VCV000228798 .20], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000228798.20> (accessed May 23, 2023).
14. Ahmida HSM, Bertucci P, Franzò L, Massoud R, Cortese C, Lala A, et al. Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with selective ion monitoring (SIM). *J Chromatogr B.* 2006;842(1):43-47. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.05.024..
15. Williams K, Segard A, Graf GA. Sitosterolemia: twenty years of discovery of the function of *abcg5 abcg8*. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2641. doi: 10.3390/ijms22052641.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sitosterolemia permanece como uma doença rara e pouco diagnosticada, sobretudo pela dificuldade de acesso da população geral a exames específicos para dosagem de fitosteróis plasmáticos, bem como a pesquisa de mutações genéticas. O caso exposto exemplifica a apresentação fenotípica e a expressão genética dessa patologia na família de um paciente acometido, que apresenta mutação nos dois alelos do gene ABCG 5 e em seus parentes de primeiro grau, que apresentam uma ou nenhuma variante e ausência de sintomas ou alterações laboratoriais justificadas pela doença.

Pode-se verificar pelo acompanhamento de 17 anos do paciente desde o diagnóstico que o tratamento prescrito não normalizou as concentrações plasmáticas de fitosteróis, porém aparentemente foi capaz de estabilizar a progressão dos xantomas e manter o paciente sem doença aterosclerótica. É válido ressaltar que devido à fisiopatologia complexa do metabolismo lipídico e de esteróis vegetais relacionada à sitosterolemia, as estratégias terapêuticas ainda necessitam ser aperfeiçoadas para garantir menos morbidade aos seus portadores.

Esses achados tiveram implicações relevantes para o paciente e membros da família, tanto no que se refere a verificação da ausência de formas mais leves e subclínicas da doença, como também para orientações acerca de aconselhamento genético dos parentes que apresentam as mutações. Além disso, a verificação de alterações genéticas em familiares que não apresentaram fenótipo relacionado à doença pode aumentar o entendimento sobre o papel delas nas manifestações clínicas desta patologia.

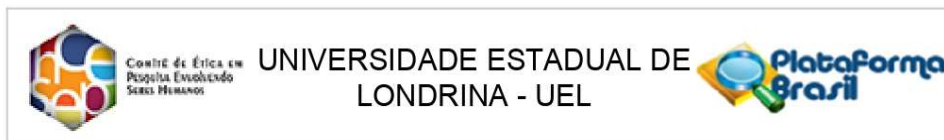
REFERÊNCIAS

1. Tada H, Nohara A, Inazu A, Sakuma N, Mabuchi H, Kawashiri M. Sitosterolemia, hypercholesterolemia, and coronary artery disease. *J Atheroscler Thromb.* 2018;25(9):783-789. doi: 10.5551/jat.RV17024.
2. Bhattacharyya AK, Connor WE. β -Sitosterolemia and xanthomatosis: a newly described lipid storage disease in two sisters. *J Clin Invest.* 1974;53(4):1033-1043. doi: 10.1172/JCI107640.
3. Yoo EG. Sitosterolemia: a review and update of pathophysiology, clinical spectrum, diagnosis, and management. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 2016;21(1):7. doi: 10.6065/apem.2016.21.1.7.
4. Tada H, Nomura A, Ogura M, Ikewaki K, Ishigaki Y, Inagaki K, Tsukamoto K, et al. Diagnosis and management of sitosterolemia 2021. *J Atheroscler Thromb.* 2021;28(8):791-801. doi: 10.5551/jat.RV17052.
5. Ajagbe BO, Othman RA, Myrie SB. Plant sterols, stanols, and sitosterolemia. *J AOAC Int.* 2015;98(3):716-723. doi: 10.5740/jaoacint.SGEAjagbe.
6. Tada H, Kojima N, Yamagami K, Takamura M, Kawashiri MA. Clinical and genetic features of sitosterolemia in Japan. *Clin Chim Acta.* 2022;530:39-44. doi: 10.1016/j.cca.2022.02.021.
7. MAHZARI MM. Sitosterolemia: A Case Report and a Concise Literature Review. *Case Rep Endocrinol.* 2023;2023. doi: 10.1155/2023/4451595.
8. Renner C, Connor WE, Steiner RD. Sitosterolemia presenting as pseudohomozygous familial hypercholesterolemia. *Clin Med Res.* 2016;14(2):103-108. doi: 10.3121/cmr.2016.1294.
9. Myrie SB, Steiner RD, Mymin D. Sitosterolemia. GeneReviews® [Internet]. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK131810/>.
10. Bastida JM, Benito R, Janusz K, Díez-Campelo M, Hernández-Sánchez JM, Marcellini S, et al. Two novel variants of the ABCG5 gene cause xanthelasmas and macrothrombocytopenia: a brief review of hematologic abnormalities of sitosterolemia. *J Thromb Haemost.* 2017;15(9):1859-1866. doi: 10.1111/jth.13777.
11. Williams K, Segard A, Graf GA. Sitosterolemia: twenty years of discovery of the function of abcg5 abcg8. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2641. doi: 10.3390/ijms22052641.
12. Veit L, Machado GA, Bürer C, Speer O, Häberle J. Sitosterolemia—10 years observation in two sisters. *JIMD reports.* 2019;48(1):4-10. doi: 10.1002/jmd2.12038.
13. Kojima N, Tada H, Usui S, Sakata K, Hayashi K, Nohara A, et al. Serum sitosterol level predicting ABCG5 or ABCG8 genetic mutations. *Clinica Chimica Acta.* 2020;507:11-16. doi: 10.1016/j.cca.2020.04.003.
14. Lee MH, Lu K, Patel SB. Genetic basis of sitosterolemia. *Curr Opin Lipidol.* 2001;12(2):141. doi: 10.1097/00041433-200104000-00007.

15. Wang J, Joy T, Mymin D, Frohlich J, Hegele RA. Phenotypic heterogeneity of sitosterolemia. *J Lipid Res.* 2004;45(12):2361-2367. doi: 10.1194/jlr.M400310-JLR200.
16. Salen G, Von Bergmann K, Lutjohann D, Kwiterovich P, Kane J, Patel SB. Ezetimibe effectively reduces plasma plant sterols in patients with sitosterolemia. *Circulation.* 2004;109(8):966-971. doi: 10.1161/01.CIR.0000116766.31036.03.
17. Hubacek JA, Berge KE, Cohen JC, Hobbs HH. Mutations in ATP-cassette binding proteins G5 (ABCG5) and G8 (ABCG8) causing sitosterolemia. *Hum Mutat.* 2001;18(4):359-360. doi: 10.1002/humu.1206.
18. Xu L, Wen W, Yang Y, Xie J, Li R, Wu Y. Features of sitosterolemia in children. *Am J Cardiol.* 2020;125(9):1312-1316. doi: 10.1016/j.amjcard.2020.01.048.
19. Keller S, Pechtl D, Aslanidis C, Ceglarek U, Thiery J, Schmitz G, et al. Increased plasma plant sterol concentrations and a heterozygous amino acid exchange in ATP binding cassette transporter ABCG5: a case report. *Eur J Med Genet.* 2011;54(4):e458-e460. doi: 10.1016/j.ejmg.2011.05.003.
20. Hegele RA, Ginsberg HN, Chapman MJ, Nordestgaard BG, Kuivenhoven JA, Averna M. The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: implications for definition, diagnosis, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014;2(8):655-666. doi: 10.1016/s2213-8587(13)70191-8.
21. Truong PK, Lao TD, LE Tha. The major molecular causes of familial hypercholesterolemia. *Asian J Pharm Res Health Care.* 2018;10(Spl 2):60-68. doi: 10.18311/ajprhc/2018/20031.
22. Niu DM, Chong KW, Hsu JH, Wu TJT, Yu HC, Huang CH, et al. Clinical observations, molecular genetic analysis, and treatment of sitosterolemia in infants and children. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33:437-443. doi: 10.1007/s10545-010-9126-2.
23. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016;17(6):333-351. doi: 10.1038/nrg.2016.49.
24. Ahmida HSM, Bertucci P, Franzò L, Massoud R, Cortese C, Lala A, et al. Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with selective ion monitoring (SIM). *J Chromatogr B.* 2006;842(1):43-47. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.05.024.

APÊNDICES

Apêndice A



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de variantes alélicas nos genes das proteínas ABCG5 e ABCG8, associado a correlações clínicos-laboratoriais em uma família com diagnóstico de sitosterolemia.

Pesquisador: Alexandre José Faria Carrilho

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 49260921.8.0000.5231

Instituição Proponente: CCS - Departamento de Clínica Médica

Patrocinador Principal: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.989.252

Apresentação do Projeto:

De acordo com o documento PB_Informações Básicas:

Resumo:

A sitosterolemia é uma doença autossômica recessiva rara caracterizada pelo acúmulo de esteróis vegetais, como o sitosterol e campesterol, além de colesterol, na corrente sanguínea e tecidos devido ao aumento da absorção e diminuição da excreção biliar dessas substâncias. É causada por variantes em ambos os alelos dos genes ABCG5 ou ABCG8, localizados no cromossomo 2p21, que são responsáveis por codificarem os transportadores de esteróis do lume intestinal para a bile, esterolina 1 e 2. Os pacientes costumam apresentar xantomas tuberosos e tendíneos, além de aterosclerose coronariana precoce e, assim como nas hipercolesterolemias familiares, aumento do risco para infarto agudo do miocárdio e morte súbita. O objetivo desse estudo é investigar a presença de variantes alélicas nos genes ABCG5 e ABCG8, além de determinar as concentrações de esteróis plasmáticos nos parentes de primeiro grau de um paciente com diagnóstico de sitosterolemia e avaliar resposta clínica ao tratamento com dieta e ezetimiba no paciente índice. Para tal, amostras de sangue periférico e de DNA obtido por esfregaço oral serão enviadas ao laboratório de lípidos (LIM-10) da FMUSP, onde serão analisadas. Espera-se identificar os portadores oligossintomáticos das variantes genéticas.

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

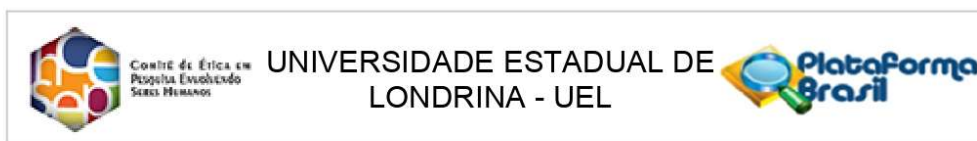
CEP: 86.057-970

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 4.989.252

Objetivo da Pesquisa:

De acordo com o documento PB_Informações Básicas:

Objetivo Primário:

Investigar a presença de variantes alélicas nos genes ABCG5 e ABCG8, além de determinar as concentrações de esteróis plasmáticos nos parentes de primeiro grau de um paciente com diagnóstico de sitosterolemia.

Objetivo Secundário:

Avaliar resposta clínica ao tratamento com dieta e ezetimiba de um paciente com sitosterolemia através da dosagem plasmáticas de esteróis, bem como a mensuração dos xantomas e da presença de doença aterosclerótica arterial por método de imagem.

Realizar dosagem de esteróis plasmáticos em familiares de primeiro grau do paciente estudado;

Investigar presença de variantes alélicas nos genes ABCG5 ou ABCG8 em familiares de primeiro grau do paciente em questão.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com o documento PB_Informações Básicas:

Riscos:

Consideramos os riscos desprezíveis, pois serão feitas apenas uma punção de veia periférica para coleta de uma amostra de sangue e um esfregaço de mucosa oral para obtenção de DNA

No TCLE e na carta resposta constam como risco: Os possíveis riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são considerados baixíssimos, pois decorrem exclusivamente de uma coleta de amostra de DNA por esfregaço oral e uma coleta de sangue por punção venosa periférica.

Benefícios:

Identificar os portadores das variantes alélicas para sitosterolemia e orientar sobre terapêutica e aconselhamento genético.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante para área.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou folha de rosto adequadamente preenchida e assinada.

Apresentou declaração de concordância do Laboratório de Lipídeos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

Apresentou TCLE em acordo com a resolução.

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

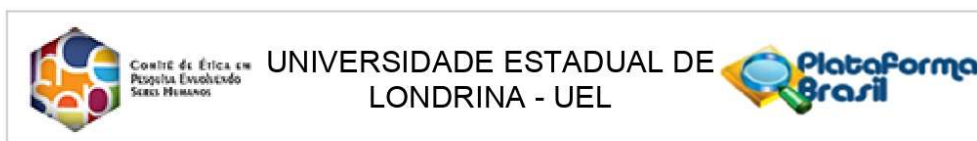
UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 4.989.252

A coleta de dados está prevista para 03/11/2021.

O orçamento previsto é de R\$ 1.000,00 e será custeado pelo próprio pesquisador

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apontadas em parecer anterior foram atendidas, recomenda-se aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado(a) Pesquisador(a),

Este é seu parecer final de aprovação, vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina. É sua responsabilidade apresentá-lo aos órgãos e/ou instituições pertinentes.

Ressaltamos, para início da pesquisa, as seguintes atribuições do pesquisador, conforme Resolução CNS 466/2012 e 510/2016:

A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais, cabendo-lhe:

- conduzir o processo de Consentimento e de Assentimento Livre e Esclarecido;
- apresentar dados solicitados pelo sistema CEP/CONEP a qualquer momento;
- desenvolver o projeto conforme delineado, justificando, quando ocorridas, a sua mudança ou interrupção;
- elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período mínimo de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa;
- encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores e pessoal técnico integrante do projeto;
- justificar fundamentadamente, perante o sistema CEP/CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Coordenação CEP/UEL.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1783582.pdf	21/09/2021 12:01:14		Aceito

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

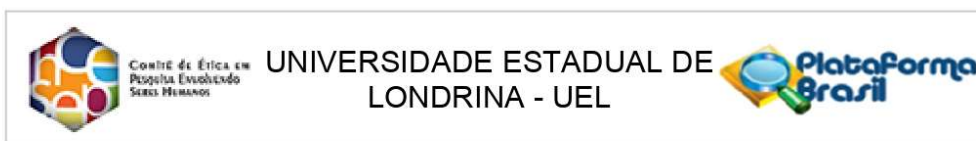
UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 4.989.252

Outros	Cartaresposta3.pdf	21/09/2021 11:59:50	Alexandre José Faria Carrilho	Aceito
Outros	Declaracao.pdf	21/09/2021 11:59:12	Alexandre José Faria Carrilho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetositosterolemiarevisado3.pdf	21/09/2021 11:58:17	Alexandre José Faria Carrilho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ConcordanciaLabSantaMonica.pdf	11/09/2021 10:14:32	Alexandre José Faria Carrilho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEREvisado.pdf	11/09/2021 10:11:38	Alexandre José Faria Carrilho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLCaseoindice.pdf	11/09/2021 10:10:59	Alexandre José Faria Carrilho	Aceito
Outros	Cartaresposta.pdf	11/09/2021 10:10:27	Alexandre José Faria Carrilho	Aceito
Declaração de concordância	Declaracaodeconcordancia.pdf	08/07/2021 17:52:51	Alexandre José Faria Carrilho	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderostro.pdf	08/07/2021 17:49:06	Alexandre José Faria Carrilho	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LONDRINA, 21 de Setembro de 2021

Assinado por:
Adriana Lourenço Soares Russo
(Coordenador(a))

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br