

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Estudo Bioquímico e Molecular de Famílias com Hipercolesterolemia Familiar

Flávia Raquel Gameiro Leitão

Dissertação

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2012

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Estudo Bioquímico e Molecular de Famílias com Hipercolesterolemia Familiar

Dissertação orientada pela Doutora Mafalda Bourbon (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge)
e pela Professora Doutora Ana Crespo (Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa)

Flávia Raquel Gameiro Leitão

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2012

O projecto, que permitiu a realização desta dissertação, está inserido no Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, Grupo de Investigação Cardiovascular (GIC).

As referências bibliográficas nesta dissertação estão de acordo com as normas da revista *British Medical Journal*.

A escrita desta dissertação não segue as regras do novo acordo ortográfico.

*“Agir, eis a inteligência
verdadeira. Serei o que quiser.
Mas tenho que querer o que for.
O êxito está em ter êxito, e não
em ter condições de êxito.
Condições de palácio tem
qualquer terra larga, mas onde
estará o palácio se não o fizerem
ali?”*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Primeiro que tudo quero agradecer à minha orientadora, Doutora Mafalda Bourbon, por me ter acolhido no seu grupo de trabalho e me ter proporcionado a elaboração desta dissertação que me permitiu desenvolver a nível, não só profissional, mas também pessoal.

Agradeço à Professora Ana Crespo por todo o apoio prestado no âmbito desta tese e também na minha formação.

A todos os participantes, familiares e médicos que colaboram no estudo o meu agradecimento. Sem eles este trabalho nunca poderia ter sido realizado.

Às minhas colegas de grupo Catarina Alves e Ana Medeiros, o meu sincero agradecimento por todo o apoio laboratorial e teórico que me proporcionaram, por todas as críticas ao meu trabalho que me permitiram tentar sempre ser melhor e pelos momentos de descontração no gabinete. Agradeço ainda toda a paciência ao longo deste ano. À Elisete agradeço também o bom companheirismo.

Às antigas colegas de grupo, Vânia Francisco e Tânia Santos, um obrigado por toda a prestabilidade e boa integração no grupo de trabalho. Obrigado pelo apoio inicial que foi, sem dúvida, essencial. À Alexandra Gomes, um obrigado especial por todo o apoio, pelas gargalhadas e pela amizade.

Às restantes colegas de departamento, Liliana Marques, Inês Conceição e Bárbara Oliveira, obrigada pelo bom ambiente e apoio prestado. Foi um prazer partilhar o laboratório com vocês, assim como boas discussões científicas e docinhos à hora da refeição!

À Isabel Picanço agradeço também todo o apoio e conhecimento transmitido que foi (e continua a ser), sem dúvida, fundamental. Também quero agradecer pela prestabilidade de toda a equipa da química clínica e da Unidade de Tecnologia e Inovação.

À Sara Berguete e à Sofia Paulos, agradeço todo o apoio e amizade, todas as trocas de risos ou lágrimas. Agradeço o altíssimo companheirismo. À Ana Mateus agradeço pelo mesmo e ainda pela sua forma de me fazer ver a vida mais confiante e altruísta. Agradeço cada momento sem exceção. Cada uma especial à sua maneira, agradeço todos os momentos que partilhámos (e que espero continuar a partilhar).

Um dia li que *“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que tornou a tua rosa tão importante”* (Antoine de Saint-Exupéry). E quando sinto que sou a rosa de pessoas fundamentais para mim, sou feliz. Amigos que trago comigo há muito com os quais estou em constante aprendizagem. Amigos são a família que escolhemos e eu sei que sou feliz, porque vos tenho. Não é preciso enumerar nomes, os amigos reconhecem-se na vida, longe ou perto, estamos juntos, seja desde o 7º ano, desde a FCT ou desde aquela tarde ao acaso no café, vocês sabem quem são.

Apenas um obrigado especial ao Nuno Santos por me ter apoiado ainda como padrinho universitário, para além de toda a amizade que existe. Por ser o melhor padrinho e por conseguir mostrar-me que há sempre volta a dar!

Tia Ana Cristina, primos Ricardo e Cristina e Avó Mimi, agradeço a compreensão pela minha ausência. Sabem que são importantes para mim.

À Ângela, por toda a paciência e amizade que, facilmente, nos uniu. À Vitória agradeço a confiança que me deposita e por me ajudar a ser uma pessoa mais completa. Ao Gustavo, meu irmão, um obrigado por fazer de mim uma pessoa mais feliz ao partilhar momentos comigo e por me chamar agricultora, incitando-me a defender com garra o belo que é ser um Biólogo!

Ao Paulinho, é impossível agradecer a paciência e ternura prestada durante todo este tempo, especialmente nesta fase. A verdade é que nem sempre sei merecer o que me dás. Obrigado por nunca desistires de mim.

À minha avó Rosa, agradeço todas as suas preocupações e todas as suas palavras que, mesmo vindas sem conversa antecedente, tinham sempre um significado que me fortalecia. Por fazer de mim quem sou, por ser o meu ídolo maior!

Por fim, mas mais importante, um obrigado aos meus pais. Sem eles não podia ser o que sou hoje, não podia ter nem metade da felicidade que tenho, não podia ter a conduta que tenho e nunca poderia ter chegado até aqui. Graças a vocês agarrei os meus sonhos e voei mais alto porque vocês acreditaram em mim e sempre acompanharam o meu voo com altos e baixos. Um obrigado inexplicável.

RESUMO

Introdução: A hipercolesterolemia familiar (FH) é uma patologia genética, caracterizada clinicamente por um aumento dos níveis de colesterol-LDL (c-LDL) no plasma, sendo maioritariamente causada por mutações no gene do receptor das LDL (gene LDLR). Mutações *missense* nos genes APOB ou PCSK9 podem causar fenótipos semelhantes. A FH sozinha ou em conjugação com outros factores de risco cardiovasculares pode promover o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCVs) prematuras. De acordo com a frequência da doença (1:500 indivíduos) estima-se que em Portugal existam cerca de 20.000 doentes com FH, porém esta encontra-se sub-diagnosticada. Até à data, apenas foram diagnosticados aproximadamente 550 doentes. O método de *cascade screening* (CS) permite a rápida identificação de indivíduos com FH numa família e foi descrito como custo-efectivo na identificação de novos doentes com FH.

Objectivos: O principal objectivo deste trabalho foi, através do CS, aumentar o número de casos identificados com FH. Pretendeu-se ainda realizar a caracterização bioquímica de casos índice e respectivos familiares com FH, a fim de tentar correlacionar o genótipo e o fenótipo destes e compreender de que forma a FH e outros factores de risco cardiovascular influenciam o desenvolvimento de DCVs nesta população.

Métodos: Para alcançar os objectivos propostos, estudaram-se 45 famílias, perfazendo um total de 194 indivíduos, 45 casos índice (cujo estudo molecular já havia sido realizado) e 149 familiares. As amostras de soro de casos índice e familiares foram analisados por electroforese de lipoproteínas para avaliação da presença de sdLDL e por métodos enzimáticos e colorimétricos automatizados para determinar a concentração de sdLDL e outras apolipoproteínas no soro. Após extracção de DNA dos familiares realizou-se a amplificação e sequenciação dos exões em que se detectou uma mutação no respectivo caso índice (gene LDLR, APOB). Foi ainda determinado o genótipo *APOE* de todos os indivíduos estudados. Os resultados da sequenciação foram analisados através do software *staden package*. Por fim realizou-se uma análise estatística de forma a interpretar os resultados obtidos.

Resultados: A partir do estudo molecular aos 149 familiares, foram diagnosticados com FH 83 indivíduos (20 crianças e 63 adultos). Determinou-se que 71,79% das crianças e 76,62% dos adultos apresentam um genótipo *APOE* E3/E3, não se obtendo diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes alelos e o perfil bioquímico. Relativamente à estratificação das sdLDL, 65,52% das crianças e 72,88% dos adultos apresentam, maioritariamente, subfracções maiores e menos densas das LDL. Observou-se ainda que os níveis de Lipoproteína(a) são tendencialmente superiores em indivíduos com DCV. Da amostra total, 47,93% dos indivíduos com FH não estão ainda medicados. Porém, mesmo os indivíduos medicados apresentam um perfil lipídico de risco para o desenvolvimento de uma DCV prematura.

Conclusão: O CS é um método cujo custo-benefício é extremamente eficaz. Sendo, no entanto, necessário, aumentar a adesão dos familiares. O CS permite identificar precocemente indivíduos com FH, que apresentam elevado risco cardiovascular, necessitando de intervenções farmacológica e de controlo de outros factores de risco adequadas. Os resultados obtidos demonstram que mais de 50% dos casos não tem o seu risco cardiovascular controlado, sendo essencial uma melhor compreensão sobre a dinâmica existente entre as DCVs e a FH.

Palavras-chave: Hipercolesterolemia Familiar, mutações, colesterol-LDL, Doenças Cardiovasculares prematuras.

ABSTRACT

Title: Biochemical and Molecular study of Families with Familial Hypercholesterolaemia.

Introduction: Familial Hypercholesterolemia (FH) is a genetic condition, clinically characterized by increased levels of LDL-cholesterol circulating in plasma and is mainly caused by mutations in receptor LDL (LDLR gene), but missense mutations in APOB and PCSK9 genes may also cause similar phenotypes. FH combined with the presence of other cardiovascular risk factors, may promote the development of premature cardiovascular diseases (CVD). According to the frequency of FH (1:500 individuals) estimated in Portugal, there are about 20.000 cases of FH, but is under-diagnosed. To date, only approximately 550 FH patients were identified. The Cascade Screening (CS) method allows the rapid identification of FH individuals with a family and was described as a cost-effective method to identify new FH patients.

Objectives: The main goal of this work is, through CS, increase the number of individuals diagnosed with FH. It is also proposed to perform a biochemical characterization of index cases with FH and their relatives to try to correlate genotype and phenotype of these subjects and understand how the FH and other cardiovascular risk factors may influence the development of CVD in our population.

Methods: To achieve these objectives we studied 45 families in a total of 194 individuals: 45 index cases (whose molecular study had already been done) and 149 relatives. Serum samples from index cases and relatives were analyzed for lipoproteins by electrophoresis and stratification of sdLDL. Through an automated enzymatic and colorimetric methods were quantified sdLDL and others apolipoproteins in serum samples, respectively. After de DNA extraction of relatives, the amplification and sequencing of the exon in which a mutation was detected in the respective index case (LDLR or APOB gene) was performed. It was further determined the APOE genotype for all the subjects in study. The sequencing results were analyzed using *staden package* software. At last, was performed a statistical analysis in order to interpret the results.

Results: From the molecular study of 149 relatives, 83 were diagnosed with FH (20 children and 63 adults). It was determined that 71,79% of the children and 76,62% of the adults have E3/E3 *APOE* genotype. Through the sdLDL stratification, it was observed that 65.52% of children and 72.88% of adults have, mostly sub fractions larger and less dense LDL. It was also observed that the levels of Lipoprotein(a) tends to be higher in subjects with CVD. Of the total sample, 47,93% of individuals with FH are not yet treated. However, even individuals taking medication have a lipid risk for the development of a premature CVD.

Conclusion: CS is a extremely cost-effective method. However, is necessary the increase of relatives adherence. The CS allows the early identification of individuals with FH who have high cardiovascular risk, requiring pharmacologic intervention and control of other cardiovascular risk factors. The results show that over than 50% of cases do not have their cardiovascular risk controlled and so is essential a better understanding of the dynamics between the CVD and FH.

Keywords: Familial Hypercholesterolemia, mutations, LDL-cholesterol, premature cardiovascular disease.

Índice

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Agradecimentos | i |
| Resumo | ii |
| Abstract | iii |
| Lista de Tabelas | vii |
| Lista de figuras..... | ix |
| Lista de Abreviaturas..... | x |
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Doenças Cardiovasculares..... | 1 |
| • Factores de Risco Cardiovascular | 1 |
| 1.1.1. Aterosclerose..... | 3 |
| 1.2. Perfil Lipídico e Lipoproteínas | 4 |
| 1.2.1. Apolipoproteínas | 5 |
| 1.2.2. Subfrações lipoproteicas: <i>small-dense LDL</i> | 6 |
| 1.2.3. Vias metabólicas das lipoproteínas | 7 |
| 1.3. Factores Genéticos que influenciam o aparecimento das DCVs..... | 10 |
| 1.3.1. Polimorfismos do gene APOE | 10 |
| 1.3.2. Lipoproteína (a) | 10 |
| 1.4. Dislipidemias | 12 |
| 1.4.1. Hipercolesterolemia Familiar | 13 |
| 1.4.1.1. Diagnóstico da Hipercolesterolemia Familiar | 14 |
| 1.4.1.2. Caracterização molecular | 15 |
| 1.4.1.3. Genes envolvidos na Hipercolesterolemia Familiar | 15 |
| • Gene LDLR..... | 15 |
| • Classificação dos tipos de mutação no gene LDLR | 16 |
| • Gene APOB | 17 |
| • Gene PCSK9 | 18 |
| 1.4.1.4. <i>Cascade screening</i> | 19 |
| 1.4.1.5. Terapêutica..... | 20 |
| 2. Enquadramento e Objectivos do projecto | 23 |
| 3. Materiais e Métodos | 24 |
| 3.1. Recrutamento dos doentes..... | 24 |
| 3.1.1. Critérios e obtenção das amostras..... | 24 |
| 3.2. Estudo Bioquímico..... | 24 |
| 3.2.1. Análises de Rotina | 24 |
| 3.2.2. <i>Lipoprint®</i> - separação de diferentes subfracções lipoproteicas, incluindo as sdLDL..... | 25 |
| 3.2.3. <i>Daytona Rx</i> - Avaliação quantitativa de sdLDL e apolipoproteínas..... | 26 |

| | | |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3. | Estudo molecular..... | 27 |
| • | Extracção de Ácidos Nucleicos (DNA)..... | 27 |
| • | Isolamento de Células e Extracção de RNA..... | 28 |
| • | Síntese de cDNA..... | 29 |
| • | Amplificação por Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR)..... | 29 |
| • | Análise por electroforese em gel de agarose dos fragmentos de DNA amplificados..... | 31 |
| • | Cromatografia líquida de alta pressão desnaturante (dHPLC)..... | 31 |
| • | Purificação dos produtos de PCR..... | 32 |
| • | Sequenciação automática dos produtos de PCR..... | 32 |
| • | Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)..... | 33 |
| 3.4. | Análise Estatística..... | 34 |
| 4. | Resultados..... | 35 |
| 4.1. | Caracterização da amostra..... | 35 |
| 4.2. | Análise molecular..... | 35 |
| • | Estudo familiar para alterações não descritas anteriormente (Famílias F513, F619 e F670)..... | 37 |
| • | Estudo familiar para alterações com patogenicidade duvidosa (Famílias F390, F147 e F665)..... | 39 |
| • | Estudo familiar para alterações de patogenicidade conhecida..... | 40 |
| • | Família 10..... | 41 |
| • | Família 579..... | 42 |
| • | Família 539..... | 43 |
| • | Família 289..... | 44 |
| • | Família 156 – Hipercolesterolemia Familiar heterozigotia composta..... | 45 |
| 4.3. | Caracterização Bioquímica..... | 46 |
| 4.4. | Genótipo APOE..... | 47 |
| 4.4. | Separação e Quantificação de <i>small-dense</i> LDL: Lipoprint (Quantimetrix) e Daytona (Randox)..... | 47 |
| 4.5. | Doença Cardiovascular..... | 50 |
| • | A FH como factor de risco cardiovascular..... | 51 |
| • | Marcadores bioquímicos de risco cardiovascular..... | 51 |
| • | Lipoproteína(a) como factor de risco cardiovascular..... | 52 |
| 4.6. | Terapêuticas..... | 54 |
| 5. | Discussão dos Resultados..... | 56 |
| 5.1. | Caracterização da Amostra..... | 56 |
| 5.2. | Análise molecular..... | 56 |
| 5.2.1. | Alterações não descritas/Patogenicidade duvidosa..... | 57 |
| • | Caso índice 10098 (Família 513)..... | 57 |
| • | Caso índice 11215 (Família 619)..... | 58 |
| • | Caso índice 12037 (Família 670)..... | 59 |
| 5.2.2. | Alterações Em que foi comprovada a não patogenicidade..... | 59 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.3. Relações Genótipo-Fenótipo..... | 61 |
| 5.4. Genótipo APOE..... | 69 |
| 5.5. Estratificação e Quantificação das <i>small-dense</i> LDL: Lipoprint (Quantimetrix) vs. Daytona (Randox) | 70 |
| 5.6. Doença Cardiovascular (DCV)..... | 73 |
| • A FH como factor de risco cardiovascular | 74 |
| • Marcadores bioquímicos de risco cardiovascular | 75 |
| • Concentração plasmática de ApoB e rácio ApoB/ApoA-I..... | 76 |
| • Rácio não-HDL/HDL | 76 |
| • Concentração plasmática de sdLDL..... | 77 |
| • Concentração plasmática de Lipoproteína(a) | 77 |
| • Lipoproteína(a) como factor de risco cardiovascular..... | 78 |
| 5.8. Terapêuticas | 80 |
| 5.9. <i>Cascade screening</i> : importância, vantagens e limitações | 82 |
| 6. Conclusão e perspectivas futuras..... | 87 |
| 7. Bibliografia..... | 88 |
| Anexos | 94 |
| Anexo I - Valores séricos do perfil lipídico normal, de risco moderado e de risco elevado para o desenvolvimento das DCVs, para a população em geral. | 95 |
| Anexo II - Critérios de <i>Simon Broome</i> para diagnóstico clínico de Hipercolesterolemia Familiar. | 96 |
| Anexo III – Modelo de Questionário, adaptado do “ <i>Simon Broome Heart Research Study</i> ”, que é preenchido pelo médico assistente, e uma declaração de consentimento informado que é assinado por cada indivíduo que participa no estudo. | 97 |
| Anexo IV - <i>Daytona Rx</i> : composição dos reagentes utilizados, absorvância e intervalos de referência para sdLDL e apolipoproteínas em estudo..... | 98 |
| Anexo V - Soluções Stock e soluções de trabalho | 99 |
| Anexo VI - Reagentes utilizados na extracção de DNA e respectivo volume utilizado. | 101 |
| Anexo VII - Sequência dos <i>primers</i> (oligonucleótidos iniciadores) utilizados, temperaturas de hibridação e tamanho da região amplificada por PCR (amplificação por reacção da polimerase). .. | 102 |
| Anexo VIII - Sequência dos <i>primers</i> utilizados, temperaturas de hibridação e tamanho da região amplificada na técnica dHPLC. | 104 |
| Anexo IX - Sequência dos <i>primers</i> utilizados, temperaturas de hibridação e tamanho da região amplificada na sequenciação automática | 105 |
| Anexo X - Sondas utilizadas em MLPA | 106 |
| Anexo XI - Caracterização molecular e bioquímica da amostra de indivíduos (índex e familiares) estudados. | 107 |
| Anexo XII - Caracterização bioquímica da amostra de indivíduos estudados por tipo de mutação.. | 114 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1.1 - factores que influenciam o desenvolvimento da doença cardiovascular. | 1 |
| Tabela 1.2 - características das lipoproteínas humanas. | 5 |
| Tabela 1.3 – hiperlipidemias primárias: diagnóstico e respectivo gene afectado | 13 |
| Tabela 1.4 - terapêuticas aplicadas em indivíduos com Hipercolesterolemia Familiar. | 21 |
| Tabela 3.1 - composição das misturas de reacção 1 e 2 necessárias à amplificação do gene APOE..... | 30 |
| Tabela 4.1 - distribuição da amostra, caracterização clínica e de hábitos de vida da amostra..... | 35 |
| Tabela 4.2 - famílias estudadas e respectivas alterações encontradas. | 36 |
| Tabela 4.3 - frequência de indivíduos com cada tipo de mutação. | 37 |
| Tabela 4.4 - Previsão <i>in silico</i> do efeito da substituição de aminoácidos nas alterações ainda não descritas como mutações associadas ao fenótipo de hipercolesterolemia familiar | 39 |
| Tabela 4.5 - caracterização bioquímica dos indivíduos em estudo com FH | 46 |
| Tabela 4.6 - frequências relativas dos alelos do gene APOE nos indivíduos com FH dos grupos pediátrico e adultos..... | 47 |
| Tabela 4.7 – distribuição dos indivíduos da amostra pelos genótipos APOE no grupo pediátrico e no grupo dos adultos em índice e familiares com mutação. | 47 |
| Tabela 4.8 – comparação entre parâmetros bioquímicos, sem medicação e a presença de pelo menos um determinado alelo do genótipo APOE no grupo pediátrico e no grupo dos adultos com FH..... | 47 |
| Tabela 4.9 - idades médias dos indivíduos da amostra com FH distribuídas pelo tipo de perfil Lipoprint nos grupos pediátrico e adultos..... | 48 |
| Tabela 4.10 - relação entre perfil Lipoprint e concentração de c-sdLDL obtido pela técnica Lipoprint nos indivíduos com FH | 49 |
| Tabela 4.11 - relação entre perfil Lipoprint e concentração de sdLDL obtido pela técnica Daytona nos indivíduos com FH | 49 |
| Tabela 4.12 - relação entre tipo de perfil Lipoprint, medicação e concentração de sdLDL (mg/dL) nos indivíduos com FH. | 49 |
| Tabela 4.13 – relação entre os parâmetros bioquímicos por tipo de perfil Lipoprint no grupo pediátrico e no grupo adultos da amostra em estudo com FH, sem medicação. | 50 |
| Tabela 4.14 - relação entre os parâmetros bioquímicos por concentração de sdLDL no grupo pediátrico e no grupo dos adultos da amostra em estudo com FH, sem medicação. | 50 |
| Tabela 4.15 - diferenças observadas em diversos parâmetros bioquímicos entre indivíduos familiares com mutação causadora de FH e sem mutação causadora de FH..... | 51 |
| Tabela 4.16 - marcadores de risco cardiovascular e presença de doença cardiovascular nos indivíduos com FH..... | 52 |
| Tabela 4.17 - valores de Lp(a) em mg/dL nos grupos pediátrico e dos adultos com e sem hipercolesterolemia familiar. | 53 |
| Tabela 4.18 - valores de Lp(a) em mg/dL nos grupos pediátrico e dos adultos com e sem doença cardiovascular. | 53 |
| Tabela 4.19 – valores de Lp(a) em mg/dL nos grupos pediátrico e dos adultos com FH com e sem doença cardiovascular..... | 53 |
| Tabela 4.20 - valores de Lp(a) em mg/dL nos grupos pediátrico e dos adultos sem FH com e sem doença cardiovascular. | 53 |
| Tabela 4.21 - valores de Lp(a) em mg/dL nos grupos pediátrico e dos adultos sem DCV comparando a presença/ausência de doença cardiovascular nos familiares em 1º grau. | 53 |
| Tabela 4.22 - valores de Lp(a) em mg/dL nos grupos pediátrico e dos adultos sem FH e sem DCV comparando a presença/ausência de doença cardiovascular nos familiares em 1º grau..... | 54 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 4.23 - valores de Lp(a) em mg/dL nos grupos pediátrico e dos adultos com FH e sem DCV comparando a presença/ausência de doença cardiovascular nos familiares em 1º grau. | 54 |
| Tabela 4.24 - frequência de indivíduos índice e familiares dos grupos pediátrico e adultos com FH que tomam medicação e/ou fazem dieta. | 54 |
| Tabela 4.25 – número de indivíduos adultos com mutação e em medicação distribuídos pelos valores de colesterol total e colesterol LDL..... | 55 |
| Tabela I.1 - valores séricos de perfil lipídico normal, de risco moderado e de risco elevado, para indivíduos adultos (população em geral) | 95 |
| Tabela II.1 - critérios de Simon Broome para diagnóstico clínico de Hipercolesterolemia Familiar. | 96 |
| Tabela IV.1 - composição dos reagentes utilizados no daytona, absorvância aplicada e respectivos intervalos de referência. | 98 |
| Tabela VI.1 - volume de reagentes utilizados na extração de DNA por mL de sangue e por 2,5 mL de sangue. | 101 |
| Tabela VII.1 - sequência dos <i>primers</i> , temperatura de <i>annealing</i> e tamanho da região amplificada por PCR de cada um dos exões e promotor do gene LDLR..... | 102 |
| Tabela VII.2 - sequência dos primers, temperatura de <i>annealing</i> e tamanho da região amplificada por PCR dos fragmentos dos exões estudados do gene APOB..... | 102 |
| Tabela VII.3- sequência dos <i>primers</i> , temperatura de <i>annealing</i> e tamanho da região amplificada por PCR do exão 4 do gene APOE | 103 |
| Tabela VII.4 - sequência dos <i>primers</i> , temperatura de <i>annealing</i> e tamanho da região amplificada dos fragmentos de cDNA amplificados por PCR. | 103 |
| Tabela VIII.1 - sequência dos <i>primers</i> , temperatura de <i>annealing</i> e tamanho da região amplificada do exão 9 por dHPLC. | 104 |
| Tabela IX.1- sequência dos <i>primers</i> , temperatura de ligação e tamanho da região amplificada na sequenciação, para os vários exões do gene LDLR. | 105 |
| Tabela IX.2 - sequência dos <i>primers</i> , temperatura de ligação e tamanho da região amplificada na sequenciação, para os fragmentos dos exões estudados do gene APOB. | 105 |
| Tabela IX.3 - sequência dos <i>primers</i> , temperatura de ligação e tamanho da região amplificada na sequenciação, para o exão 4 estudados do gene APOE..... | 105 |
| Tabela IX.4 - sequência dos <i>primers</i> , temperatura de ligação e tamanho da região amplificada na sequenciação, para os exões 1, 2 e 3 do cDNA do gene LDLR. | 105 |
| Tabela X.1 - sequência e características das sondas utilizadas em MLPA (provenientes do kit) para estudo do gene LDLR..... | 106 |
| Tabela XI.1 - caracterização da amostra: resultado da caracterização molecular, idade de diagnóstico e caracterização clínica dos principais parâmetros bioquímicos estudados..... | 107 |
| Tabela XII.1 - caracterização bioquímica do grupo pediátrico por tipo de mutação..... | 114 |
| Tabela XII.2 - caracterização bioquímica do grupo dos adultos por tipo de mutação..... | 114 |
| Tabela XII.3 – caracterização bioquímica do grupo pediátrico comparando os tipos de mutação <i>Missense</i> e <i>Nonsense</i> | 115 |
| Tabela XII.4 – caracterização bioquímica do grupo dos adultos comparando os tipos de mutação <i>Missense</i> e <i>Nonsense</i> | 115 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.1 - mecanismo de aterogénese. | 3 |
| Figura 1.2 - representação esquemática da estrutura de uma lipoproteína. | 5 |
| Figura 1.3 – esquema simplificado do transporte de lípidos pelas lipoproteínas..... | 7 |
| Figura 1.4 - esquema representativo da via do receptor das LDL..... | 9 |
| Figura 1.5 - características estruturais da Lipoproteína(a). | 11 |
| Figura 1.6 - gene LDLR, proteína sintetizada e domínios proteicos. | 16 |
| Figura 1.7 - representação esquemática do mecanismo da deficiência familiar em apoB | 17 |
| Figura 1.8 - representação esquemática da PCSK9 e dos seus principais domínios. | 18 |
| Figura 1.9 - vias de actuação do PCSK9. | 18 |
| Figura 1.10 - locais de actuação dos principais fármacos utilizados em indivíduos com FH. | 22 |
| Figura 4.1 - gráfico representativo da frequência de indivíduos com e sem mutação na amostra estudada. | 37 |
| Figura 4.2 - família 619..... | 38 |
| Figura 4.3 - família 670..... | 38 |
| Figura 4.4 - família 390..... | 40 |
| Figura 4.5 - família 10..... | 41 |
| Figura 4.6 - família 579..... | 42 |
| Figura 4.7 - família 539..... | 43 |
| Figura 4.8 - família 289..... | 44 |
| Figura 4.9 - família 156..... | 45 |
| Figura 4.10 - gráfico representativo da distribuição dos indivíduos da amostra com base no seu perfil Lipoprint. | 48 |
| Figura 4.11 – exemplo de lipidogramas obtidos através da técnica Lipoprint..... | 48 |
| Figura 4.12 – gráfico representativo da frequência de indivíduos com FH e com doença cardiovascular e tipo de doença cardiovascular presente na amostra. | 50 |
| Figura 4.13 – gráfico representativo da distribuição dos indivíduos da amostra com base na sua concentração de Lp(a) plasmática..... | 52 |
| Figura 4.14 – gráfico representativo do número de índex adultos com e sem DCV distribuídos pelo sexo. | 52 |
| Figura 4.15 - diferenças entre parâmetros bioquímicos no grupo pediátrico e no grupo dos adultos com e sem medicação..... | 54 |
| Figura 4.16 - distribuição dos tipos de medicação nos indivíduos com mutação..... | 55 |

LISTA DE ABREVIATURAS

aa – Aminoácido

ApoA – Apolipoproteína A

ApoB – Apolipoproteína B

ApoC – Apolipoproteína C

ApoE – Apolipoproteína E

AVC – Acidente Vascular Cerebral

CI – Caso(s) índice

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar (do inglês *complementary deoxyribonucleic acid* [DNA])

c-LDL – Colesterol-LDL

c-HDL – Colesterol-HDL

CNV – Polimorfismo de variação do número de cópias (do inglês *Copy number variation*)

CPT – Tubo preparador de célula mononuclear.

CS – Teste em cascata (do inglês *Cascade Screening*)

c-sdLDL – Colesterol-sdLDL

CT – Colesterol Total

DCV – Doença Cardiovascular

dHPLC – Cromatografia líquida de alta pressão desnaturante

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)

EAM – Enfarte Agudo do Miocárdio

EGF – Factor de crescimento epidérmico (do inglês *epidermal growth factor*)

EPHF – Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

FH – Hipercolesterolemia Familiar (do inglês *Familial Hypercholesterolaemia*)

Exo – Exonuclease

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade (do inglês *High Density Lipoprotein*)

heFH – Hipercolesterolemia Familiar em heterozigotia (do inglês *heterozygous familial Hypercholesterolaemia*)

HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A *reductase*

IDL – Lipoproteína de densidade intermédia (do inglês *Intermediate-Density Lipoprotein*)

IMC – Índice de Massa Corporal (expresso em Kg/m²)

INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

Kb – Kilobases

kDa – KiloDaltons

LDL – Lipoproteína de baixa densidade (do inglês *Low Density Lipoprotein*)

LDLR – Receptor das lipoproteínas de baixa densidade (do inglês *Low Density Lipoprotein Receptor*)

Lp(a) – Lipoproteína(a)

M – Molar (mol/dm³)

ml – Mililitro (10⁻³)

MLPA – Do inglês *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*.

Mg²⁺ - Magnésio

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês *messenger RiboNucleic Acid*)

OMS – Organização Mundial de Saúde

pb – Pares de bases

PCR – Reacção em cadeia da polimerase (do inglês *Polimerase Chain Reaction*)

PCSK9 – Pró-proteína Convertase Subtilisina Quexina tipo 9 (do inglês *proprotein convertse subtilisin/kexin type 9*)

Primers – Oligonucleótidos iniciadores

RNA – Ácido Ribonucleico (do inglês *RiboNucleic Acid*)

rpm – Rotações por minuto

SAP – Fosfatase Alcalina de Camarão (do inglês *Shrimp Alkaline Phosfatase*)

sdLDL – Pequena e densa Lipoproteína de baixa densidade (do inglês *small-dense Low Density Lipoprotein*)

SNP – Polimorfismo de Nucleótido único (do inglês *Single nucleotide polymorphism*)

TBE – Ácido Tris/borato/EDTA

TG - Triglicéridos

U – Unidade de actividade de enzima.

VLDL – Lipoproteína de Muito Baixa Densidade (do inglês *Very Low Density Lipoprotein*)

v/v % - Percentagem volume/volume

p/v % - Percentagem peso/volume

μL – Microlitro (10⁻⁶)

°C – Graus Celcius

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Numa era em que a redução da mortalidade relacionada com as doenças infecciosas é cada vez menor e a esperança média de vida das populações cada vez maior, as doenças cardiovasculares (DCV), por sua vez, continuam a aumentar, sendo consideradas epidémicas devido à sua elevada prevalência. Representando uma das principais causas de morbilidade e mortalidade nos países desenvolvidos, incluindo Portugal, estas doenças estão associadas a elevados custos sociais.[1-2] Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2010, as DCVs foram responsáveis por cerca de 37% das mortes em todo o mundo, estimando ainda que em 2030, cerca de 23,6 milhões de pessoas poderão ser vítimas de DCVs.[2-5]

As DCVs são um grupo de doenças complexas e multifactoriais, que afectam o sistema circulatório, nomeadamente o coração e os vasos sanguíneos, sendo representadas por várias patologias, como o enfarte agudo do miocárdio, o acidente vascular cerebral (AVC) e a paragem cardíaca. Para além disso, as DCVs podem ainda provocar morte súbita. Cerca de 80% das DCVs observadas dizem respeito a enfartes agudos do miocárdio, acidentes isquémicos transitórios e AVCs isquémicos.[1]

Estas doenças resultam da interacção entre diversos factores que promovem uma evolução silenciosa da doença que se manifesta tardiamente, muitas vezes com consequências graves e irreversíveis. É preciso desta forma implementar estratégias de prevenção para evitar a propensão e aparecimento prematuro destas doenças.[6]

• Factores de Risco Cardiovascular

Um factor de risco cardiovascular é uma condição que, estatisticamente, parece estar associada ao aumento do risco de desenvolver uma determinada doença cardiovascular. Assim, a presença de um determinado factor de risco aumenta a *probabilidade* de desenvolver uma doença, porém, a ausência de factores de risco conhecidos como tal não invalida a possibilidade de desenvolver uma DCV.[6]

O aparecimento e desenvolvimento das DCVs tem, desta forma, a influência de diversos factores de risco, entre estes, os fixos, metabólicos e ambientais, bem como factores de protecção, listados na tabela 1.1, assim como da interacção entre os mesmos.

Tabela 1.1 - factores que influenciam o desenvolvimento da doença cardiovascular.

| Factores de risco | | | Factores de protecção |
|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Factores fixos | Factores Metabólicos | Factores Ambientais | |
| - Idade; - Sexo (hormonas sexuais); - Perfil genético | - Dislipidemias; - Obesidade; - Pressão arterial elevada - Diabetes; - Stress Oxidativo; - Lipoproteína a; - Fibrinogénio | - Hábitos tabágicos - Dieta desequilibrada - Consumo excessivo de álcool - Sedentarismo | - Colesterol HDL - Exercício físico - Estrogénio |

Adaptado de [7-9].

É importante compreender então que existem factores fixos, que não são modificáveis e, dessa forma, influenciam o desenvolvimento das DCVs. Quanto aos factores biológicos e ambientais, a sua influência é dependente da sua continuidade, tratando-se de uma relação “dose-resposta”. [7]

Relativamente aos factores fixos, a idade parece ser um dos factores mais preditivos no desenvolvimento das DCVs. De facto, parece que quanto mais avançada for a idade de um indivíduo, maior o seu risco cardiovascular, especialmente porque o aumento da idade está sempre associado ao aumento de outros factores de risco, como o sedentarismo e o aumento dos valores lipídicos. Já as hormonas sexuais parecem proteger as mulheres até à idade da menopausa, dado que o estrogénio parece estar associado a níveis superiores de colesterol-HDL, ao contrário dos androgénios que parecem aumentar o risco de desenvolvimento de DCVs. [7]

As DCVs podem resultar da interacção entre alterações em apenas um gene (doenças monogénicas) ou em mais do que um gene (doenças poligénicas), com factores ambientais, dificultando a determinação da sua causa. A Hipercolesterolemia Familiar, que irá ser referida em 1.4., é um exemplo de uma doença monogénica, sendo, por isso, mais simples de determinar ainda que o seu fenótipo seja modulado por outros factores de risco. [5-7]

A história familiar representa as contribuições e interacções únicas, genómicas e ecológicas que afectam o perfil metabólico da vida dos indivíduos de uma família, sendo a história familiar de DCVs um factor preditivo do risco cardiovascular de um indivíduo. Assim, na presença de factores de risco genéticos que não podem ser modificáveis é necessário reduzir o impacto de todos os outros factores de risco modificáveis. [5-7, 9]

Relativamente aos factores de risco metabólicos e ambientais, estes podem, na maioria dos casos, ser modificáveis, quer por alteração de estilos de vida, quer pela aplicação de terapêuticas. Geralmente estes factores interagem entre si, aumentando a predisposição para as DCVs, por exemplo, uma alimentação rica em gorduras saturadas pode conduzir ao aumento dos níveis de colesterol no plasma, promovendo dislipidemias, que, por si, também são um factor de risco para o desenvolvimento das DCVs. Também o sedentarismo, proporciona a obesidade que, por sua vez, pode conduzir a um aumento dos valores de LDL (lipoproteína de baixa densidade) ou ao desenvolvimento da hipertensão que, por sua vez, pode levar ao aparecimento de uma DCV. [7]

Para além dos valores de LDL e HDL (lipoproteína de elevada densidade), níveis elevados de Lipoproteína(a), que será referida em 1.3.2, tem sido associado como um factor risco cardiovascular emergente. Os valores desta lipoproteína são determinados maioritariamente por factores genéticos e independentes da maioria dos factores de risco, como a idade ou a dieta. [10]

As dislipidemias são um dos principais factores de risco para as DCVs uma vez que promovem a deposição de lípidos e outras substâncias na parede dos vasos sanguíneos (aterosclerose). Esta deposição, por sua vez, promove o bloqueio do fluxo sanguíneo até ao coração ou cérebro, levando a eventos agudos como enfartes agudos do miocárdio e a AVCs isquémicos. [4, 7]

1.1.1. ATEROSCLEROSE

A aterosclerose, considerada actualmente uma epidemia, é promotora de uma elevada taxa de morbidade e mortalidade nos países desenvolvidos. Esta é uma doença sistémica, inflamatória e crónica do sistema arterial, caracterizada pela redução do diâmetro das artérias, levando à redução do fluxo sanguíneo, desde as artérias até ao músculo cardíaco, ao proporcionar o aumento da resistência à passagem do sangue.[18]

Esta patologia desenvolve-se e progride durante anos, iniciando-se em idades jovens e de forma assintomática.[12] As manifestações clínicas surgem, na maioria dos casos, entre os 50 e os 70 anos de idade, ainda que, por vezes, possam ser detectadas em idades mais precoces, geralmente num estadio irreversível aquando o aparecimento de um acidente vascular cerebral (AVC), enfarte agudo do miocárdio (EAM) ou até mesmo morte súbita.[4, 12-13]

O desenvolvimento da aterosclerose é, desde o século XIX, associada à deposição de substâncias celulares e extracelulares na parede das artérias, nomeadamente colesterol e outros lípidos, tecido muscular liso, macrófagos, linfócitos, tecido conjuntivo, depósitos de cálcio e células espumosas (células derivadas de macrófagos que contêm colesterol livre e esterificado) que se acumulam formando placas de ateroma, num processo denominado aterogénese, representado na figura 1.1.[8]

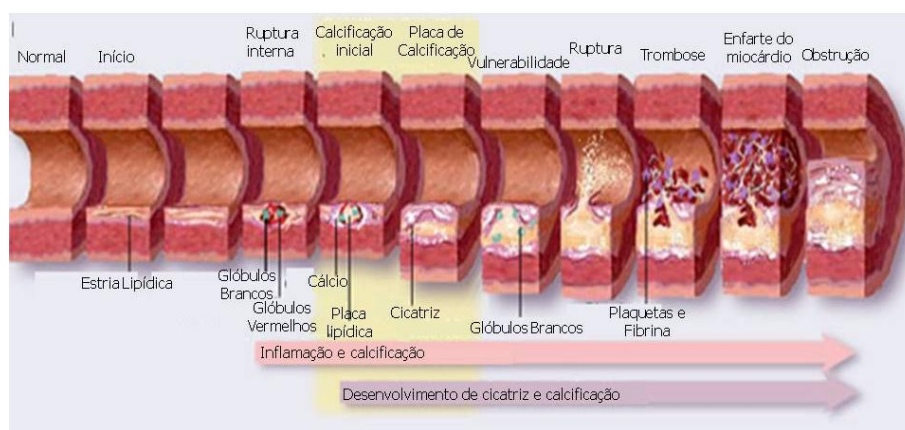


Figura 1.1 - Mecanismo de aterogénese. Adaptado de [14].

A aterogénese é um processo complexo caracterizado pelo aparecimento e desenvolvimento progressivo das lesões de aterosclerose, através da calcificação e formação de uma massa sobre a parede interior das artérias, geralmente de pequeno e médio calibre, levando a um endurecimento e estreitamento destas. Ainda que se pense que é a forte corrente sanguínea que ajuda a manter as artérias desobstruídas, nas zonas de fluxo complexo, onde existem bifurcações, curvaturas e junções tipo-T, tendem a formar-se remoinhos e, conseqüentemente infiltrar-se as substâncias referidas que, com o tempo, vão formando a placa de forma irregular. Estas placas apresentam elevada susceptibilidade para erosão, ruptura, seguida de trombose com libertação de coágulos na corrente sanguínea que, por sua vez, podem ser responsáveis pelo bloqueio de qualquer outro vaso, provocando embolias em diferentes órgãos, nomeadamente no cérebro, podendo desencadear um AVC. Quando este processo ocorre nas artérias coronárias pode ocorrer uma trombose coronária,

causa mais comum de um EAM. Sendo o miocárdio privado de oxigénio e, dependendo da duração, pode ocorrer uma lesão ou morte das células cardíacas.[12, 15]

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) tem sido associada ao desenvolvimento dos processos pro-aterotrombóticos, incluindo o desenvolvimento da disfunção endotelial, inflamação, formação de células esponjosas assim como as sequelas trombóticas seguidas de ruptura das lesões ateroscleróticas. Desta forma, as dislipidemias são um dos principais factores de risco responsáveis pelo desenvolvimento da aterosclerose e das suas consequências. Porém, é preciso referir que esta contribuição é complexa. De facto, a aterosclerose é, tal como a DCV, uma patologia multifactorial, estando associada a vários factores de risco como a hipertensão e os hábitos tabágicos e à interacção entre os mesmos. Desta forma, indivíduos com valores normais de LDL, mas com presença de outros factores de risco, podem igualmente desenvolver a aterosclerose e, consequentemente, uma DCV.[15-16]

1.2. PERFIL LIPÍDICO E LIPOPROTEÍNAS

Os lípidos, nomeadamente o colesterol, são essenciais para o bom funcionamento do organismo. Estão presentes em todos os tecidos, são constituintes das membranas celulares e ainda fundamentais para diversos mecanismos bioquímicos, sendo precursor de hormonas esteroides e ácidos biliares, para além de funcionarem como reservas energéticas.[17]

Em indivíduos sem alterações genéticas, cerca de 70% do colesterol é obtido por síntese celular no fígado (colesterol endógeno). O restante é proveniente da dieta (colesterol exógeno), absorvido pelo intestino e transportado para o fígado, onde é metabolizado para ser utilizado em tecidos adjacentes. O seu excesso é armazenado em tecidos adiposos e pode ser bastante nefasto para a saúde, nomeadamente no desenvolvimento da referida aterosclerose e suas consequências, através da sua acumulação em locais indesejados de onde dificilmente é removido. Desta forma, alterações ao perfil lipídico “normal” têm sido associados como factor de risco no desenvolvimento de DCVs.[11-12, 18] No anexo I, tabela I.1, encontram-se os valores séricos do perfil lipídico normal, de risco moderado e de risco elevado para o desenvolvimento das DCVs.

Os lípidos são moléculas orgânicas, insolúveis em água e, consequentemente, no sangue. No organismo, estas moléculas são transportadas através da sua ligação a lipoproteínas plasmáticas, circulando no organismo através das vias metabólicas destas. Assim, para ser transportado, o colesterol é esterificado com ácidos gordos e inserido no núcleo hidrofóbico das lipoproteínas. As lipoproteínas, cuja estrutura está representada na figura 1.2, dizem respeito a complexos de lípidos e proteínas (apolipoproteínas) variáveis em tamanho, densidade e concentração dos componentes lipídicos e proteicos.[19]

Desta forma, existem seis classes destes lípidos plasmáticos: as quilomicras, as VLDL (lipoproteínas de muito baixa densidade), as IDL (lipoproteínas de densidade intermédia), as LDL (lipoproteínas de baixa densidade), as HDL (lipoproteínas de elevada densidade) e a Lp(a) (Lipoproteína a).[19, 21]

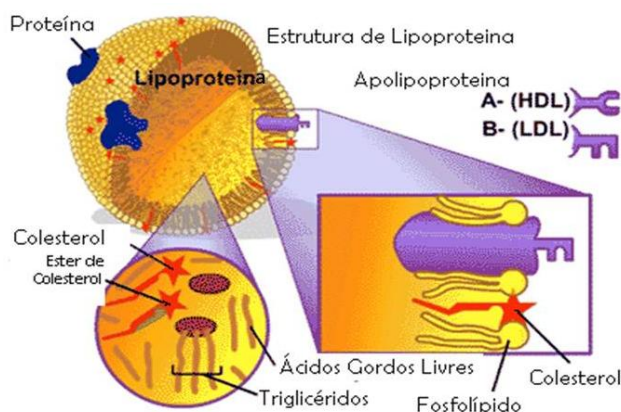


Figura 1.2 – representação esquemática da estrutura de uma lipoproteína. Adaptado de [20].

Estas lipoproteínas apresentam ainda diferentes funções, determinadas pelo seu ponto de síntese. A sua composição lipídica e o seu conteúdo em apolipoproteínas são igualmente variáveis, tal como se pode observar na tabela 1.2.[17, 19, 22]

Tabela 1.2 - características das lipoproteínas humanas.

| | Quilomicras | VLDL | IDL | LDL | HDL | Lp(a) |
|-----------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Densidade (g/mL) | <0,95 | 0,95-1,006 | 1,006-1,019 | 1,019-1,063 | 1,063-1,210 | 1,040-1,130 |
| Pelo Molecular (Daltons) | 0,4-30x10 ⁹ | 5-10x10 ⁶ | 3,9-4,8x10 ⁶ | 2,75x10 ⁶ | 1,8-3,6x10 ⁵ | 2,9-3,7x10 ⁶ |
| Diâmetro (nm) | >70 | 25-70 | 22-24 | 19-23 | 4-10 | 25-30 |
| Razão lípido-proteína | 99:1 | 90:10 | 85:15 | 80:20 | 50:50 | 75:25-64:36 |
| Principais lípidos transportados | Triglicéridos exógenos | Triglicéridos endógenos | Triglicéridos endógenos e ésteres de colesterol | Ésteres de colesterol | Fosfolípidos | Ésteres de colesterol e fosfolípidos |
| Apolipoproteínas | A-I B-48 C-I C-II C-III E | B-100 C-I C-II C-III E | B-100 E | B-100 | A-I A-II E | (a) B-100 |
| Fontes | Intestino | Fígado | Catabolismo das VLDL e quilomicras | Catabolismo das VLDL | Catabolismo das VLDL e quilomicras: fígado e intestino | Fígado |

Adaptado de [17, 23]

1.2.1. APOLIPOPROTEÍNAS

As apolipoproteínas auxiliam a estabilização e a solubilização das lipoproteínas presentes em circulação. No metabolismo lipídico, permitem a manutenção da integridade estrutural das lipoproteínas, actuam como cofatores enzimáticos e ainda como ligandos para os receptores celulares das lipoproteínas.[23]

As apolipoproteínas C-I (apoC-I), C-II (apoC-II) e C-III (apoC-III), tal como indicado na tabela 1.2, encontram-se nas quilomicras e VLDL. A apoC-II apresenta um importante papel na activação da enzima *Lipoproteína Lipase* (LPL) nos capilares dos adipócitos, músculo-esquelético, cardíaco e tecidos mamários, permitindo a libertação de ácidos gordos nestes tecidos. A apoC-III parece ter a função inversa, inibindo a actuação desta enzima.[19]

A apolipoproteína B (apoB) existe nas formas apoB-100 e apoB-48, ambas o resultado da tradução do mesmo gene estrutural, sendo a primeira o produto completo da tradução do gene APOB e constituído por 4563 aminoácidos (aa) e a segunda por 2180 aa, resultante de uma modificação pós-transcricional do mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) da apoB-100.[17]

As LDL, devido à presença de apoB-100 na sua composição, são reconhecidas pelos receptores das LDL (LDLR) que estão presentes em tecidos hepáticos e extra-hepáticos. As LDL são removidas da circulação através da sua internalização com os seus receptores hepáticos (LDLR) nestes tecidos, sendo ainda responsáveis pela captação e transporte de colesterol, para tecidos e órgãos extra-hepáticos, seguindo-se a internalização e hidrólise destas lipoproteínas e consequente libertação do colesterol transportado, de modo a que este possa realizar as suas funções nestes órgãos. Alterações na apoB, assim como no seu receptor celular (LDLR), são causas de Hipercolesterolemia Familiar, que se irá referir em 1.4.[12, 22, 24-26]

As apolipoproteínas A-I (apoA-I) e A-II (apoA-II) são constituintes das HDL. A apoA-I é sintetizada no fígado e no intestino e actua como cofactor para a lecitina colesterol:aciltransferase (LCAT, *lecithin-cholesterol acyltransferase*), sendo responsável pela esterificação do colesterol livre nas partículas de HDL. Encontram-se ainda envolvidas no transporte reverso do colesterol uma vez que são o ligando da cassette *ATP-binding* (ABCA1, *ATP-binding cassette protein 1*) – transportador que promove o efluxo de colesterol livre e fosfolípidos das células.[17,19]

A apolipoproteína E (apoE) está presente nas quilomicras e quilomicras remanescentes, nas VLDL, nas IDL e também nas HDL, sendo essencial na formação das VLDL e quilomicras. Esta apolipoproteína desempenha um papel importante no metabolismo do colesterol e dos triglicéridos, mediando a remoção do colesterol através da sua ligação ao LDLR, que reconhece esta apolipoproteína como acontece com a apoB. O estudo dos polimorfismos do gene APOE, que se irá referir em 1.3.1., possibilita também estratificar o risco para as DCVs, já se conhecendo associações entre os seus polimorfismos e os níveis de lipídicos plasmáticos em circulação e, por sua vez, o desenvolvimento de DCVs.[17, 22]

Por fim, a apolipoproteína a (apo(a)), componente da Lipoproteína(a) é estruturalmente diferente das outras apolipoproteínas, sendo hidrofílica e constituída por estruturas repetidas em *loop* denominadas *kringles* que contêm entre 77 a 79 aminoácidos (aa) e ligadas por regiões de 26 a 36 aa. Para além disso, a apo(a) está ligada por pontes de dissulfureto a uma molécula apoB e o seu peso molecular é variável, tendo em conta o número de repetições das *kringles* que pode variar de 12 a 50. A Lipoproteína(a) tem sido associada a um elevado risco cardiovascular, como se irá referir em 1.3.2., pelo que valores plasmáticos elevados desta lipoproteína podem ser responsáveis por uma maior probabilidade de desenvolver uma doença cardiovascular.[21, 27-29]

1.2.2. SUBFRAÇÕES LIPOPROTEICAS: *SMALL-DENSE LDL*

Cada uma das classes de lipoproteínas referidas apresenta subfracções caracterizadas pelas diferenças existentes no seu tamanho, na sua densidade e na sua composição química.[24]

As LDL apresentam uma grande heterogeneidade a nível do seu tamanho e densidade, sendo estas subfracções denominadas de LDL-1 a LDL-7 variando de tamanho de maior e menos denso para menor e mais denso respectivamente. As LDL de menor tamanho e maior densidade são denominadas sdLDL (*small dense LDL*) e são uma característica distintiva das dislipidemias. Estas parecem apresentar um maior potencial aterogénico, tendo sido recentemente identificadas como marcadores de risco das DCVs. Por esta razão é muito importante o seu controlo.

O maior potencial das subfracções mais pequenas e densas tem sido associado à sua maior capacidade de penetrar a parede arterial, com a sua menor afinidade para os receptores das LDL, com o seu maior tempo de meia-vida no plasma e com a sua menor resistência ao stress oxidativo, comparativamente às LDL de dimensões superiores.[24-25]

Assim, para além de estudar o perfil lipídico de um indivíduo, o estudo das subfracções de LDL pode ser útil na escolha da melhor terapia de redução de lípidos e de protecção contra as DCVs.[25]

1.2.3. VIAS METABÓLICAS DAS LIPOPROTEÍNAS

As vias metabólicas das lipoproteínas são complexas. Considera-se que existem quatro vias tendo em conta a sua função, reguladas e direccionadas pelas respectivas fracções proteicas: a via exógena, a via endógena, a via intracelular do LDLR (receptor das LDL) e, por fim, a via do transporte reverso.[19] Na figura 1.3 encontra-se um esquema simplificado do transporte dos lípidos pelas lipoproteínas.

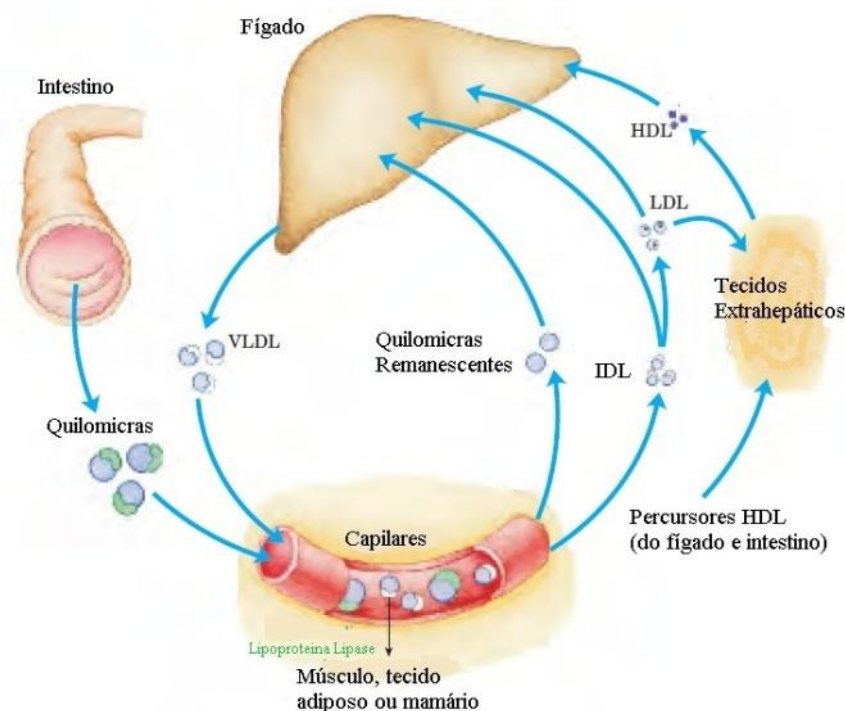


Figura 1.3 – esquema simplificado do transporte de lípidos pelas lipoproteínas. Os lípidos provenientes da dieta são compactados em quilomicras e o seu conteúdo é libertado para os adipócitos e tecidos musculares pela acção da enzima LPL, durante o seu transporte nos capilares (via exógena). Os lípidos endógenos são transportados até aos tecidos adiposos e musculares pelas VLDL que são gradualmente convertidos em LDL à medida que perdem apolipoproteínas aquando da libertação dos lípidos que transportam (Via endógena). As LDL são responsáveis pelo transporte do colesterol para tecidos extra-hepáticos ou pelo retorno ao fígado. O fígado absorve as LDL, VLDL remanescentes e quilomicras remanescentes por endocitose mediada pelo receptor das LDL. (Via do receptor das LDL). O excesso de colesterol nos tecidos extra-hepáticos é transportado pela HDL até ao fígado, onde é convertido a ácidos biliares (Via do transporte reverso). Adaptado de [19]

Na via exógena, os triglicéridos e o colesterol provenientes da dieta são processados no lúmen intestinal, absorvidos e inseridos nas células epiteliais intestinais em quilomicras remanescentes. Após a sua entrada na circulação, estas partículas adquirem a apoE e apoC, nomeadamente apoC-II, das HDL circulantes. A apoC-II, dada ser cofactor da enzima LPL, promove a hidrólise de triglicéridos a ácidos gordos que podem ser armazenados no tecido adiposo ou ser utilizados como fonte energética. Durante a lipólise, o excesso de fosfolípidos e lipoproteínas são transferidos das quilomicras para as HDL, levando a que percam gradualmente a afinidade para as apo-C que acabam também por ser transferidas para as HDL. As quilomicras ricas em triglicéridos tornam-se remanescentes, enriquecidas em ésteres de colesterol, e são retiradas da circulação sanguínea por receptores hepáticos (receptores de quilomicras remanescentes) que reconhecem a apoE na sua superfície. Após internalização por endocitose, o colesterol e triglicéridos são hidrolisados e podem ser utilizados na formação de ácidos biliares, ser incorporados em lipoproteínas sintetizadas de novo ou ser esterificados e armazenados no hepatócito.[21-22]

Na via endógena, os lípidos transportados são de origem hepática. Estes lípidos podem ser triglicéridos sintetizados a partir de hidratos de carbono e ácidos gordos ou colesterol através da sua biossíntese *de novo*, quando o proveniente da dieta não é suficiente, pelo aumento da actividade da enzima HMG-CoA *reductase*. [22] Nesta via, os ácidos gordos em excesso são esterificados no fígado, formando triglicéridos que são compactados com colesterol e ésteres de colesterol, fosfolípidos, apoB-100, apoE e apoC, formando VLDL nascentes que entram nas vesículas do aparelho de Golgi e depois, por exocitose, são libertadas para a corrente sanguínea. Já em circulação adquirem apolipoproteínas C adicionais das HDL sendo depois hidrolisadas pela enzima LPL, levando ao retorno desta apolipoproteína para as HDL, sendo as VLDL convertidas a VLDL remanescentes que podem ser captadas pelos receptores LDL no fígado ou podem sofrer hidrólise e ser convertidas em IDL. Estas últimas, por sua vez, possuem moléculas apoE na sua superfície, podendo igualmente ser removidas de circulação pelos receptores LDL presentes no fígado.[22]

A via do receptor das LDL é responsável pela remoção das LDL do plasma pelos receptores das lipoproteínas de baixa densidade (LDLR) presentes nas membranas celulares dos hepatócitos, permitindo manter a homeostase intracelular de colesterol.[22, 30]

Como representado na figura 1.4, este receptor reconhece a apoB, presente na superfície das LDL. O complexo LDLR:ligando é internalizado em vesículas de claterina, através de interações com a proteína adaptadora do receptor das LDL (LDLRAP-1).[17, 21-22] Durante a internalização, estas vesículas perdem a camada de claterina e fundem-se, transformando-se em endossomas, por abaixamento do pH e, por isso, a LDL se dissocia do seu receptor. A apoB é também degradada a pequenos péptidos e aminoácidos e os ésteres de colesterol do núcleo das partículas das LDL são hidrolisadas, libertando o colesterol livre. O LDLR, por sua vez, é reciclado para a superfície celular. A acumulação do colesterol livre no interior do hepatócito proporciona a inactivação da expressão de genes envolvidos na síntese de colesterol e do receptor das LDL.[30-31]

Regra geral, dois terços do colesterol-LDL (c-LDL) são removidos através deste metabolismo. Porém, a restante que continua em circulação, é altamente susceptível a modificações, tais como

oxidação, através da interacção com espécies reactivas de oxigénio, e/ou agregação e, neste caso, deixam de ser reconhecidas pelos receptores membranares. Após a sua modificação, as LDL são reconhecidas por receptores *scavenger* dos macrófagos, despoletando uma resposta inflamatória por parte destes, que, por sua vez, pode levar ao desenvolvimento de peróxidos e facilitar a acumulação de ésteres de colesterol. Os macrófagos ao fagocitarem estas partículas transformam-se em células espumosas, componente principal da placa aterosclerótica. Para além disso, as LDL oxidadas parecem inibir a migração das células endoteliais, mecanismos essenciais para o restabelecimento da integridade vascular, bem como o aumento da produção de factores de crescimento do endotélio vascular.[18, 22, 32]

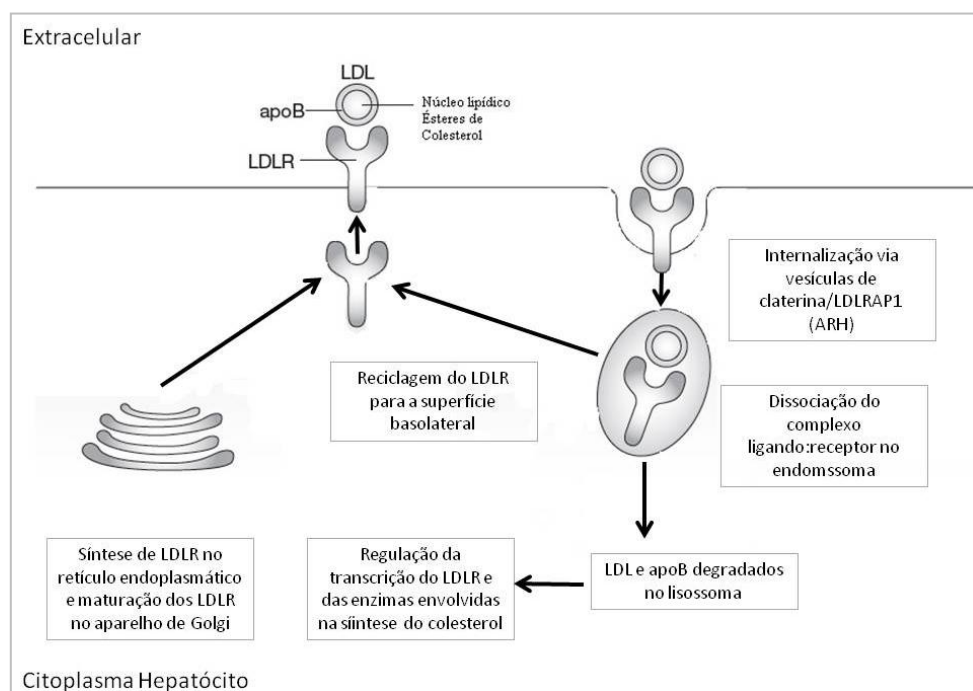


Figura 1.4 - esquema representativo da via do receptor das LDL (descrição no texto). Adaptado de [30]

A via do transporte reverso, por sua vez, envolve as HDL, permitindo que o colesterol que não é metabolizado nos tecidos periféricos seja transportado até ao fígado para ser excretado. As HDL captam colesterol livre, esterificando-o pela acção da enzima lecitina colesterol acil-transferase, na presença da apoA-I, seu cofactor, e depositando-o no fígado onde pode ser eliminado através da biliar. Assim, as HDL actuam de forma anti-aterogénica. Para além disso, contêm ainda uma enzima antioxidante sérica, a paraoxonase, que auxilia na inibição da oxidação das LDL.[12, 18, 32]

As principais lipoproteínas responsáveis pelo transporte do colesterol são as HDL e as LDL que transportam cerca de 20% e 70% do colesterol em circulação, respectivamente. Os efeitos antagónicos destas duas lipoproteínas permitem compreender que a manutenção do perfil lipídico nos valores desejáveis depende de um equilíbrio entre estas duas moléculas, sendo crucial para o bom funcionamento e manutenção da homeostase do organismo, prevenindo o desenvolvimento da aterosclerose e das suas consequências.[21]

1.3. FACTORES GENÉTICOS QUE INFLUENCIAM O APARECIMENTO DAS DCVs

1.3.1. POLIMORFISMOS DO GENE APOE

O gene APOE (NM_000041.2) está localizado no cromossoma 19q13.2 e consiste em 4 exões e 3 intrões, num total de 3597 nucleótidos, produzindo um polipéptido de 299 aminoácidos, a apolipoproteína E, maioritariamente produzida no fígado.[23]

Este gene contém dois polimorfismos comuns nas posições 112 e 158 da sequência proteica, que resultam na alteração do aminoácido traduzido. Estas isoformas são originadas pela alteração em apenas um nucleótido (SNP – *single nucleotide polymorphism*) que podem originar três alelos diferentes, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$. Estes alelos são transmitidos de forma codominante, produzindo, respectivamente, três isoformas da proteína, E2 (cisteína/cisteína), E3 (cisteína/arginina) e E4 (arginina/arginina). Desta forma, cada isoforma possui diferentes propriedades estruturais e funcionais, nomeadamente na sua ligação ao receptor celular LDLR.[36] Estes alelos apresentam frequências variáveis entre as populações, existindo seis genótipos: E2/E2, E3/E2, E3/E3, E4/E4, E4/E2 e E4/E3, sendo o genótipo mais comum o E3/E3.[23]

Os polimorfismos do gene APOE têm influência no metabolismo de outras lipoproteínas, nomeadamente a LDL. Desta forma, parecem influenciar o desenvolvimento de dislipidemias, na medida em que podem promover alterações dos níveis de colesterol total e dos triglicéridos em circulação no plasma.[23, 33-34]

O estudo dos polimorfismos do gene APOE possibilita, assim, estratificar o risco para as DCVs, já se conhecendo associações entre os seus polimorfismos e os níveis lipídicos no soro e, por sua vez, o desenvolvimento de DCVs.[17, 23, 35]

Alguns polimorfismos têm sido associados a maiores ou menores níveis de LDL e APOB no plasma. De facto, a isoforma $\epsilon 4$ parece gerar uma proteína cuja afinidade da apoE para o LDLR é quatro vezes superior, interferindo com a regulação normal dos mesmos, promovendo ainda uma remoção mais eficiente das VLDL e de IDL que contêm esta isoforma. Estas alterações, associadas à remoção preferencial de VLDL em relação à remoção de LDL por esta isoforma, proporcionam um aumento das LDL presentes no plasma que, desta forma, podem contribuir para um maior risco de desenvolvimento de DCVs.[23, 35] Por outro lado, indivíduos portadores do alelo $\epsilon 2$ aparentam ter concentrações inferiores de colesterol total e c-LDL, quando comparados com indivíduos portadores do alelo $\epsilon 3$ mas, por vezes, apresentam valores elevados de triglicéridos, especialmente em homozigotia.[34-36]

1.3.2. LIPOPROTEÍNA (A)

A lipoproteína(a) (Lp(a)) é uma lipoproteína plasmática que consiste numa partícula de LDL com uma molécula de apoB-100 e uma apolipoproteína adicional, apolipoproteína(a) [apo(a)], ligadas por pontes de dissulfureto (figura 1.5).[37]

Como já referido, a apo(a) é estruturalmente diferente de todas as outras apolipoproteínas, sendo hidrofílica, rica em hidratos de carbono e com carga eléctrica. Para além disso, apresentam estruturas repetidas glicosiladas tridimensionais, denominadas *Kringles* IV, tipo 2 (KIV-2). Estas

estruturas contêm entre 77 a 79 aminoácidos (aa) e estão ligadas por regiões que apresentam 26 a 36 aa.[27-29]

O valor recomendado desta lipoproteína, inferior a 50 mg/dL [38], é importante, uma vez que apresenta funções como reparar danos celulares e promover a regeneração celular, reestruturar a parede de vasos sanguíneos, bem como promover a coagulação sanguínea. Ainda que os mecanismos em que actua não estejam totalmente elucidados, parece que valores elevados desta lipoproteína estão associados ao desenvolvimento da aterosclerose sendo, independentemente da idade, dieta, actividade física, sexo, entre outros, um factor de risco cardiovascular.[37-38]

Os valores de Lp(a) são uma característica genética, variando entre populações mas, num determinado indivíduo, mantêm-se relativamente constantes durante a sua vida.[39-41] Para além disso, a Lp(a) é sintetizada de forma independente das outras lipoproteínas ricas em triglicéridos, sugerindo assim que a sua concentração é independente da dieta e determinada a nível da sua síntese.[39, 42]

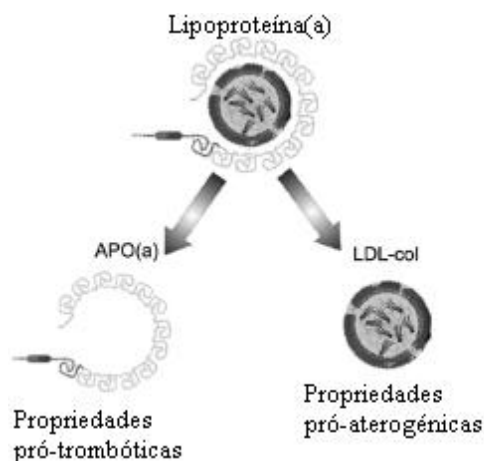


Figura 1.5 - características estruturais da Lipoproteína(a). A lipoproteína(a) consiste numa lipoproteína de baixa densidade (LDL-col) covalentemente ligada a uma apolipoproteína(a) (apo(a)). Adaptado de [41]

A Lp(a) é codificada pelo gene LPA (NM_005577.2), localizado no cromossoma 6q26, apresenta hereditariedade autossómica e elevada heterogeneidade no seu peso molecular. Já foram descritos vários polimorfismos do gene LPA, incluindo substituições de um único nucleótido (SNPs – *single nucleotide polymorphisms*) e diferentes tipos de polimorfismos de repetição, como CNVs (*copy number variations*), que podem explicar a heterogeneidade observada.[43]

O tamanho da apo(a) está relacionado com o número de repetições do domínio KIV-2 que podem variar de 5 a 50, determinando assim o número de cópias de *kringles*. Desta forma, a apo(a) pode variar de 200 a 800 kDa e este polimorfismo parece contribuir com 40 a 70% da variação observada nas concentrações de Lp(a).[39, 44] Este é o polimorfismo mais comum deste gene, porém, diversos SNPs já têm sido associados às alterações na concentração desta lipoproteína.[41, 43]

A concentração plasmática de Lp(a) parece ser inversamente proporcional ao seu peso molecular. Assim, ainda que de uma forma não linear, apo(a)s de menor peso molecular estão associadas a maiores concentrações de Lp(a), proporcionando um maior risco cardiovascular.[40]

A semelhança entre a Lp(a) e a LDL sugere que o teor de colesterol é semelhante também, podendo aumentar o risco para o desenvolvimento de aterosclerose. Outra hipótese refere-se ao facto de o gene LPA ser homólogo ao gene do plasminogénio, tendo a apo(a) cerca de 80% de homologia com o plasminogénio. No entanto, o domínio protease da apo(a) não pode ser activada pelo activador do plasminogénio, sendo cataliticamente inactiva.[44-45] A Lp(a) pode, assim, conduzir a uma deficiência em plasmina, promovendo uma maior probabilidade de ocorrer uma trombose.[41, 43, 46]

A Lp(a) apresenta, desta forma, potencial trombogénico e aterogénico, aumentando a trombose, debilitando a trombólise, conduzindo provavelmente à estenose, oclusão e eventos cardiovasculares devido à ruptura da placa aterosclerótica.[46]

Existem também evidências de que quanto menor for o tamanho da apo(a), maior a sua patogenicidade, nomeadamente pela sua capacidade de ligação aos fosfolípidos oxidados através da sua ligação à lisina e interacção com a fibrina. Para além disso, o seu potencial trombogénico parece aumentado, devido a uma maior capacidade de inibição da actividade da plasmina. Por último, apresentam ainda uma maior capacidade de actuar sinergeticamente com as LDL e LDL oxidadas.[29, 44, 47]

Segundas as normas internacionais para o controlo das dislipidemias [38], as concentrações plasmáticas de Lp(a) devem ser determinadas sempre em pessoas com elevado risco de desenvolver uma doença cardiovascular, como é o caso de um portador de hipercolesterolemia familiar, ou quando existe história familiar de doenças cardiovasculares prematuras.

1.4. DISLIPIDEMIAS

As dislipidemias podem ser definidas como alterações da função dos lípidos e/ou do perfil lipídico (ver tabela I.1, anexo I). O seu desenvolvimento pode estar relacionado com a predisposição genética do indivíduo (dislipidemias primárias), com a presença de outras doenças como a diabetes *mellitus* ou doenças do foro renal (dislipidemias secundárias) ou ainda com factores ambientais como a utilização de determinados medicamentos e até mesmo o sedentarismo e o tipo de alimentação (dislipidemias ambientais). A interacção entre todos estes factores é também preditiva no seu desenvolvimento.[26, 38, 48]

As dislipidemias podem ser classificadas como hiperlipidemias ou hipolipidemias, caso se tratem de aumentos ou reduções dos níveis lipídicos no plasma, respectivamente. Do ponto de vista da medicina cardiovascular, as hiperlipidemias podem ser mais preocupantes uma vez que, como já referido, o excesso de lípidos no plasma, nomeadamente LDL, propicia o desenvolvimento da aterosclerose, quer apenas pela sua presença, quer através da interacção com outros factores de risco cardiovasculares. Porém, a redução dos valores plasmáticos de HDL são igualmente um factor de risco para estas patologias. A classificação das dislipidemias primárias é variável, tendo em conta as alterações que são observadas no perfil lipídico dos indivíduos. Relativamente às dislipidemias secundárias, os mecanismos que as promovem são complexos e a melhor forma de prevenção e/ou

tratamento passa pela prevenção das patologias de origem e/ou por alterações no estilo de vida.[48-49]

As dislipidemias primárias são também chamadas dislipidemias familiares. Estas podem ser poligénicas (surtem pela interacção de diversos genes em diferentes *loci*) ou monogénicas (apenas um gene é responsável pelo seu fenótipo) e sendo autossómicas, podem apresentar transmissão dominante ou recessiva. Na tabela 1.3 encontram-se discriminados os diferentes diagnósticos de hiperlipidemias primárias monogénicas conhecidas. Devido à similaridade de fenótipos, as hipercolesterolemias autossómicas dominantes referidas são denominadas apenas por Hipercolesterolemia Familiar (FH), sendo a sua distinção conseguida através de uma análise genética tendo como base nos genes referidos na mesma.[48-33]

Tabela 1.3 – hiperlipidemias primárias: diagnóstico e respectivo gene afectado

| Transmissão | Diagnóstico | Gene Afectado |
|------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Autossómica dominante | Hipercolesterolemia Familiar (FH) | LDLR (receptor das LDL) |
| Autossómica dominante | Deficiência familiar em apolipoproteína B (FDB) | APOB (apolipoproteína B) |
| Autossómica dominante | Hipercolesterolemia Autossómica Dominante 3 (FH3) | PCSK9 (pró-proteína convertase subtilisina quexina tipo 9) |
| Autossómica recessiva | Hipercolesterolemia autossómica recessiva (ARH) | LDLRAP1 (AP - proteína adaptadora) |

Adaptado de [33].

1.4.1. HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR

A Hipercolesterolemia Familiar (FH) foi primeiramente descrita em 1938 por Carl Müller, como um defeito de nascença, caracterizado por elevados níveis de colesterol e que conduzia a problemas cardíacos em idade precoce.[50]

Sabe-se hoje que a FH é uma patologia de ordem genética, autossómica dominante, caracterizada pela presença de elevados níveis de colesterol-LDL (c-LDL) no plasma, devido a alterações no metabolismo lipídico. Estas lipoproteínas, como referido, transportam colesterol, podendo acumular-se nos tendões e artérias, causando manifestações externas como xantomas tendinosos (acumulação de lípidos nos tendões) e promovendo o desenvolvimento da aterosclerose que, por sua vez, potencia o aparecimento prematuro de doenças cardiovasculares.[51-53]

Por ser autossómica dominante, esta patologia afecta ambos os sexos de igual forma, expressando-se quer na forma heterozigota (apenas um alelo mutado), quer na forma homozigota (ambos os alelos mutados). A sua forma heterozigota (heFH – hipercolesterolemia familiar heterozigota) apresenta uma frequência de 1 em cada 500 indivíduos na maioria das populações europeias, estimando-se que em Portugal existam cerca de 20000 casos FH. A forma homozigota, por sua vez, é consideravelmente mais grave podendo levar à morte dos indivíduos ainda na primeira década de vida, apresentando, porém, uma frequência de 1 em 1 milhão de indivíduos.[30, 52, 54]

A caracterização clínica de FH baseia-se no perfil lipídico dos indivíduos em questão, na presença de xantomas e na história familiar de DCVs prematuras. O diagnóstico molecular é, contudo, crucial, uma vez que o perfil lipídico é influenciado por diversos factores, como a idade e o estilo de vida. Geralmente, em indivíduos com heFH detectam-se valores de colesterol total cerca de duas vezes superior aos valores em indivíduos normais, variando entre os 290 e 500 mg/dL. Já os indivíduos

homozigotos apresentam valores cerca de quatro vezes superiores, comparando com o perfil lipídico normal, variando entre 600 e 1000 mg/dL.[30, 53-56] No entanto, tal não tem sido observado na população portuguesa.[55]

A FH encontra-se sub-diagnosticada ainda que o seu diagnóstico seja essencial para a prevenção do desenvolvimento de DCVs prematuras, uma vez que a acumulação de colesterol ocorre desde o nascimento e o seu tratamento requer terapêuticas apropriadas. De facto, as recomendações para a população em geral diferem das recomendações para indivíduos com FH por apresentarem risco elevado para as DCV. Os valores de CT e c-LDL desejáveis para estes indivíduos devem ser inferiores a 170 e 100 mg/dL, respectivamente. Porém, valores plasmáticos de c-LDL inferiores a 70 mg/dL são aconselháveis, dado a maior redução do risco cardiovascular. Ainda que este valor seja difícil de atingir, é o valor recomendado em indivíduos com FH que já tenham sofrido uma DCV.[38, 54]

1.4.1.1. DIAGNÓSTICO DA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR

A hipercolesterolemia familiar é uma doença metabólica muito comum e, quando não medicados, os indivíduos afectados podem ser vítimas de enfartes agudos do miocárdio ou outras complicações cardiovasculares e até sofrer morte prematura. No entanto, existem terapêuticas eficazes para minorar os efeitos desta patologia, sendo o diagnóstico precoce da FH muito importante, como já referido.[57]

Ainda que não exista um acordo internacional na definição de critérios clínicos para o diagnóstico de FH, este apresenta a vantagem de ser mais económico pois depende apenas de exames físicos, do estudo do perfil lipídico e da história clínica de familiares.[54-56, 58]

Porém, através do diagnóstico clínico, existe uma grande percentagem de indivíduos com FH que não são identificados, principalmente crianças e indivíduos com fenótipos moderados.[54] De facto, as manifestações clínicas como xantomias e doenças cardiovasculares, geralmente, manifestam-se tardiamente, tendo pouca utilidade para o diagnóstico clínico, principalmente em indivíduos mais jovens. Através do diagnóstico clínico os indivíduos com FH são diagnosticados, geralmente, em idades mais avançadas. Para além disso, através deste diagnóstico não é possível distinguir qual a causa da hiperlipidemia observada.[53, 56]

O diagnóstico molecular é de extrema importância ao permitir não só confirmar o diagnóstico clínico, mas também detectar que tipo de mutação está presente e o risco associado. Ainda que patogénicas, determinadas mutações promovem fenótipos menos agressivos que, muitas vezes, passam despercebidos pelo diagnóstico clínico mas que, com o tempo, se não houver qualquer tipo de prevenção, podem conduzir a danos irreversíveis nas artérias o que, por sua vez, pode promover o desenvolvimento de DCVs.[54] O diagnóstico molecular permite ainda diferenciar a FH de outras causas de hipercolesterolemia, nomeadamente ambiental.[52, 55]

Conhecer qual a causa de FH é ainda importante na medida em que a resposta à terapêutica parece ser variável tendo em conta o gene afectado, o tipo de mutação e a interacção com outros factores de risco. Através do diagnóstico molecular é, assim, possível ao clínico escolher uma

abordagem mais apropriada para o controlo da FH e aconselhar os indivíduos afectados sobre de que forma podem reduzir/controlar o seu risco para as DCVs.[30, 55]

É ainda importante tentar compreender as relações existentes entre as alterações bioquímicas e moleculares, dado que um conhecimento aprofundado sobre os mecanismos e o desenvolvimento da FH pode permitir compreender se a fisiopatologia das doenças cardiovasculares depende, e de que forma, destas hiperlipidemias. Por sua vez, uma maior compreensão da dinâmica das DCVs e um maior número de casos de FH diagnosticados permite diminuir consideravelmente os custos em saúde, nomeadamente pela redução do número de indivíduos que desenvolvem DCVs prematuras. De facto, a necessidade de internamento e de aplicação de terapêuticas mais dispendiosas do que as terapêuticas preventivas, proporcionam elevados custos sociais e pessoais.[55, 59]

Por fim, mas não menos importante, a FH é mais facilmente diagnosticada quando existe a confirmação da presença de mutação num indivíduo numa família, sendo possível a realização de *cascade screening* que será referido seguidamente.[60]

1.4.1.2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

A base molecular da FH foi descoberta pelos investigadores Goldstein e Brown (prémio Nobel da Medicina em 1985).[50] Com os seus estudos foi possível compreender que, ao contrário do que se pensava, o mecanismo essencial da FH não é um aumento da síntese de colesterol, mas sim uma redução da depuração das LDL causada pela ausência total ou parcial de receptores das lipoproteínas de baixa densidade (LDLR), codificados pelo gene LDLR, sendo esta a causa mais frequente desta patologia.[30, 35, 54-55]

A observação de casos clinicamente diagnosticados com FH sem mutações no gene LDLR levou à pesquisa de mutações em outros genes, tendo sido possível observar que também mutações nos genes APOB (apolipoproteína B) e PCSK9 (pró-proteína Convertase Subtilisina Quexina tipo 9) podem produzir fenótipos similares aos observados em indivíduos com mutações no gene LDLR.[53-54] A maioria dos casos de FH são resultado da herança genética de um alelo afectado, proveniente de um dos progenitores, contudo, já foram identificadas algumas mutações *de novo*.[31]

O estudo molecular da FH não é, porém, 100% eficaz, na medida em que têm sido igualmente relatados casos de FH clinicamente diagnosticados que não apresentam mutações em nenhum dos genes referidos. Desta forma, é possível que existam mutações em outros genes igualmente envolvidos no metabolismo do colesterol ainda por identificar. De facto, esta patologia apresenta uma grande variabilidade fenotípica sendo o resultado não só dos níveis lipídicos, mas da combinação entre a genética, o metabolismo e diversos factores ambientais.[30, 53, 60]

1.4.1.3. GENES ENVOLVIDOS NA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR

- **Gene LDLR**

O gene LDLR (NM_000527.4), situado no braço curto do cromossoma 19 (19p13.1-p13.3), possui 45 kilobases (kb), 18 exões e codifica uma glicoproteína de superfície celular, constituída por 860 aminoácidos (aa). Esta proteína, de nome LDLR (receptor das LDL) é responsável pela remoção das

LDL do plasma por endocitose e degradação intracelular, como já referido. Esta proteína apresenta diversos domínios como se pode ver representado na figura 1.6.[30, 56]

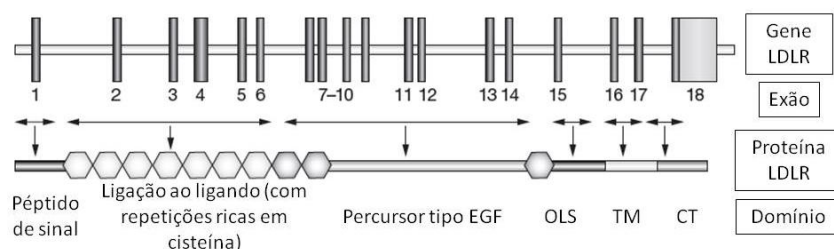


Figura 1.6 - gene LDLR, proteína sintetizada e domínios proteicos. Os exões estão representados pelas barras verticais. As setas na horizontal indicam que exões são responsáveis por determinado domínio. Legenda: EGF – factor de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor*); OLS – Açúcares glicosilados (*O-linked sugars*); TM – Transmembranar; CT – citoplasmático. Adaptado de [30].

Até à data conhecem-se cerca de 1500 mutações diferentes no gene LDLR, dispersas pelos 18 exões e na região promotora deste gene de diversos tipos, nomeadamente, rearranjos, mutações *nonsense*, inserções, deleções, assim como mutações *missense* e de *splicing* (nas regiões intrónicas do gene).[61-63] Têm sido também observadas variadíssimas alterações silenciosas e polimorfismos que não afectam a função da proteína. No entanto, já foram detectadas alterações silenciosas capazes de alterar o fenótipo na medida em que, apesar de não ocorrer alteração do aminoácido expresso naquela posição, origina-se alteração no local de *splicing*, alterando a proteína sintetizada.[61]

As diversas mutações estão distribuídas pelos vários domínios da proteína (figura 1.6) e, assim, resultam diferentes alterações na função da proteína, estando, por isso divididas em cinco classes. São também conhecidas mutações que são características de determinadas populações, provavelmente devido ao efeito fundador.[49, 53, 56]

- **Classificação dos tipos de mutação no gene LDLR**

As mutações do gene LDLR podem ser classificadas tendo em conta o efeito que promovem na função da proteína sintetizada. Desta forma, foram identificadas cinco classes de mutações no gene LDLR, com base nas alterações observadas no LDLR através de estudos biossintéticos e funcionais. Estas foram subdivididas tendo em conta as alterações que são observadas na proteína sintetizada.[62, 50]

Interrupções da sequência promotora e mutações *nonsense*, *frameshift* ou de *splicing* que originam alelos nulos (proteína não é sintetizada) foram agrupadas na **classe 1**. Na **classe 2** agruparam-se mutações que ocorrem nas regiões de ligação ao ligando e regiões precursoras do factor de crescimento epidérmico (EGF) que podem reduzir ou inibir totalmente o transporte do LDLR do retículo endoplasmático até ao aparelho de Golgi. Mutações que também afectam as regiões de ligação ao ligando e regiões precursoras de EGF mas que interferem com a ligação do LDLR à superfície celular foram agrupadas na **classe 3**. Na **classe 4** agruparam-se mutações dos domínios citoplasmáticos abrangendo ou não domínios membranares, inibindo a ligação dos LDLR à superfície celular. Por fim, na **classe 5** foram agrupadas mutações que inibem a libertação do LDLR dos endossomas, inibindo a sua reciclagem.[50, 56, 62]

Até à data, a maioria das mutações identificadas pertencem às classes 2 e 3, ocorrendo então nas regiões de ligação ao ligando e nas regiões precursoras do EGF do gene. De facto, na maioria dos países, incluindo Portugal, a grande percentagem das mutações encontradas neste gene, dizem respeito a mutações *missense*, isto é, em que ocorre a alteração de um par de bases, levando à alteração de um aminoácido.[64-66] Em Portugal, apenas cerca de 6% das mutações encontradas correspondem a grandes rearranjos do gene LDLR (delecções ou duplicações).[52]

As mutações encontradas no gene LDLR que originam a redução ou a ausência de receptores das LDL ou alterações da sua função, propiciam um aumento do c-LDL presente no plasma, que se irá depositar e acumular nas artérias, promovendo alterações no perfil lipídico e as suas consequências. Sendo as alterações a nível das LDLR a forma mais comum de FH, o diagnóstico molecular é altamente vantajoso para compreender se as alterações no perfil lipídico são, efectivamente, de ordem genética.[53, 56]

• Gene APOB

O gene APOB (NM_000384.2) está situado no braço curto do cromossoma 2 (2p24-p23), possui 29 exões, aproximadamente 43 kb e codifica duas isoformas da apolipoproteína B, apoB-48 e apoB-100, sendo esta última o único ligando através do qual as LDL se ligam aos LDLR. Desta forma, a apoB é um componente importante no metabolismo lipídico, como já referido.

Mutações no gene APOB originam proteínas apoB alteradas, ficando a sua ligação aos LDLR impedida/limitada. Indivíduos que apresentem estas mutações são diagnosticados com deficiência familiar em apolipoproteína B (FDB) (figura 1.7).[56] Para a FDB, até à data, apenas estão descritas quatro mutações dispersas em dois exões, 26 e 29, sendo a mutação pontual c.10580G>A (p.Arg3527Gln) no exão 26 deste gene a mais comum e que corresponde à substituição do aminoácido de arginina por uma glutamina.[55-56, 66] Esta mutação parece reduzir em cerca de 32% a capacidade de ligação da apoB-100 ao LDLR.[67]

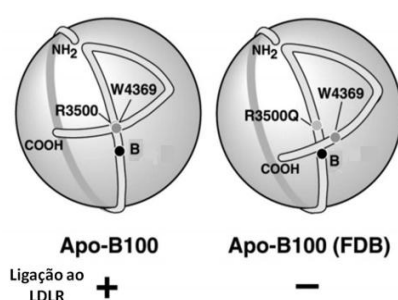


Figura 1.7 - representação esquemática do mecanismo da deficiência familiar em apolipoproteína B (FDB). A ligação ao LDLR é feita pela interacção de “B” com o receptor e para tal é necessária a interacção entre a arginina R3500 e o triptofano W4369. Quando existe uma mutação, como a R3500Q, dá-se uma alteração na conformação da proteína, nomeadamente no C-Terminal conduzindo a uma oclusão do local B, que, por sua vez, altera a sua capacidade de ligação ao LDLR. Adaptado de [68]

Mutações no gene APOB promovem igualmente um aumento dos níveis plasmáticos de colesterol-LDL. Geralmente, o fenótipo de FDB é menos severo que o fenótipo originado por mutações no gene LDLR devido à penetrância dos alelos mutados do gene APOB ser inferior a 100%.[30] O diagnóstico clínico de ambas as patologias, é, porém, muitas vezes indistinguível.[53]

Até à data, foram identificadas poucas mutações funcionais neste gene.[62] Em Portugal, apenas 2% dos casos identificados com FH, foram diagnosticados com mutações no gene APOB.[52]

- **Gene PCSK9**

O gene PCSK9 (NM_174936.3) foi associado à FH em 2003. Este gene, situado no braço curto do cromossoma 1 (1p34.1-32), possui 12 exões, aproximadamente 25 kb e codifica pró-proteína Convertase Subtilisina Quexina tipo 9 (PCSK9) de 692 aminoácidos (aa) (figura 1.8).[69]

A PCSK9 é sintetizada como proPCSK9, de 74 kDa, que sofre um processamento autocatalítico no retículo endoplasmático para libertar um polipéptido de 14 kDa da zona N-terminal, resultando numa enzima de cerca de 540 aa, activa e capaz de sair do retículo endoplasmático.[69]

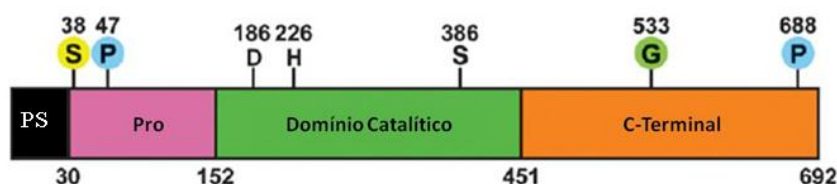


Figura 1.8 - representação esquemática da PCSK9 e dos seus principais domínios. Legenda: PS – péptido de sinal; Pro – propéptido; S – local de sulfatação pós-transcricional; P – locais de fosforilação pós-transcricional; G – local de fosforilação pós-transcricional; No domínio catalítico: D- Aspartato; H- Histidina S- Serina. Os números são indicadores de posições na proteína (aminoácidos). Adaptado de [70]

Esta proteína apresenta uma elevada expressão no fígado, rins e intestinos e parece ter funções a nível da homeostase do colesterol, sendo regulado negativamente por este. Para além disso, esta protease parece influenciar o número de receptores LDL expressos na superfície celular, através dos mecanismos descritos na figura 1.9, nomeadamente através da ligação ao domínio EGF-A (*Epidermal Growth Factor-Like Repeat A*) das LDLR, induzindo a sua degradação.[53, 55, 69-70]

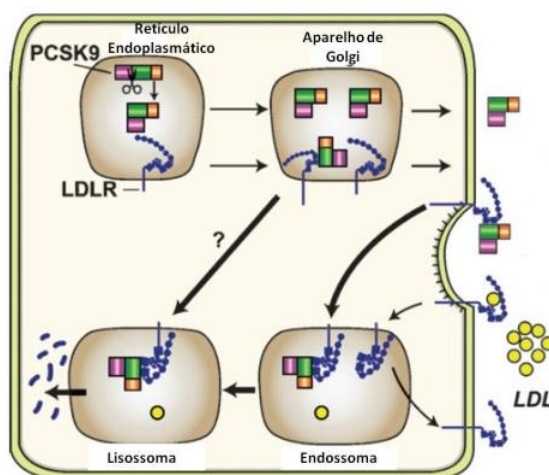


Figura 1.9 - vias de actuação do PCSK9. No retículo endoplasmático, o PCSK9, após sofrer o processamento auto-catalítico, o pró-domínio (roxo) associa-se ao domínio catalítico (verde) e este complexo é transportado via aparelho de Golgi e segregado para o plasma. O PCSK9 pode, assim, ligar-se aos LDLR na superfície celular, formando um complexo que é, depois, internalizado. O PCSK9 pode impedir a reciclagem do LDLR direccionando este receptor directamente para os lisossomas para ser degradado. Um outro mecanismo proposto (via representada por "?"), diz respeito à ligação do PCSK9 ao LDLR no retículo endoplasmático, direccionando-o para o lisossoma para ser degradado. Adaptado de [70]

O PCSK9 actua nos LDLR presentes na superfície celular, porém, supõe-se também que possa interferir na deslocação do LDLR na sua via secretória até à superfície dos hepatócitos.[69] Para além

disso, pensa-se que esta protease apenas seja capaz de actuar no fígado. É importante ainda referir que o processamento autocatalítico do PCSK9 não parece ser essencial para a degradação do LDLR, sendo-o, porém, para a sua activação e segregação.[69]

Mutações neste gene podem afectar o fenótipo de duas formas, podendo originar o ganho de função (mutações *missense*), sendo os níveis de LDLR reduzidos pela sua actuação, ou perda de função (mutações *nonsense*) e, neste caso, os LDLR não são degradados, podendo originar-se uma redução dos níveis plasmáticos de colesterol.[53]

Já foram descritas cerca de sete mutações *missense* neste gene, em indivíduos com hipercolesterolemia nos quais não se tinham detectado mutações nos genes LDLR e APOB, sendo esta a única justificação molecular para a causa genética de FH.[55, 65] Os mecanismos através dos quais o gene PCSK9 actua, promovendo hipercolesterolemia, não estão ainda totalmente elucidados.[53, 30, 71] No entanto, já foram efectuados estudos funcionais que permitiram observar que a presença das alterações já descritas, nomeadamente a alteração p.Asp374His, detectada em Portugal [52] promoviam a degradação dos LDLR e, conseqüentemente, o aumento dos níveis de CT e c-LDL.[71]

1.4.1.4. CASCADE SCREENING

Como já referido, o diagnóstico clínico da Hipercolesterolemia Familiar é efectuado através do estudo do perfil lipídico e da história clínica de familiares. A confirmação do diagnóstico clínico é efectuada através do estudo molecular dos genes responsáveis por esta patologia. Porém, o estudo molecular completo é relativamente moroso e dispendioso.[72]

Devido à alta prevalência de FH entre familiares (50% nos familiares de primeiro grau) para o estudo da FH é comum a realização de rastreio em cascata (CS – *cascade screening*). O termo CS é então utilizado para descrever o rastreio de membros de famílias, permitindo a identificação de indivíduos em risco para uma dada característica genética, nomeadamente a FH.[58, 72-74]

No CS, quando um indivíduo é diagnosticado clinicamente – caso índice (CI), o primeiro indivíduo de uma família a ser identificado como portador da patologia em questão – procede-se ao seu diagnóstico molecular para confirmar a presença da patologia. Após detecção da causa genética, procede-se à pesquisa da(s) mutação(ões) encontradas nos familiares em primeiro grau, e, se possível, a todas as outras gerações de familiares geneticamente relacionados.[38, 53, 60]

Através deste modelo é possível estudar várias gerações de familiares e criar uma árvore genealógica que permite, não só compreender o modelo de transmissão da doença, como identificar novos casos de FH, para além de possibilitar a confirmação de que as mutações encontradas no CI são, de facto, causadoras desta doença, através do estudo da sua co-segregação.[58, 73]

O sucesso do CS depende do número de indivíduos que se consigam estudar. Podem ser usados dois métodos para contactar os familiares: o contacto familiar, em que o CI informa os seus familiares após ele próprio ter sido esclarecido por profissionais especializados, e o contacto directo, em que são os clínicos e enfermeiros que contactam directamente os familiares, parecendo este último, ser o método mais eficaz que, porém, necessita sempre da autorização do CI. Existe, no

entanto, alguma controvérsia sobre qual o melhor método de contacto com os familiares, existindo várias condicionantes éticas e legais, como a confidencialidade dos indivíduos. Para além disso, é defendida a ideia de que antes de o clínico falar com os familiares, o CI deve ter oportunidade de falar com os mesmos, sendo que o contacto do clínico seria só efectuado após lhe ter sido comunicado que os familiares desejariam ser contactados.[72]

O CS não é, de todo, simples de implementar. De facto, em Portugal, segundo Medeiros *et al.* (2010) [52] até 2010 foi possível identificar apenas 2,02% do número estimado de indivíduos com FH. Estes resultados deveram-se, principalmente, à ausência de uma enfermeira de investigação que se pudesse deslocar para proceder às colheitas de sangue dos familiares provenientes de todo o país que não se podiam deslocar aos locais de colheita. Para além disso, a participação dos clínicos também não é a esperada, sendo que a comunicação com os familiares se torna condicionada. Em países como Espanha, País-de-Gales e Holanda, porém, o método CS está bem implementado, existindo uma acção activa na comunidade que passa pelo acompanhamento das famílias por parte de profissionais de saúde que se deslocam até casa dos doentes/familiares para proceder à colheita de amostras para a realização do estudo bioquímico e molecular.[57]

O CS é, ainda assim, um método mais rápido e eficaz na identificação de indivíduos que apresentem uma patologia hereditária, uma vez que é direccionado (ao contrário dos estudos populacionais), permitindo a detecção precoce de indivíduos que, poderiam nunca ser identificados por apresentarem um fenótipo menos agressivo, especialmente indivíduos do grupo pediátrico. Desta forma, são poupados imensos recursos.[54] Para além disso permite ainda a implementação de terapêuticas adequadas assim como alterações alimentares e de estilo de vida de modo a prevenir a morbilidade e mortalidade associadas às patologias causadas pela FH, promovendo também um menor impacto financeiro a nível social e pessoal.[52, 58, 73-75]

1.4.1.5. TERAPÊUTICA

O tratamento de indivíduos com hipercolesterolemia familiar (FH) consiste na tentativa de reduzir os níveis plasmáticos de colesterol-LDL.[50] De facto, uma redução de 40 mg/dL no valor de c-LDL parece estar associado a uma redução aproximada de 22% da mortalidade e morbilidade causada pelas DCVs.[38]

A resposta ao tratamento da FH é, no entanto, altamente variável. De facto, dois indivíduos com a mesma mutação podem responder de forma diferente ao mesmo tratamento. Para além disso, indivíduos com mutações no gene LDLR respondem de forma diferente a indivíduos com mutações noutros genes causadores de FH. A efectividade do tratamento também varia consoante o indivíduo em questão seja heterozigoto ou homozigoto.[26, 30] Na tabela 1.4 encontram-se enumerados os principais tipos de tratamentos utilizados, o seu efeito e a sua eficácia na redução dos valores de c-LDL.

É importante referir que a prevenção das doenças cardiovasculares em doentes com FH passa pela implementação da terapêutica e aconselhamento adequados, na tentativa de reduzir todos os outros factores de risco cardiovascular, como os hábitos tabágicos, o consumo de álcool e o

sedentarismo, conjuntamente com uma dieta equilibrada, baixa em ácidos gordos saturados e cujo consumo calórico seja o ideal para as necessidades do indivíduo, tentando manter a homeostase do organismo. Quando os factores ambientais são controlados, observa-se uma maior eficácia dos fármacos utilizados. As diferenças no efeito da terapêutica podem dever-se à dosagem utilizada. Porém, o não cumprimento da toma dos fármacos conforme sugerido pelos clínicos, por vezes devido ao custo dos medicamentos, pode também estar na origem da reduzida eficácia que é observada.[59, 76]

Tabela 1.4 - terapêuticas aplicadas em indivíduos com Hipercolesterolemia Familiar.

| Terapêutica | Efeito | Mecanismo de acção | Redução dos valores de c-LDL |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Estatinas e derivados | Aumento da actividade do LDLR | Inibição da acção de HMG CoA Reductase, levando a um aumento da captação de LDL via LDLR. | Homozigoto <10% Heterozigoto >25% |
| Ezetimiba e derivados | Redução da absorção de colesterol | Inibição da absorção de colesterol da circulação enterohepática | Homozigoto <10% Heterozigoto 10-25% |
| Resinas | Aumento da actividade do LDLR | Bloqueio da reabsorção de ácidos biliares; Activação da oxidação do colesterol a ácidos biliares; Aumento da captação de LDL via LDLR. | Homozigoto <10% Heterozigoto 10-25% |
| Ácido Nicotínico e derivados | Redução da Síntese de VLDL | Inibição da libertação de ácidos gordos dos adipócitos; Inibição da síntese e secreção das VLDL. | Homozigoto <10% Heterozigoto > 25% |
| Fibratos | Aumento da actividade dos LDLR; Diminuição dos níveis de VLDL | Activação da enzima LPL e inibição da HMG CoA reductase, aumentando o catabolismo de VLDL e da captação de LDL via LDLR. | Homozigoto <10% Heterozigoto 10-25% |
| Dieta baixa em colesterol/gorduras saturadas Redução da ingestão calórica | Aumento da actividade dos LDLR | Aumento da captação de LDL via LDLR; Redução da síntese de VLDL | Homozigoto <10% Heterozigoto 10-25% |
| LDL Aferese | Remoção das LDL em circulação | Circulação extracorporal | Homozigoto >25% Heterozigoto >25% |

Adaptado de [21, 26]

A redução dos níveis plasmáticos de c-LDL, idealmente, seria obtida através de um aumento do número de LDLR presentes na superfície celular dos hepatócitos. Isto ocorre quando existe uma redução dos níveis de colesterol no interior destas células, quer devido ao aumento da síntese e secreção de ácido biliar, quer pela inibição da síntese de colesterol endógeno. Desta forma, existem três fármacos de eleição para o controlo dos níveis plasmáticos de colesterol, as estatinas, a ezetimiba e as resinas, sendo este último fármaco geralmente utilizado em crianças e jovens antes de atingirem a puberdade. Os locais de actuação destes três fármacos estão representados na figura 1.10.[21, 50]

As estatinas são consideradas a primeira linha de terapia para a FH. A HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A *reductase*) é uma enzima da via metabólica do colesterol que actua nos hepatócitos durante a síntese de colesterol endógeno. Inibindo esta enzima é possível inibir a síntese do colesterol. Este fármaco actua por competição com a HMG-CoA reductase, levando a um aumento da regulação da síntese dos receptores LDL, pela redução de colesterol nos hepatócitos e, consequentemente, aumentando a remoção das LDL em circulação.[16, 50]

As estatinas parecem reduzir 40 a 54% do c-LDL em circulação em indivíduos com heFH, o que faz destes fármacos os eleitos na prevenção das DCVs.[69]

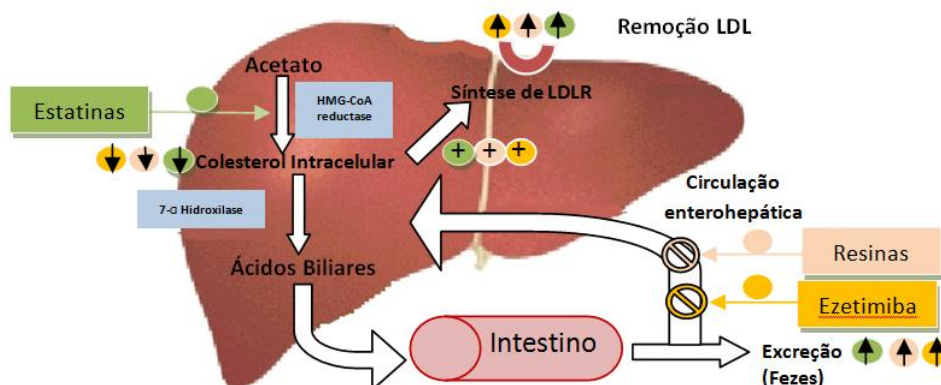


Figura 1.10 - locais de actuação dos principais fármacos utilizados em indivíduos com FH. A verde está representado o modo de acção das Estatinas, a salmão das resinas e a laranja da ezetimiba. Adaptado de [21]

Um outro tipo de terapêutica muito utilizada é a ezetimiba e seus derivados. Este fármaco liga-se às microvilosidades dos enterócitos, impedindo a absorção do colesterol e interferindo com a circulação enterohepática do colesterol. A efectividade deste fármaco prende-se na sua capacidade de diminuir a captação de colesterol proveniente da dieta e do colesterol biliar que, por sua vez, leva a um aumento dos LDLR hepáticos. Tem ainda a vantagem de ser efectiva a concentrações relativamente baixas e presume-se que possa inibir um transportador putativo do colesterol.[26]

Um outro fármaco, mais comumente utilizado em crianças com idade inferior a 8 anos são as resinas.[38, 59] Este tipo de fármacos interrompe a circulação enterohepática dos ácidos biliares por se ligarem a estes, impedido a sua reabsorção, aumentando desta forma a sua excreção e, por consequência, a excreção do colesterol. Para além disso, aumenta a síntese de ácidos biliares nos enterócitos que aumentam as necessidades de colesterol no interior destas células, proporcionando um aumento na produção de receptores LDL de forma a aumentar a interiorização de c-LDL e promover, assim, a sua remoção.[21] Porém, existem já evidências de que as estatinas não apresentam desvantagens em crianças que são preferenciais, dado a sua maior eficácia.[77]

Para indivíduos cuja hipercolesterolemia seja muito severa, não sendo a terapêutica medicamentosa suficiente, como é o caso de indivíduos homozigotos ou heterozigotos compostos e ainda indivíduos intolerantes aos fármacos referidos, efectua-se LDL aferese. Apesar de esta ser uma técnica invasiva, dispendiosa e morosa, é bastante segura e talvez a mais eficaz na diminuição dos níveis de c-LDL, sendo também capaz de diminuir os níveis de Lp(a). Este tratamento consiste na circulação extra corpórea do plasma a cada 1 a 2 semanas.[50]

Continua a existir, porém, uma grande necessidade de estratégias e terapêuticas adicionais para controlar a FH. Já têm sido feitos alguns avanços nesta área mas ainda se encontram em fase de estudo devido a possíveis efeitos secundários e problemas a longo prazo que podem advir da toma deste tipo de medicação.[78]

2. ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS DO PROJECTO

O Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar (EPHF) teve início em 1999, no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), no âmbito da tese de doutoramento da Doutora Mafalda Bourbon, tendo evoluído, até hoje, sob a sua coordenação.

O EPHF tem como principal objectivo a realização de um estudo epidemiológico que permita determinar a prevalência e distribuição da Hipercolesterolemia Familiar (FH) em Portugal e determinar qual a causa genética da hipercolesterolemia em indivíduos clinicamente identificados com FH, assim como realizar a identificação de novos familiares com FH. Este projecto pretende ainda aumentar o conhecimento sobre a influência e possível relação de outros factores que estejam interligados no desenvolvimento de cardiopatologias em doentes com esta patologia.[33]

A importância deste estudo prende-se não só na investigação e compreensão da FH e da fisiopatologia das DCVs, mas também na possibilidade de detectar precocemente indivíduos com FH que, consequentemente, estão em risco de desenvolver DCVs prematuras. Desta forma, este projecto permite a implementação de terapias e estilos de vida adequados que permitam reduzir a mortalidade e morbilidade derivada destas patologias.

Neste contexto, o presente trabalho apresenta como principais objectivos:

- 1) Realizar o método de *Cascade screening* através da caracterização molecular de familiares de casos índice já identificados com Hipercolesterolemia Familiar, permitindo, deste modo, aumentar o número de casos FH diagnosticados.
- 2) Proceder à genotipagem do *APOE* de forma a tentar compreender que relações existem entre a presença de um determinado alelo e as concentrações dos lípidos plasmáticos.
- 3) Caracterizar bioquimicamente os casos índice e respectivos familiares com FH. Para além dos parâmetros comumente avaliados, pretende-se estratificar e quantificar outros factores de risco cardiovascular emergentes como as sdLDL e a Lipoproteína(a) nestes indivíduos.
- 4) Executar uma correlação entre o genótipo e o fenótipo de FH. Desta forma pretende-se compreender de que forma o fenótipo FH é modulado e ainda estratificar o risco cardiovascular destes indivíduos. Para tal, pretende-se comparar o perfil bioquímico de indivíduos com e sem mutações nos genes responsáveis por esta patologia. Nos indivíduos com FH, pretende-se ainda determinar qual a influência de outros marcadores bioquímicos de risco cardiovascular, nomeadamente, as referidas sdLDL e Lipoproteína(a).
- 5) Por fim, pretende-se compreender a influência das terapêuticas como modeladoras do fenótipo FH de forma a determinar a sua efectividade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. RECRUTAMENTO DOS DOENTES

3.1.1. CRITÉRIOS E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

A inclusão no estudo de casos índice com suspeita clínica de FH requer que se observem os critérios de Simon Broome para FH confirmada ou possível, referidos na tabela II.1, anexo II.[79-80] Após a confirmação pelo estudo molecular da presença de FH, os respectivos familiares são incluídos no estudo pelo método de *Cascade Screening*.

No âmbito do *cascade screening*, neste trabalho estudaram-se então 45 famílias, perfazendo um total de 194 indivíduos, 45 casos índice (cujo estudo molecular já havia sido feito) e 149 familiares.

Para cada CI e respectivos familiares são colhidas amostras de sangue em tubo EDTA (10 mL CI e 5 mL familiares) para extracção de DNA e 5 mL em tubo seco para obter soro para o estudo bioquímico. Estas amostras podem ser recolhidas no INSA ou ser enviadas por correio. Quando foi necessária a realização de estudos funcionais pediu-se uma nova amostra ao médico assistente, 8 mL de sangue em tubo CPT – tubo preparador de célula mononuclear (citrato de sódio).

Para o estudo bioquímico foram efectuadas as seguintes alíquotas: (a) 1 mL para a Química Clínica para as determinações bioquímicas de rotina (referidas em 3.2.1), (b) 2 alíquotas de 50 µL para Lipoprint e (c) 2 alíquotas de 500 µL para Daytona cuja finalidade se prende na determinação de outros lípidos plasmáticos específicos que não são realizados como rotina, referidos em 3.2.2 e 3.2.3, respectivamente. As alíquotas (b) e (c) foram conservadas a -80°C até posterior utilização.

A cada amostra vinha anexado um questionário adaptado do “*Simon Broome Heart Research Study*”, preenchido pelo médico assistente e uma declaração de consentimento informado assinado por cada indivíduo que participou no estudo (anexo III). Para crianças com idade inferior a 18 anos, o consentimento informado foi assinado pelos respectivos pais.

Todas as amostras recolhidas foram identificadas através da atribuição de um número e todas as informações relativas a cada indivíduo foram registadas numa base de dados confidencial.

3.2. ESTUDO BIOQUÍMICO

3.2.1. ANÁLISES DE ROTINA

As determinações dos valores de Colesterol Total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicéridos, apolipoproteína AI, apolipoproteína B e lipoproteína (a) foram realizadas num auto analisador (Cobas Integra 400 plus [Roche]) através de métodos enzimáticos e colorimétricos. Estas determinações foram realizadas na Unidade Laboratorial Integrada (Química Clínica) Instituto Nacional de Saúde Dr.º Ricardo Jorge (INSA).

3.2.2. LIPOPRINT® - SEPARAÇÃO DE DIFERENTES SUBFRACÇÕES LIPOPROTEÍCAS, INCLUINDO AS SDLDL

Um componente lipídico que com forte influência no desenvolvimento das DCVs são as *small-dense* LDL. Para a sua determinação foi efectuado o método *Lipoprint*®, uma técnica de elevada resolução que se baseia na separação das subfracções das lipoproteínas com base no seu tamanho e identificadas com base na sua mobilidade (Rf). O resultado pode ser utilizado como medida de avaliação de distúrbios no perfil lipídico.

Esta técnica utiliza um gel não-desnaturante e linear (sem gradiente) que permite a separação das fracções e subfracções das lipoproteínas no soro, com base do seu tamanho, sendo as moléculas mais pequenas as que migram mais (tabela 1.2) e a sua mobilidade é calculada utilizando a fracção VLDL como referência (rf=0).

Esta técnica foi efectuada segundo as recomendações do fabricante (Quantimetrix Corporation), cujo kit consiste em tubos de gel de poliacrilamida, corante lipofílico (*Loading Gel*) e um tampão específico. O Kit disponibiliza também controlos (*liposure* – Quantimetrix Corporation) preparados a partir de amostras de soro de humanos e são fornecidos liofilizados. Para serem utilizados, cada controlo é diluído em 0,5 mL de água estéril desionizada e bidestilada e depois aliquotado e conservado a -80°C até a sua utilização. Este controlo gera um perfil lipoproteico normal, permitindo validar a estratificação das lipoproteínas no soro das amostras em estudo.

Para a realização desta técnica, primeiramente é necessário remover o tampão que envolve os tubos de gel poliacrilamida, aos quais, posteriormente, se aplica 25 µL de amostra de soro (1 controlo e 11 amostras) e 200 µL de corante lipofílico que se liga proporcionalmente ao colesterol presente nas lipoproteínas. Com recurso a parafilme inverte-se o suporte, contendo os tubos com as amostras, aproximadamente 10 vezes, para homogeneizar as amostras e o corante. O suporte é depois colocado próximo de uma luz de preparação durante 30 minutos, permitindo assim a fotopolimerização do corante.

Segue-se uma electroforese durante 60 minutos a 3 mA por tubo e voltagem máxima de 500 V. Após a migração estar completa, os tubos são mantidos durante 30 minutos no escuro para estabilização, seguindo-se a digitalização (a fonte electroforética e digitalizador são fornecidos pela casa comercial) dos mesmos. Após digitalização, a área relativa das bandas de cada lipoproteína é determinada e multiplicada pela concentração de colesterol total da amostra, de modo a determinar a concentração de colesterol em cada banda, isto é, em cada fracção lipoproteica. Os valores de colesterol total (indicados obrigatoriamente pelo operador) têm de ser superiores a 100 mg/mL.

Amostras que apresentem predominantemente subfracções LDL-1 e LDL-2 são designadas “Padrão A” (normal), enquanto amostras que apresentem predominantemente subfracções mais pequenas e densas, LDL-3 a LDL-7, são designadas “Não indicativas de perfil A”, apresentando maior risco para as DCVs.[25] O *software* (*LipoWare analysis software*) associado à referida técnica origina as informações relativas à separação das diferentes fracções lipídicas, à quantificação de colesterol em cada subfracção, bem como qual o perfil correspondente de cada amostra através de um lipidograma.

3.2.3. DAYTONA Rx - AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE sdLDL E APOLIPOPROTEÍNAS

Através de um método espectrofotométrico automático, *Daytona Rx* (Randox), determinou-se as concentrações de sdLDL, apoE, apoA-II, apoC-II e apoC-III presentes no soro.

Esta técnica segue as recomendações do fabricante (Randox). Nesta técnica, as amostras de soro são colocadas no aparelho automático e são quantificadas através da aplicação de reagentes específicos, sendo apenas necessário indicar quais os parâmetros em estudo. Através do software que compõe o sistema, os resultados são automaticamente fornecidos sob a forma de relatório em que, para cada amostra, são discriminados os valores (em mg/dL) para cada parâmetro em estudo.

Para todos os parâmetros estudados, é utilizado um calibrador, que utiliza um método linear para calibrar as corridas. Para além disso utilizam-se controlos internos específicos para cada parâmetro, geralmente três níveis diferentes, que devem originar valores dentro da recta calculada pelo calibrador, permitindo que o método seja mais preciso e reprodutível. Os calibradores e os controlos são fornecidos com o kit.

Relativamente à quantificação da apoE, apoA-II, apoC-II e apoC-III, o método baseia-se no princípio da reacção entre uma amostra de soro contendo as proteínas referidas e anti-soro específico, formando-se um complexo insolúvel. Este complexo pode ser quantificado turbidimetricamente e, para esta reacção utilizaram-se dois reagentes: Reagente-1 (buffer Tris/HCl 100 mmol/L, pH 8,5) e Reagente-2 (anticorpo). Para cada apolipoproteína estudada existe um intervalo de valores de concentração, com um valor de precisão aceitável. Estes ensaios utilizam um cálculo linear e as concentrações são obtidas através de uma regressão linear ($Y=mX+b$).

A quantificação de sdLDL consiste em dois passos com princípios químicos. Primeiramente as lipoproteínas, excepto as LDL, são decompostas pela acção do reagente-1 que selectivamente reconhece as lipoproteínas. O colesterol que se liberta após a degradação destas lipoproteínas é degradado a água e oxigénio através de reacções enzimáticas. Os ésteres de colesterol são hidrolisados pela enzima colesterol esterase e depois oxidados pela enzima *colesterol oxidase*. Por fim, pela acção da enzima catalase, o peróxido de hidrogénio que se forma é decomposto a água e oxigénio. Num segundo passo, utiliza-se o Reagente-2 que permite a libertação do colesterol apenas das sdLDL que depois sofre reacções enzimáticas. A catalase é inibida pela azida de sódio e os peróxidos de hidrogénio produzidos pela reacção com a enzima colesterol esterase e colesterol oxidase, tornam-se vermelho-arroxeados. A quantificação de sdLDL (em mg/dL) é depois realizada através da medição da absorvância a 600 nm e calculada a partir da medida de absorvância e pela interpolação da curva de calibração.

No anexo IV, tabela IV.1, estão discriminados os reagentes utilizados e o comprimento de onda utilizado para a medição das concentrações, assim como os intervalos de referência (mg/dL) para cada um dos componentes em estudo.

3.3. ESTUDO MOLECULAR

O estudo molecular dos casos índice (CI) para a FH é realizado em três fases (I, II e III). Na Fase I pesquisam-se mutações nos 18 exões e promotor do gene LDLR bem como nos fragmentos pretendidos dos exões 26 e 29 do gene APOB. Esta fase é realizada através da amplificação dos fragmentos por reacção em cadeia da polimerase (PCR) seguida de sequenciação automática. Concomitantemente é também feita a identificação dos polimorfismos do gene APOE dos indivíduos em estudo. A Fase II é efectuada pela pesquisa de grandes rearranjos do gene LDLR através da técnica MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). A Fase III consiste no estudo molecular dos 12 exões do gene PCSK9 através de amplificação por PCR e sequenciação automática.

No caso específico deste trabalho, o estudo molecular dos CI já havia sido realizado, tendo sido apenas efectuada a pesquisa das alterações encontradas nos casos CI, nos respectivos familiares. Foi utilizada ainda a técnica dHPLC (cromatografia líquida de alta pressão desnaturante) para a pesquisa de alterações no exão 9 do gene LDLR. A análise dos polimorfismos do gene APOE foi realizada através da amplificação do fragmento deste gene que contém o exão 4, através de PCR utilizando o kit *PCR Extender System* (5Prime), seguido também de sequenciação automática.

De modo a verificar a patogenicidade de alterações no promotor de um gene, são realizados estudos funcionais a partir da sequenciação do cDNA. Assim, para a obtenção de RNA (ácido ribonucleico) é necessário efectuar o isolamento de células, seguida de extracção de RNA total de células mononucleares obtidas a partir de amostras de sangue periférico (8 mL) colhidos em tubo CPT, seguido de síntese de cDNA e amplificação por PCR para ser sequenciado. Estas amostras são processadas no dia em que são colhidas.

- **Extracção de Ácidos Nucleicos (DNA)**

Para a caracterização molecular foi primeiramente efectuada a extracção de DNA genómico de leucócitos de sangue periférico das amostras de sangue colhidos em tubos com EDTA (anti-coagulante), utilizando a técnica baseada no método descrito por D.K. Lahiri & Nurnberger, 1991.[81]

Neste método, o volume de cada reagente utilizado na extracção de DNA varia consoante o volume de sangue utilizado na extracção. A composição de todos os reagentes encontra-se no anexo V e o volume utilizado, na tabela VI.1 no anexo IV.

Primeiramente procede-se à lise dos glóbulos vermelhos com TKM X-100 (TKM 1+ 25 ml Triton X-100/L) e IGEPAL (detergente) (Sigma). Para tal, após homogeneização centrifugaram-se os tubos Falcon (15 ml) durante 10 minutos a 2200 rpm (centrifuga 5810R *Eppendorf*).

De seguida, realizou-se uma lavagem às células (*pellet* da centrifugação anterior) com TKM1 através da homogeneização e centrifugação a 1600 rpm por 10 minutos (centrifuga 5810R *Eppendorf*). Este passo é repetido até o *pellet* ficar branco.

Seguiu-se a lise dos núcleos dos leucócitos e consequente libertação do DNA com TKM-2 (10 mM Tris-HCL pH 7,6, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,4 M NaCl, 2 mM EDTA) e adicionou-se SDS 10% para posterior incubação durante 10 minutos a 55°C em banho de água (Grant Instruments) para desnaturação das proteínas.

Após a lise das membranas, realizou-se a desproteinização celular por desidratação e precipitação das proteínas (*salting out*) com NaCl 5M, ficando, após centrifugação durante 20 minutos a 13200 rpm (centrifuga 5415R, *Eppendorf*), o DNA genómico de elevado peso molecular em solução (sobrenadante). O sobrenadante é transferido para um tubo *Falcon* e o DNA é precipitado em Etanol Absoluto. O DNA, agora visível sob a forma de fibrilhas, é retirado do tubo *Falcon* com uma ansa e lavado com etanol a 70% de modo a remover os sais que possam estar presentes na amostra. Ainda na ansa, espera-se que o DNA seque ao ar, na vertical. Depois de seco, o DNA é rehidratado em tampão TE e conservado a 4°C para posterior amplificação.

Para validação da qualidade do DNA obtido aplicaram-se as amostras num gel de agarose a 1% (1x tampão TBE, ultrapure Lonza) e realizou-se a sua quantificação por espectrofotometria a 260 nm através do *software Nanodrop* (Nanodrop 1000 *spectrophotometer*, Thermo Scientific), aplicando 1 µL da amostra de DNA no aparelho.

- **Isolamento de Células e Extração de RNA**

Para o isolamento de células, primeiramente, centrifugaram-se os tubos CPT durante 10 minutos a 3500 rpm (centrifuga 5810R *Eppendorf*). De seguida, por decantação, transferiu-se o sobrenadante dos tubos CPT para um tubo *falcon* e centrifugou-se novamente durante 10 minutos a 1300 rpm (centrifuga 5810R *Eppendorf*).

Posteriormente procedeu-se à contagem de células e para tal juntou-se num *eppendorf* 1 µL da suspensão anterior e 9 µL de Trypan Blue (corante), sendo depois a amostra aplicada numa câmara de Neubauer e as células contadas num dos quadrantes da mesma. O número de células é dado pela fórmula: Número de células

Para extracção imediata do RNA, transferiu-se para um tubo *eppendorf* o volume de suspensão de células, dado pela fórmula _____, centrifugaram-se os tubos 10 minutos a 1300 rpm (centrifuga 5415R, *Eppendorf*) a 4°C.

Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 2 mL de FCS+10% DMSO (45 mL de FCS [soro fetal de bovino] + 5 mL DMSO) e aliquotou-se em dois criotubos.

A extracção de RNA é feita com recurso ao kit RNeasy Mini (Quiagen) e segue as recomendações do fabricante, permitindo obter até 100 µg de RNA total. O protocolo consiste em centrifugar o tubo do passo anterior e, após remoção do sobrenadante, ressuspender o *pellet* em tampão RLT + β-Mercaptoetanol 1% (10 µL Mercaptoetanol /1000 µL RLT), uma solução altamente desnaturante com isotiocianato de guanidina, e com a ajuda de uma seringa aspirou-se a amostra 10 vezes para lisar bem as células.

De seguida homogeneizou-se o lisado anterior com etanol a 70% e aplicou-se 700 µL da amostra numa coluna RNeasy (fornecida no kit) colocada num tubo colector. Centrifugou-se a 10000 rpm (centrifuga 5415R, *Eppendorf*), durante 30 segundos a 4°C e desprezou-se o eluído. Adicionou-se tampão RW1 (permite remover contaminantes, contendo guanidina) e centrifugou-se nas mesmas condições. Após desprezar o eluído adicionou-se mix DNase (permite eliminar o DNA presente na amostra) na membrana de sílica-gel da coluna RNeasy. Após deixar repousar durante cerca de 15 minutos adicionou-se novamente RW1. Após centrifugação em condições iguais às anteriores

transferiu-se a coluna para um novo tubo colector, adicionou-se tampão RPE (permite remover contaminantes) nas mesmas condições. Após desprezar o eluído voltou a adicionar-se tampão RPE e centrifugou-se a 10000 rpm durante 2 minutos (centrifuga 5415R, *Eppendorf*), transferiu-se a coluna para um novo tubo colector e repetiu-se a centrifugação mas agora apenas durante 1 minuto.

Após centrifugação transferiu-se a coluna para um novo tubo *eppendorf* e pipetou-se RNase *free water*, centrifugou-se a 10000 rpm durante 1 minuto a 4°C e desprezou-se a coluna. O RNA extraído (que ficou no tubo *eppendorf*) foi guardado a -80°C até posterior utilização para síntese de cDNA (ácido Desoxirribonucleico complementar).

- **Síntese de cDNA**

A síntese de cDNA, através da actividade da enzima *Transcriptase Reversa*, foi efectuada com recurso ao kit comercial TaqMan (Applied Biosystemas) e seguiu as recomendações do fabricante. Para tal, preparou-se uma mistura de reacção de volume final de 50 µL composta por 1 ng de RNA, tampão RT 10x, 0,1 mM de cada desoxinucleotidos (dNTPs: dATP, dGTP, dTTP e dCTP, 2,5 mM cada), 0,275 mM MgCl₂ (25 mM), 0,00125 mM de Oligo d(T)₁₆ (50 µM, 5 nmoles), inibidor de RNase e, por fim, 1,25 U/ µL de enzima Transcriptase Reversa.

A reacção ocorreu no termociclador (T3000, Biometra), consistindo nos seguintes passos: 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 48°C e 5 minutos a 95°C.

As amostras de cDNA foram conservadas a -20°C até posterior utilização.

- **Amplificação por Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Para cada CI, o promotor e os 18 exões do gene LDLR, os fragmentos pretendidos dos exões 26 e 29 do gene APOB, bem como os 12 exões do gene PCSK9 já haviam sido amplificados do DNA genómico, através da metodologia PCR. A cada amostra de familiares, foi feito o estudo molecular ao exão que apresentava mutação no respectivo CI. Foi ainda determinado o genótipo APOE dos casos índice e respectivos familiares.

A técnica PCR baseia-se num processo cíclico onde são aplicadas diferentes temperaturas e cuja finalidade se prende na amplificação do número de cópias de um determinado segmento de DNA. Esta técnica inclui três passos básicos: desnaturação, emparelhamento dos oligonucleótidos iniciadores (*primers*) – *annealing* - e extensão.[82]

A mistura de reacção para efectuar o PCR é composto pelo DNA da amostra, por dois *primers*, *Forward* e *Reverse*, que reconhecem a sequência que se pretende amplificar – para cada exão utilizam-se *primers* específicos -, tampão e Mg²⁺ (confere estabilidade à reacção; cofactor da enzima Polimerase), um mix de nucleótidos (dNTPs) e uma enzima DNA Polimerase (*Taq Polimerase*). A sequência dos *primers* utilizados assim como, as temperaturas de *annealing* para cada fragmento estudado e o tamanho da região amplificada encontram-se no anexo VII (tabelas VII.1 (*LDLR*), VII.2 (*APOB*) e VII.3 (*APOE*)).

O protocolo de reacção de PCR para amplificação dos fragmentos pretendidos dos exões 26 e 29 do gene APOB e dos 18 exões e promotor do gene LDLR, seguiu as recomendações do fabricante da enzima GoTaq Polimerase (Promega): a cada tubo de reacção adicionou-se 0,2 mM de cada

desoxinucleotido (dNTPs: dATP, dGTP, dTTP e dCTP, 100 mM, Bioline), tampão NH_4 (5x Promega), 1,5 mM de MgCl_2 (25 mM, Promega), 10 pmol de cada *primer* (100 pmol, Invitrogen), 1,25 U/ μL de *GoTaq Polimerase* (Promega), 100 ng de DNA genómico e água estéril bidestilada para perfazer o volume final de reacção de 25 μL . A amplificação do exão 3 do gene LDLR é efectuada utilizando a enzima *Taq Plantinum* (Invitrogen) e a cada tubo de reacção adicionou-se 0,2 mM de cada desoxinucleotido (100 mM, Bioline), tampão NH_4 (10x *Platinum*), 1,5 mM de MgCl_2 (50 mM, *Platinum*), 10 pmol de cada *primer* (100 pmol, Invitrogen), 0,8 U/ μL de *Platinum Polimerase* (Invitrogen), 100 ng de DNA genómico e água estéril bidestilada para perfazer o volume final de reacção de 25 μL .

O processo de amplificação foi realizado num termociclador (T3000, Biometra) e a reacção de PCR ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C durante 3 minutos, 35 ciclos compostos pelo passo de desnaturação a 94°C durante 45 segundos, seguido de emparelhamento dos *primers* a temperaturas entre 57-63°C, dependendo do exão que se pretende amplificar (anexo VII) durante 30 segundos e, por fim, extensão a 72°C durante 1 minuto. No fim, as amostras foram conservadas a 4°C até posterior sequenciação.

A genotipagem do *APOE* prende-se na determinação dos sítios polimórficos nos codões 112 e 158 do exão 4 deste gene, através da sua amplificação por PCR. Uma vez que as sequências que se pretendem amplificar são ricas em ligações GC (Guanina-Citosina), utilizou-se um Kit *PCR Extender System* (5Prime).

Segundo as recomendações do fabricante, para este PCR é necessária a realização de duas misturas de reacção distintas, descritas na tabela 3.1.

Tabela 3.1 - composição das misturas de reacção 1 e 2 necessárias à amplificação do gene *APOE*

| Mistura de reacção 1 | Mistura de reacção 2 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> - 10x <i>Tuning Buffer</i> (1x concentração final com 2,5 mM Mg^{2+}) - 20 pmol de cada <i>primer</i> (100 pmol, Invitrogen) - 50-100 ng de DNA alvo - água estéril bidestilada para perfazer um volume final de 15 μL por amostra | <ul style="list-style-type: none"> - 10x <i>Tuning Buffer</i> (1,6x concentração final com 4 mM Mg^{2+}) - 10mM de cada dNTP (100 mM, Bioline) - 0,5 U de <i>PCR extender Polymerase Mix</i> - água estéril bidestilada para perfazer um volume final de 10 μL por amostra. |

As condições de reacção para a amplificação foram as seguintes: no termociclador previamente aquecido a 98°C colocou-se a mistura de reacção 1 durante 30 segundos; retirou-se os tubos, colocando-se em gelo e adicionou-se 10 μL da mistura de reacção 2 a cada tubo. De seguida procedeu-se à desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos seguida de 38 ciclos de desnaturação a 95°C durante 20 segundos, emparelhamento dos *primers* a 58°C durante 10 segundos e extensão a 72°C com a duração de 5 minutos.

A amplificação do número de cópias do fragmento contendo os exões 1 a 3 de cDNA (3.3.3.) foi feita utilizando as condições referidas anteriormente, para a enzima *GoTaq* (Promega). Os *primers* utilizados, a temperatura de *annealing* e o tamanho do fragmento esperado estão também descritos no anexo VII (tabela VII.4). Este processo foi, igualmente, realizado num termociclador (T3000, Biometra) e a reacção de PCR ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, 37 ciclos compostos pelo passo de desnaturação a 95°C durante 45 segundos, seguido de

emparelhamento dos *primers* a 63°C, durante 1 minuto e 45 segundos e, por fim, extensão a 65°C durante 7 minutos.

Sempre que se efectuou uma amplificação por PCR realizou-se um controlo negativo, composto pela mesma mistura de reacção, mas ao qual não foi adicionado DNA, assegurando assim que não existiam contaminações dos reagentes.

- **Análise por electroforese em gel de agarose dos fragmentos de DNA amplificados**

Após amplificação por PCR, os fragmentos obtidos foram detectados por electroforese em gel de agarose.

A preparação do gel de agarose foi feita em 50 mL de tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 1x (TBE 10x ultrapure, Lonza) adicionando Agarose (Lonza) de modo a obter a concentração desejada – 1% para análise da integridade do DNA e 1,5% para visualização de produtos de PCR, exceptuando os fragmentos do gene APOE que, dado serem de baixo peso molecular, foram corridos num gel de 2% de agarose (75% Lonza; 25% Nusieve).

A solução foi aquecida no microondas durante aproximadamente 2 minutos. Após total dissolução da agarose no tampão adicionou-se 1 µL de SybrSafe (Invitrogen).

Para a análise de DNA genómico aplicou-se no gel uma solução de 5 µL de água, 1 µL do DNA extraído e 4 µL de Azul de bromofenol (Solução de deposição – anexo V). Para a análise de produtos de PCR aplicou-se uma solução de 6 µL de produto de PCR e 4 µL de Azul de Bromofenol. No gel foi ainda aplicado um marcador molecular PUC (Fermentas) (anexo V) que permite confirmar que o tamanho das bandas obtidas corresponde às esperadas.

A migração electroforética foi feita em tampão TBE 1x com recurso a uma fonte de voltagem (Bio-Rad Power Pac 3000), durante o tempo e na voltagem necessários à migração que permitisse observar as bandas esperadas, tendo em conta o tamanho do fragmento esperado.

Os géis foram depois visualizados através de um transiluminador LED que produz um pico de emissão nos 470 nm (*Safe Imager® blue light transilluminator, Invitrogen*) e os resultados registados sob a forma de fotografia, com recurso a uma máquina fotográfica digital (Nikon).

- **Cromatografia líquida de alta pressão desnaturante (dHPLC)**

O dHPLC é uma técnica de elevada resolução que permite detectar a presença de alterações num determinado fragmento de DNA. Esta técnica é realizada a partir de 10 µL de produto de PCR e baseia-se na aplicação de uma rampa de temperaturas que desce 1°C por minuto, desde os 98°C (temperatura de desnaturação) até aos 35°C, levando à formação de heteroduplexes quando duas cadeias de DNA – uma alterada e outra não alterada –, após desnaturação, voltam a hibridar. Assim, quando existe uma alteração num determinado fragmento do produto de PCR vai haver um *mismatch* entre as duas cadeias com formação de heteroduplexes que são eluídos após as duas correspondentes homoduplexes e são menos estáveis que estas, permitindo assim a sua detecção.

A separação dos ácidos nucleicos é realizada numa coluna C18 de fase reversa com enchimento não poroso de polistireno/divinilbenzeno (DNASepTM, Transgenomics). As heteroduplexes são eluídas com um gradiente linear formado por dois eluentes - A (0,1M Acetato de Trietilamina, pH 7,0,

Transgenomics) e B (0,1M Acetato de Trietilamina, pH 7,0, contendo 250 M de Aconitrilo, Sigma) – num fluxo constante de 0,9 mL/minuto e o DNA foi detectado a 260 nm.

A concentração inicial e final do eluente B foi ajustada para cada fragmento de modo a obter-se um tempo de retenção dos heteroduplexes entre 3 a 5 minutos e a sensibilidade do método é determinada pela temperatura de análise (temperatura à qual 80% do DNA está desnaturado) que é calculada pelo *Wavemaker Software*, Transgenomics, cuja optimização deve ser feita sempre com amostras controlo que possuam uma alteração já conhecida (controlo positivo) e amostras que se sabe que não têm alterações no exão em estudo (controlo negativo).

Para este trabalho apenas se realizou esta técnica para a procura de alterações no exão 9 do gene LDLR, dado que parece ser uma muito sensível e específica na detecção de alterações neste exão, como se irá discutir mais à frente. A temperatura de análise é de 62,5°C e a concentração de eluente B é de 57%B. Os *primers* utilizados estão descritos no anexo VIII, tabela VIII.1.

O dHPLC é realizado previamente à sequenciação para a detecção de alterações neste exão. Ainda que não seja utilizado como método de diagnóstico, dado apenas indicar a presença de alteração no fragmento em estudo, em complementaridade com a sequenciação automática torna-se importante, aumentando a fiabilidade dos resultados.[83]

- **Purificação dos produtos de PCR**

Antes de se proceder à sequenciação, realizou-se a purificação dos produtos de PCR, através da adição de uma combinação de Exonuclease e Fosfatase Alcalina de Camarão de nome ExoSAP-IT® (*Amersham Pharmacia Biotech*). Num tubo de 0,2 mL adicionou-se 2,5 µL do Produto de PCR e 1 µL de ExoSAP. No termociclador Biometra T3000, procedeu-se a um programa de variação de temperaturas, segundo as recomendações do fabricante, constituído num processo de incubação durante 15 minutos a 37°C, seguido de um passo de inactivação das enzimas a 80°C, também durante 15 minutos. Este processo permitiu a remoção de *primers* e nucleótidos que não tenham sido utilizados na reacção de PCR e ainda a remoção dos grupos fosfato das extremidades 5' das cadeias, impedindo a sua ligação a outras moléculas de DNA, sem degradar o produto amplificado.

Os produtos de purificação foram guardados a 4°C até posterior utilização.

- **Sequenciação automática dos produtos de PCR**

A sequenciação automática foi efectuada seguindo o método de Sanger.[84] Este método permite detectar variações nas sequências dos genes em estudo baseando-se na utilização de nucleótidos terminadores de cadeia (ddNTPs – di-desoxinucleotidos tri-fosfatos), que possuem uma molécula de Hidrogénio na extremidade 3' em vez de um grupo OH, impedindo assim que outro nucleótido (dNTPs - desoxinucleótidos tri-fosfato) se ligue, parando a reacção de extensão da cadeia. Os ddNTPs utilizados (seja N: A- Adenina, C – Citosina, G – Guanina ou T – Timina) estão marcados com fluorocromos de diferentes cores que permitem a sua detecção e posterior reconhecimento. Assim, através da presença de um *primer* e da actuação da enzima DNA Polimerase, ocorre o alongamento das cadeias. Para que se obtenham fragmentos com tamanhos diferentes, através da terminação prematura da extensão utiliza-se uma razão dNTPs/ddNTPs de aproximadamente

100/1.[82] No sequenciador, os vários fragmentos obtidos sofrem electroforese e a fluorescência emitida pelos ddNTPs destes mesmos fragmentos é detectada, aquando da sua passagem pelo detector. A ordem de passagem pelo detector é proporcionada pelo tamanho do respectivo fragmento, sendo que fragmentos menores são detectados primeiro.[84]

A reacção de sequenciação foi preparada segundo recomendações do fabricante - *Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems) - composta pelo produto de PCR purificado (1 µL), por água estéril (6 µL), pelo *primer* específico (1 µL) e por um mix de reacção *Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems) (2 µL) que possui dNTPs, ddNTPs, a enzima Polimerase e os tampões, necessários a este procedimento. A reacção de sequenciação foi realizada num termociclador (T3000, Biometra), nas seguintes condições: 96°C durante 30 segundos, 25 ciclos de desnaturação a 96°C durante 10 segundos, seguido de emparelhamento do *primer* a 58°C durante 5 segundos e extensão durante 4 minutos, a 60°C.

No anexo IX (tabelas IX.1 (*LDLR*), IX.2 (*APOB*), IX.3 (*APOE*) e IX.4 (*cDNA LDLR*)) encontram-se descritos todos os *primers*, temperaturas de *annealing* utilizadas e tamanho dos fragmentos esperados nas reacções de sequenciação para os diversos exões estudados.

Os produtos de sequenciação foram depois entregues à Unidade de Tecnologia e Inovação (INSA) para serem sequenciados no sequenciador automático ABI PRISM™ 3100 *Genetic Analyser*, Applied Biosystems, com detector de fluorescência. Os resultados da sequenciação foram analisados através do *software Standen Package®*.

- **Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)**

Todos os CI e sem qualquer mutação nos genes *LDLR* ou *APOB*, ou indivíduos cujos fenótipos são muito agressivos, foram analisados por MLPA (MRC Holland) seguindo as instruções do fabricante – fase II do EPHF.

Esta técnica de diagnóstico [85] foi utilizada para determinar o número de cópias de uma determinada sequência de DNA genómico, consistindo numa variação da reacção de PCR que permite amplificar múltiplos alvos e detectar a existência de grandes deleções e/ou duplicações, utilizando apenas um par de *primers* para todas as sondas que são utilizadas (anexo X, tabela X.1).

O kit MLPA® Salsa P062-C2 *LDLR* (MRC Holland) contém 33 sondas com produtos de amplificação entre 136 e 445 nucleótidos, 20 das quais para o gene *LDLR*. Possui também 11 sondas de referência, fragmentos controlo que originam pequenos produtos que são posteriormente usados para aferir sobre a qualidade do DNA da amostra, bem como garantir que a corrida e a reacção de ligação foram realizadas com sucesso, 2 sondas que emparelham imediatamente antes e depois do gene *LDLR*. Cada sonda MLPA consiste num par de oligonucleótidos (sondas de hibridação) marcados por fluorescência que reconhecem sequências-alvo adjacentes no DNA. Cada um dos oligonucleótidos contém uma das sequências reconhecidas pelo *primer* de PCR.

A reacção de MLPA ocorreu num termociclador (T3000, Biometra) e compreende 4 fases: 1 - **desnaturação** do DNA: 5 minutos a 98°C, seguido de descida da temperatura até 25°C durante o qual se prepara a Mix de hibridação, composta por MLPA *buffer* (1,5 µL/amostra) e mix de sondas (1,5 µL/amostra), adicionando-se 5 µL e a cada tubo; 2 – **Reacção de hibridação das sondas**: 1 minuto a

95°C seguido de um tempo de hibridação a 60°C durante 16 a 20 horas; 3 – **reação de ligação**: após a hibridação das sondas junta-se o produto da reação de ligação a cada tubo, estando o termociclador a 54°C enquanto se pipetam 32 µL de mix de ligação (composta por água estéril bidestilada (25 µL/amostra), tampão ligase A (3 µL/amostra), tampão ligase B (3 µL/amostra) e enzima *Ligase-65* (1 µL/amostra)) em cada amostra e mantém-se esta temperatura durante 15 minutos, após ter sido adicionada esta mix a todos os tubos, seguindo-se 5 minutos a 98°C para inativação da enzima *Ligase-65* e, por fim, desce-se a temperatura até 20°C. Nesta fase os tubos podem ser retirados do termociclador (podendo, inclusive ser conservados durante uma semana) para se proceder à fase 4 – **Reação de amplificação por PCR de cada sonda**: é preparada uma mix constituída por água estéril bidestilada (7,5 µL/amostra), *SALSA PCR primer mix* (2 µL/amostra) e *SALSA Polimerase* (0,5 µL/amostra). A cada tubo é adicionado 10 µL desta mix, sendo estes depois novamente colocados no termociclador. A reação de PCR compreende 35 ciclos compostos pelo passo de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, seguido de emparelhamento dos *primers* a temperaturas a 60°C durante 30 segundos e, por fim, extensão a 72°C durante 1 minuto. Por fim, é ainda realizado um passo de extensão final a 72°C durante 20 minutos.

Para além das amostras que se pretendia estudar, foi sempre realizado o MLPA a 4 amostras que se sabiam não ter nenhum grande rearranjo no gene LDLR que serviam como controlos negativos, permitindo normalizar os resultados. A altura dos picos da sequência-alvo foi normalizada e avaliada quanto a perda (rácio de 0,5) ou ganho de exão (rácio de 1,5).

O produto final foi entregue à Unidade de Tecnologia e Inovação (INSA), para separar os marcadores fluorescentes por electroforese capilar (ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyser, Applied Biosystems), sendo o produto de amplificação das sondas comparados com os fragmentos controlo para determinar o número de cópias das sequências-alvo. Os produtos de amplificação foram analisados com recurso ao *software* de análise *GeneScanner*, versão 3.1.2, e o tamanho dos picos foi medido utilizando o *software* *Genotyper*, versão 2.5 (Applied Biosystems) e os resultados exportados para uma folha excel para análise posterior.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos foram analisados através de um *software* de análise estatística, SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 17.0 para Windows.

A análise baseou-se na aplicação de testes T (paramétricos) para avaliar as diferenças entre os grupos índice e familiares, da amostra pediátrica e de adultos. Quando não existia normalidade da amostra, recorreu-se a testes Mann-Whitney (não paramétricos). Em todos os testes foi considerado estatisticamente significativo o valor de p inferior a 0,05.

Quando não foi possível a aplicação destes testes, recorreu-se ainda à aplicação do teste do chi-quadrado ou do teste Anova.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

No âmbito do EPHF, foi efectuado o estudo molecular a familiares de 45 casos índice, pelo método de *cascade screening* (CS). Foi também realizado o estudo bioquímico a todos os indivíduos incluídos na amostra.

Dos 45 casos índice, 25 pertenciam ao grupo pediátrico (idade inferior a 18 anos) e 20 ao grupo de adultos. No âmbito deste trabalho foram estudados 106 familiares (23 do grupo pediátrico e 83 do grupo dos adultos), referenciados ao estudo durante este ano, pelo método CS. Para a análise, foram incluídos também familiares cujo estudo molecular já tinha sido realizado. Desta forma, a amostra total compreende 149 familiares, sendo que 28 pertenciam ao grupo pediátrico e 121 ao grupo dos adultos.

A distribuição da amostra e a caracterização clínica e de hábitos de vida do grupo pediátrico e grupo dos adultos estão discriminadas na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - distribuição da amostra, caracterização clínica e de hábitos de vida da amostra.

| | Grupo Pediátrico | n | Grupo dos Adultos | n |
|--------------------------------|------------------|----|-------------------|-----|
| Índice (%) | 47,2 | 25 | 14,2 | 20 |
| Familiares (%) | 52,8 | 28 | 85,8 | 121 |
| Idade (anos) | 11±4 | 51 | 43±15 | 138 |
| Sexo Feminino (%) | 45,3 | 24 | 47,5 | 67 |
| Sexo Masculino (%) | 54,7 | 29 | 52,5 | 74 |
| DCV (%) | 0 | 0 | 9,9 | 14 |
| Xantomas (%) | 0 | 0 | 2,1 | 3 |
| Em Medicação (%) | 20,8 | 11 | 50,4 | 71 |
| Dieta (%) | 17 | 9 | 31,9 | 45 |
| IMC (kg/m²)* | 19,2277±3,70734 | 22 | 27,1344±5,73559 | 18 |
| Consumo de álcool (%)* | 0 | 0 | 4,3 | 6 |
| Fumadores (%)* | 0 | 0 | 5 | 7 |
| Hipertensão (%)* | 0 | 0 | 5 | 7 |
| Diabetes (%)* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Exercício Físico (%)* | 37,7 | 20 | 6,4 | 9 |

* informação disponível apenas sobre os casos índice; IMC – índice de massa corporal; DCV – doença cardiovascular; n- nº de indivíduos. N(pediátrico)=53 indivíduos; N(adultos)=141 indivíduos.

4.2. ANÁLISE MOLECULAR

A pesquisa de mutações foi feita aos familiares de casos índice, anteriormente diagnosticados com FH. Na tabela 4.2 encontram-se as diversas famílias estudadas e o respectivo CI, assim como qual(is) a(s) alteração(es) encontrada(s) em cada família, o número total de indivíduos estudados por família e quantos indivíduos apresentam a alteração (incluindo o CI).

Das 45 famílias estudadas, 42 famílias apresentam alterações no gene LDLR e 3 no gene APOB, sendo que nenhuma família apresenta alterações no gene PCSK9.

No total, a amostra estudada compreende 194 indivíduos. Destes, 136 indivíduos, incluindo casos índice (46 do grupo pediátrico e 90 do grupo dos adultos) apresentavam alterações nos genes LDLR ou APOB, perfazendo 70,10% da amostra total. Do número total de familiares da amostra (n=149), em 61,07% (91 familiares) foram detectadas alterações após estudo familiar.

Tabela 4.2 - famílias estudadas e respectivas alterações encontradas.

| Família | Caso Índice | Alteração | Gene | Localização | Nº Indivíduos estudados | Nº indivíduos com alteração | Referência |
|---------|-------------|---------------------------------------------|------|-------------|-------------------------|-----------------------------|------------|
| F10 | 99011 | c.2054C>T (p.Pro685Leu) | LDLR | Exão 14 | 10 | 6 | [86] |
| F11 | 99012 | c.1027G>A (p.Gly343Ser) | LDLR | Exão 7 | 6 | 2 | [87] |
| F73 | 21023 | c.369_393del25 (p.Ser123SerfsX176) | LDLR | Exão 4 | 4 | 2 | [65] |
| F79 | 21037 | c.1060+1G>A | LDLR | Intrão 8 | 5 | 3 | [51] |
| F86 | 22001 | c.670G>A (p.Asp224Asn) | LDLR | Exão 4 | 7 | 7 | [87] |
| F113 | 25001 | c.10580G>A (p.Arg3527Gln) | APOB | Exão 26 | 3 | 2 | [88] |
| F147 | 26043 | c.829G>A (p.Glu277Lys) ^Φ | LDLR | Exão 6 | 4 | 3 | [89, 90] |
| F156 | 26061 | c.631C>G (p.His211Asp) | LDLR | Exão 4 | 3 | 2 | [65] |
| | | c.1178delA (p.Lys372ArgfsX20) | | Exão 8 | | 2 | [65] |
| | | c.1816G>T (p.Ala585Ser) | | Exão 12 | | 2 | [91] |
| F172 | 26099 | c.1633G>T (p.Gly545Trp) | LDLR | Exão 11 | 6 | 5 | [65] |
| F189 | 26130 | c.1322T>C (p.Ile441Thr) | LDLR | Exão 9 | 4 | 3 | [92] |
| F238 | 27168 | c.530C>T (p.Ser177Leu) | LDLR | Exão 4 | 10 | 6 | [93] |
| F262 | 28002 | Pr_Ex2del + Ex8_12del | LDLR | - | 6 | 4 | [65, 94] |
| F286 | 28063 | Pr_Ex2del + Ex8_12del | LDLR | - | 3 | 2 | [65, 94] |
| F289 | 28069 | Pr_Ex2del + Ex8_12del | LDLR | - | 5 | 4 | [65, 94] |
| F298 | 28095 | c.1633G>T (p.Gly524Trp) | LDLR | Exão 11 | 9 | 5 | [65] |
| F350 | 29019 | c.1291G>A (p.Ala410Thr) | LDLR | Exão 9 | 6 | 6 | [95] |
| F386 | 29094 | c.530C>T (p.Ser177Leu) | LDLR | Exão 4 | 4 | 3 | [93] |
| F390 | 29105 | c.-13A>G ^Φ | LDLR | Promotor | 5 | 3 | [52, 63] |
| F392 | 29109 | c.-135C>G | LDLR | Promotor | 9 | 4 | [89] |
| F399 | 29127 | c.1291G>A (p.Ala410Thr) | LDLR | Exão 9 | 2 | 2 | [95] |
| F407 | 29142 | c.1935_1936insA (p.Asn645LysfsX24) | LDLR | Exão 13 | 4 | 3 | [65] |
| F466 | 29275 | c.1633G>T (p.Gly545Trp) | LDLR | Exão 11 | 4 | 3 | [65] |
| F513 | 10098 | c.13158delA (p.Glu4387AsnfsX7) ^Δ | APOB | Exão 29 | 2 | 2 | ND |
| F530 | 10128 | c.1876G>A (p.Glu626Lys) | LDLR | Exão 13 | 4 | 2 | [96] |
| F535 | 10137 | c.1A>C (p.Met1Leu) | LDLR | Promotor | 3 | 3 | [97] |
| F539 | 10146 | c.1291G>A (p.Ala410Thr) | LDLR | Exão 9 | 6 | 4 | [95] |
| F579 | 11061 | c.1176C>A (p.Cys392X) | LDLR | Exão 8 | 8 | 5 | [98] |
| F586 | 11093 | c.10679A>G (p.Tyr3560Cys) | APOB | Exão 26 | 3 | 3 | [99] |
| F600 | 11147 | c.-135C>G | LDLR | Promotor | 4 | 2 | [87] |
| F601 | 11155 | c.1816G>T (p.Ala606Ser) | LDLR | Exão 2 | 2 | 2 | [91] |
| F611 | 11184 | c.58G>A (p.Gly20Arg) | LDLR | Promotor | 2 | 1 | [100] |
| F619 | 11215 | c.2291T>C (p.Ile764Thr) ^Δ | LDLR | Exão 15 | 6 | 3 | ND |
| F621 | 11227 | Ex13_15dup | LDLR | - | 4 | 4 | [101] |
| F627 | 11247 | c.1291G>A (p.Ala431Thr) | LDLR | Exão 9 | 3 | 1 | 96 |
| F629 | 11258 | ΔPr_ex2 + ex8_12del | LDLR | - | 3 | 2 | [94, 65] |
| F644 | 11311 | c.1291G>A (p.Ala410Thr) | LDLR | Exão 9 | 2 | 2 | [95] |
| F646 | 11316 | c.-135C>G | LDLR | Promotor | 3 | 2 | [87] |
| F649 | 11326 | c.619_639del21 (p.Gly207_Ser213del) | LDLR | Exão 4 | 3 | 2 | [65] |
| F660 | 11349 | c.1775G>A (p.Gly592Glu) | LDLR | Exão 12 | 3 | 3 | [87] |
| F662 | 12010 | Ex2_3del | LDLR | - | 2 | 2 | [102] |
| F663 | 12013 | c.1291G>A (p.Ala410Thr) | LDLR | Exão 9 | 2 | 1 | [95] |
| F665 | 12021 | c.90C>T (p.Asn30Asn) ^Φ | LDLR | Exão 2 | 2 | 1 | [103] |
| F667 | 12026 | c.818-2A>G | LDLR | Intrão 6 | 2 | 2 | [65] |
| F670 | 12037 | c.1802A>T (p.Asp601Val) ^Δ | LDLR | Exão 12 | 3 | 2 | ND |
| F678 | 12058 | c.1775G>A (p.Gly591Glu) | LDLR | Exão 12 | 3 | 2 | [87] |

Φ – alteração não patogénica; Δ – alteração não descrita na literatura; ND – não descrita.

Tal como indicado na tabela 4.2. as alterações encontradas nas famílias F513, F619 e F670 não foram ainda descritas. As alterações encontradas na F390 e F147 e F665, por sua vez, não são patogénicas, tal como se irá referir mais à frente. Todas as outras alterações encontradas já haviam sido descritas como causadoras de FH, considerando-se para análise apenas as famílias com estas alterações.

É importante referir que dado o caso índice 26061 (F156) apresentar um genótipo de heterozigotia composta (apresentando 3 alterações, como referido na tabela 4.2), sendo o único indivíduo com este genótipo, não foi considerado para tratamento estatístico, uma vez que apresenta um fenótipo muito mais severo, podendo influenciar alguns resultados. Assim, a amostra

de indivíduos considerada com mutações no gene LDLR ou APOB compreende apenas 38 casos índice e 83 familiares dos indivíduos estudados, 42 do grupo pediátrico e 79 do grupo dos adultos, correspondendo a 62,97% da amostra total e 55,70% da amostra de familiares estudados (83 em 149 familiares) (figura 4.1).

Do número total de familiares considerados na amostra, apenas 66 (53 adultos e 13 crianças) foram identificados com FH, neste trabalho, perfazendo 66,26% do número total de familiares estudados. Os restantes, como referido, já haviam sido diagnosticados no âmbito do mesmo projecto.

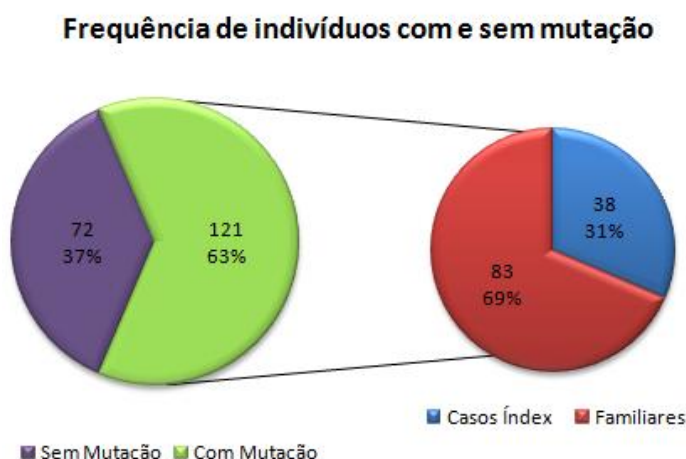


Figura 4.1 - gráfico representativo da frequência de indivíduos com e sem mutação na amostra estudada.

Nas famílias estudadas detectaram-se mutações *missense* (20 famílias), *nonsense* (11 famílias), de alterações de *splicing* (5 famílias) e no gene APOB (2 famílias). A frequência de indivíduos com cada um dos tipos de mutação está descrita na tabela 4.3. Como referido, as restantes famílias não entram na análise estatística. No grupo das mutações *nonsense* incluem-se todas as alterações que originam um alelo nulo (mutações *nonsense*, frameshift e grandes rearranjos do gene LDLR).

Tabela 4.3 - frequência de indivíduos com cada tipo de mutação.

| Gene | Tipo de mutação | Grupo Pediátrico | | | | Grupo dos Adultos | | | |
|------|---------------------|------------------|----|------------|----|-------------------|----|------------|----|
| | | Índice | n | Familiares | n | Índice | n | Familiares | n |
| LDLR | <i>Missense</i> (%) | 50 | 11 | 60 | 12 | 56,3 | 9 | 58,7 | 37 |
| | <i>Nonsense</i> (%) | 31,8 | 7 | 30 | 6 | 25,0 | 4 | 27,0 | 17 |
| | <i>Splicing</i> (%) | 18,2 | 4 | 5 | 1 | 6,3 | 1 | 11,1 | 7 |
| APOB | <i>Missense</i> (%) | 0 | 0 | 5 | 1 | 12,5 | 2 | 3,2 | 2 |
| | Total | | 22 | | 20 | | 16 | | 63 |

- Estudo familiar para alterações não descritas anteriormente (Famílias F513, F619 e F670)**

As alterações c.13158delA (p.Glu4387AsnfsX7) no exão 29 do gene APOB, c.2291T>C (p.Ile764Thr) no exão 15 do LDLR e c.1802A>T (p.Asp601Val) no exão 12 do LDLR e, detectadas nos CI 10098 (família 513), 11215 (família 619) e 12037 (família 670), respectivamente, não estão ainda descritas na literatura. Para todas estas famílias foi efectuado o estudo familiar, de forma a determinar a co-segregação da alteração encontrada.

Relativamente ao CI 10098, apenas foi possível estudar um familiar (irmão) que também apresenta a alteração referida. Após o estudo familiar do CI 11215, verificou-se a presença da

alteração também no pai e na avó paterna (figura 4.2). O estudo familiar do CI 12037 permitiu detectar a alteração em questão no seu pai (figura 4.3).

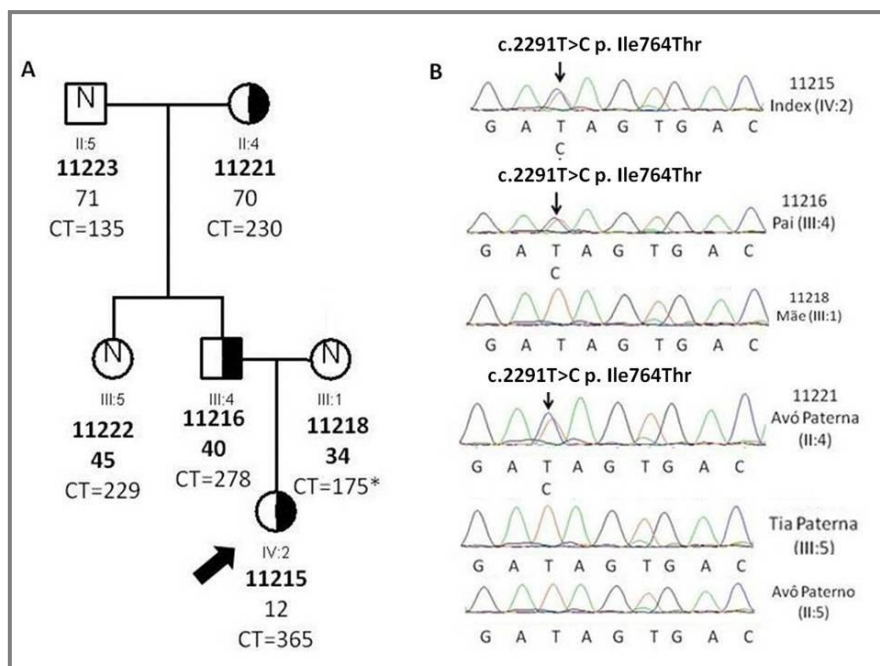


Figura 4.2 - família 619. **A:** árvore genealógica. A seta indica o caso índice. Por baixo de cada indivíduo encontra-se a sua identificação, a idade em anos e o respectivo valor de Colesterol Total (CT) em mg/dL (*corresponde a valores de CT em tratamento). Os valores dos restantes parâmetros bioquímicos encontram-se na tabela XI.1 no anexo XI. Os símbolos preenchidos metade a preto representam indivíduos heterozigotos para a alteração c.2291T>C (p.Ile764Thr); N representa os indivíduos em que não foi encontrada a alteração. **B:** sequência da parte do exão 15 do CI e dos seus familiares onde se observa a alteração referida.

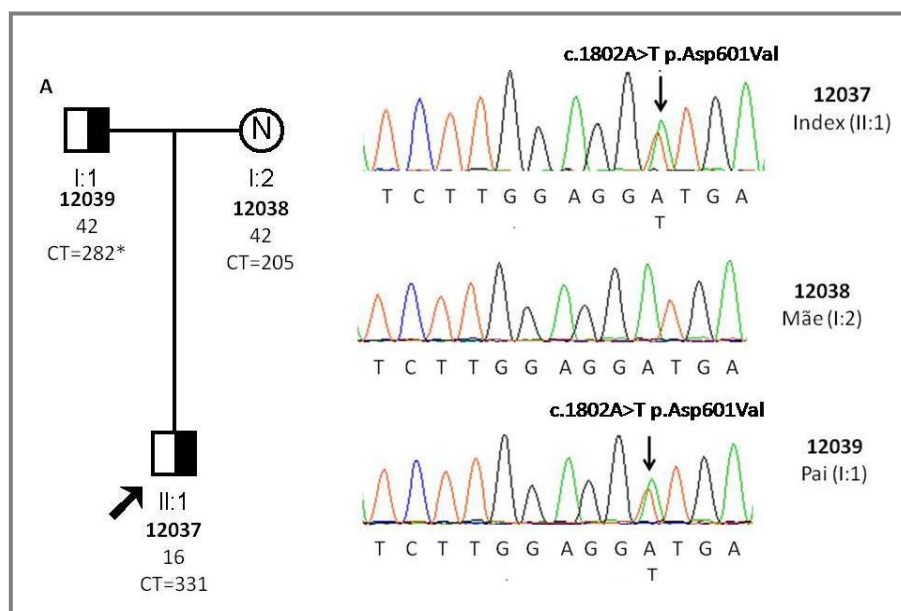


Figura 4.3 - família 670. **A:** árvore genealógica. A seta indica o caso índice. Por baixo de cada indivíduo encontra-se a sua identificação, a idade em anos e o respectivo valor de Colesterol Total (CT) em mg/dL (*corresponde a valores de CT em tratamento). Os valores dos restantes parâmetros bioquímicos encontram-se na tabela XI.1 no anexo XI. Os símbolos preenchidos metade a preto representam indivíduos heterozigotos para a alteração 1802A>T (p.Asp601Val); N representa os indivíduos em que não foi encontrada a alteração. **B:** sequência da parte do exão 12 do CI e respectivos familiares onde se observa a alteração referida.

Para além do estudo da co-segregação, com recurso a ferramentas bioinformáticas, foi realizada a previsão do efeito das alterações detectadas nas famílias 619 e 670. Na tabela 4.4 estão descritos

os resultados desta previsão, bem como outros estudos realizados para avaliar se as alterações cumprem os critérios referidos por Cotton & Scriver (1998).[104]

Tabela 4.4 – Previsão *in silico* do efeito da substituição de aminoácidos nas alterações ainda não descritas como mutações associadas ao fenótipo de hipercolesterolemia familiar

| Alteração | c.2291T>C (p.Ile764Thr) (Família 619) | c.1802A>T (p.Asp601Val) (Família 670) |
|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Previsão <i>Mutation Taster</i> ^a | <i>Polymorphism</i> (0,9995 probability) | <i>Disease causing</i> (0,997 probability) |
| Previsão <i>PolyPhen-2</i> ^a | <i>Tolerated</i> (score: 1) | <i>Probably damaging</i> (score: 0,976) |
| Previsão <i>SIFT</i> ^a | <i>Benign</i> (score: 0) | <i>Deleterious</i> (score: 0) |
| Co-segregação | Sim ^b | Sim ^b |
| Conservação entre espécies | Não | Sim |
| Presença num painel de 100 indivíduos normolipidémicos | Não | -- ^c |
| Estudos Funcionais | Não | Não |

PolyPhen-2, *polymorphism phenotyping v2*; SIFT, *Sorting Intolerant From Tolerant*.

^a Análise *in silico*; ^b Necessários mais familiares para confirmação da co-segregação; ^c Não foi determinado.

Para a alteração encontrada na família 513 observou-se que esta origina um codão STOP 7 aminoácidos depois da alteração, originando uma proteína truncada. Não foi possível, porém, observar se estava presente num painel de 100 indivíduos normolipidémicos.

Pelos resultados referidos, a natureza das alterações referidas e dada à falibilidade dos *softwares* informáticos, não se consideraram estas alterações para a análise estatística deste trabalho. Para comprovar a patogenicidade das alterações referidas são, assim, necessários estudos funcionais para confirmar a patogenicidade das mesmas.

- **Estudo familiar para alterações com patogenicidade duvidosa (Famílias F390, F147 e F665)**

Após estudo molecular do CI 29105 foi detectada a alteração c.-13A>G, não se conhecendo o efeito desta na proteína sintetizada. Primeiramente foi efectuado o estudo familiar, tendo a alteração sido encontrada numa das filhas e no irmão mais velho do CI (figura 4.4 A e B). De modo a verificar a patogenicidade da alteração foi ainda sequenciada a parte do cDNA que continha os exões 1, 2 e 3 do gene LDLR, dado que no exão 2 do gene LDLR se havia detectado o polimorfismo c.81C>T em heterozigotia (figura 4.4, C2). Optou-se por este método uma vez que, pelo estudo do DNA genómico do gene LDLR, se detectou que o CI tinha um polimorfismo em heterozigotia no exão 2 do mesmo gene. Desta forma, observou-se que a expressão do gene não era influenciada pela alteração no promotor uma vez que foi possível, a partir da análise do cDNA, observar o polimorfismo em heterozigotia, significando que ambos os alelos eram expressos (figura 4.4, C1).

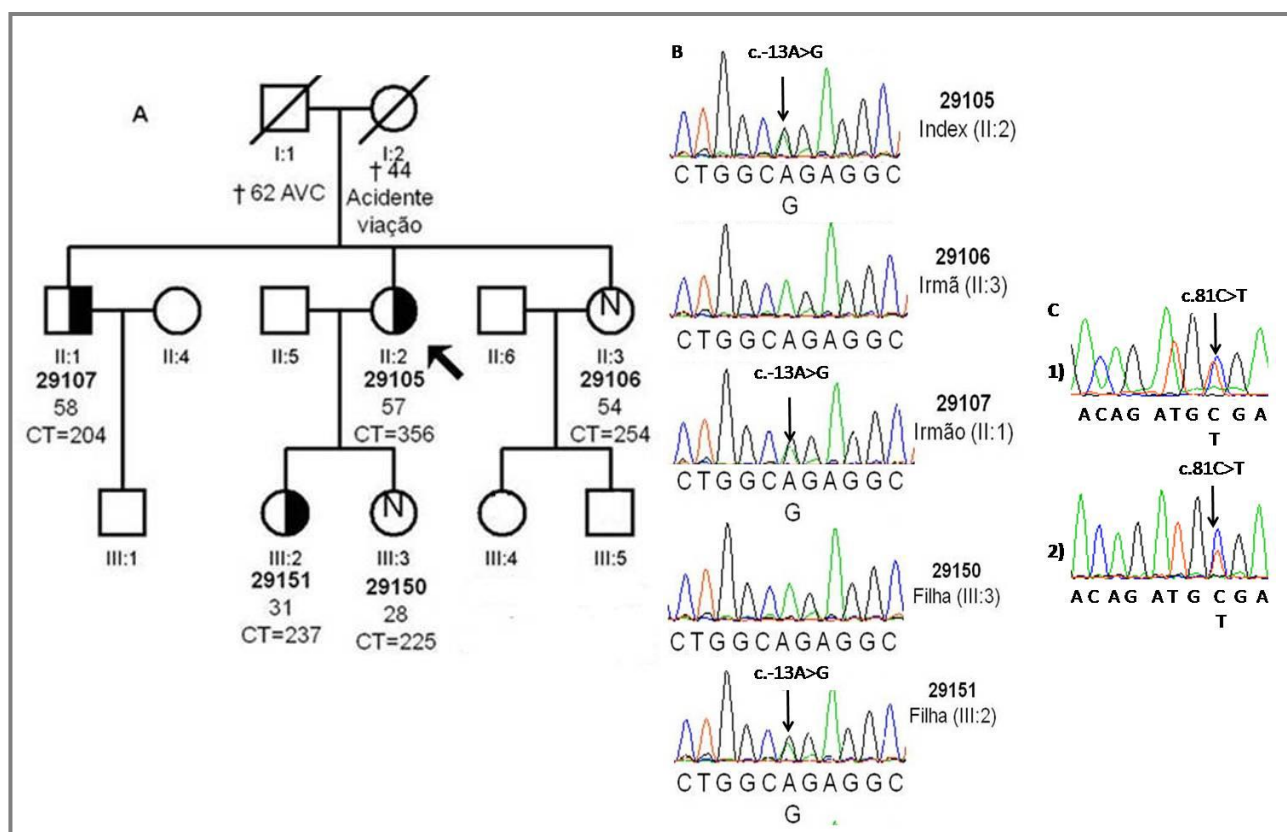


Figura 4.4 - família 390. **A:** árvore genealógica. A seta indica o caso índice. Por baixo de cada indivíduo encontra-se a sua identificação, a idade em anos, o respectivo valor de Colesterol Total (CT) em mg/dL e os eventos ocorridos († - morte; AVC – acidente vascular cerebral). Os valores dos restantes parâmetros bioquímicos encontram-se na tabela XI.1 no anexo XI. Os símbolos preenchidos metade a preto representam indivíduos heterozigotos para a alteração c.-13A>G; N representa os indivíduos em que não foi encontrada a alteração. **B:** sequência da parte do promotor do gene LDLR do caso índice e dos seus familiares onde se observa a alteração referida. **C: 1)** sequência do cDNA do exão 2 do gene LDLR do caso índice do polimorfismo c.81C>T (SfaNI) com genótipo C/T; **2)** sequência do DNA do exão 2 do gene LDLR do caso índice do polimorfismo c.81C>T (SfaNI) com genótipo C/T.

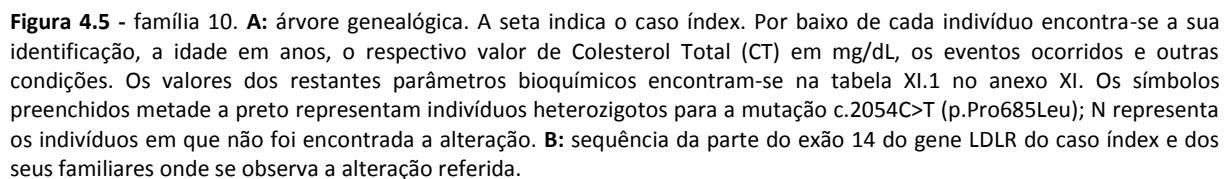
No caso da alteração c.829G>A (p.Glu277Lys) no exão 6 do gene LDLR, encontrada no índice 26043 (família 147) (presente também no pai e na irmã do índice) está descrita como patogénica apenas em associação com a alteração c.1322 T>C (p.Ile441Thr).[88] Esta alteração, porém, não foi detectada em nenhum dos indivíduos da família.

A alteração c.90C>T (p.Asn30Asn) detectada no índice 12021 (F665) foi já descrita como um polimorfismo [102]. Porém, em Portugal ainda não tinha sido encontrada. Neste caso estudou-se ainda a mãe do índice 12021 (F665), na qual não foi detectada a alteração.

• Estudo familiar para alterações de patogenicidade conhecida

Todas as restantes famílias cuja patogenicidade das alterações já se encontra descrita na literatura, foram incluídas na análise estatística deste trabalho. Foi possível observar uma elevada variabilidade de relações entre o genótipo e o fenótipo. Deste modo, irão ser referidas algumas das famílias que suscitaram mais interesse para discussão dos resultados.

Após estudo molecular do caso índice 99011 (F10) foi detectada a alteração *missense* c.2054C>T (p.Pro685Leu) no exão 14 do gene LDLR. Foi depois efectuado o *cascade screening*, no qual foi possível estudar mais 9 indivíduos da família em questão. Tal como se observa na figura 4.5, dos 9 familiares estudados, 5 destes foram diagnosticados com FH, tendo sido possível estudar todos os familiares geneticamente relacionados que poderiam ter a alteração em questão.



• Família 579

Na família 579 (caso índice 11061), por sua vez, após ter sido detectada a alteração *nonsense* c.1176C>A (p.Cys392X) no exão 8 do gene LDLR que origina uma proteína truncada, uma vez que a alteração origina um codão STOP prematuro (TGA).[97]

Foram estudados mais 7 familiares, dos quais 4 também apresentavam esta alteração, tal como representado na figura 4.6. Nesta família, porém, alguns familiares em risco de terem igualmente a alteração não foram possíveis de serem estudados, por indisponibilidade da parte dos mesmos.

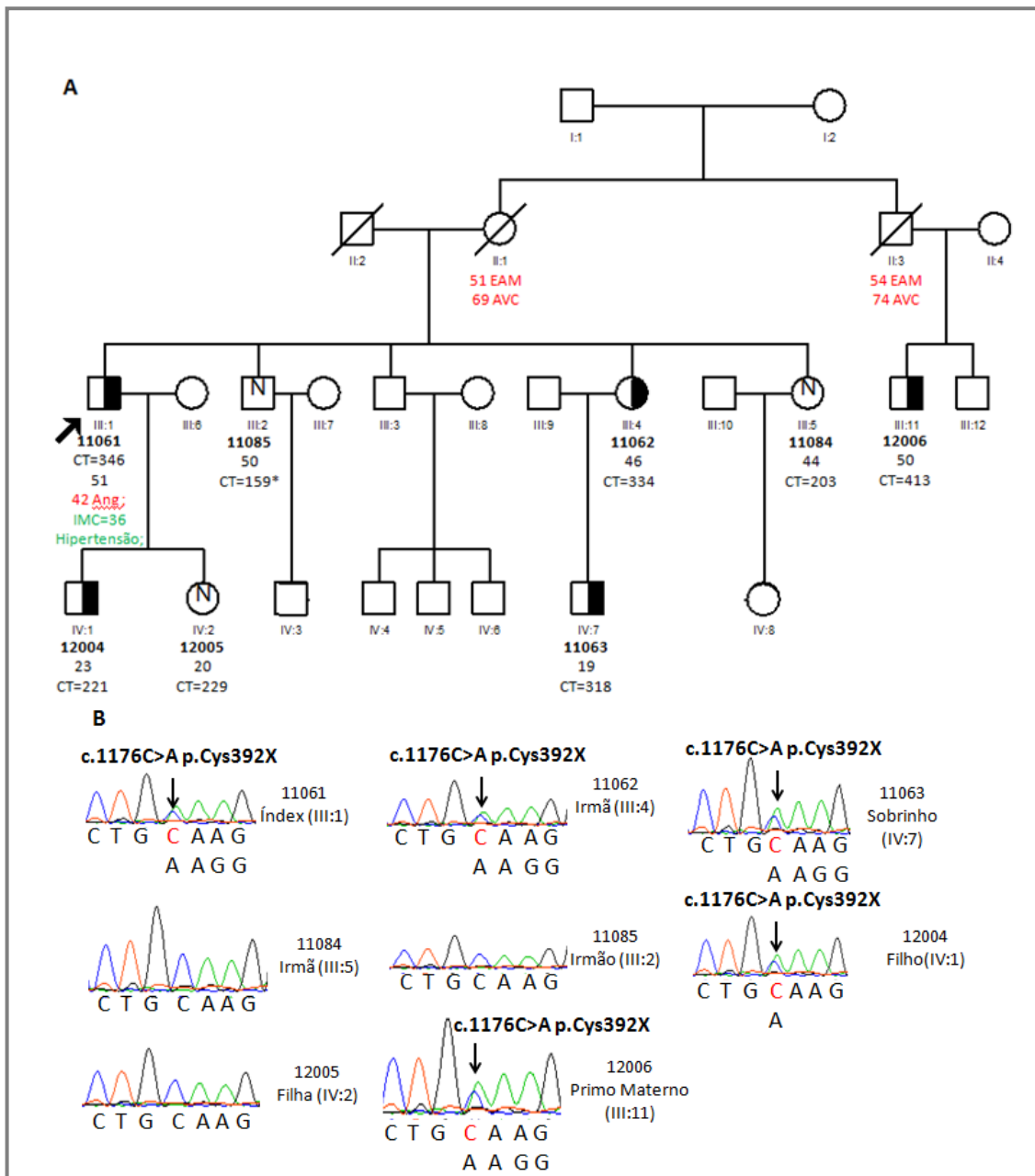


Figura 4.6 - família 579. **A:** árvore genealógica. A seta indica o caso índice. Por baixo de cada indivíduo encontra-se a sua identificação, a idade em anos, o respectivo valor de Colesterol Total (CT) em mg/dL (*corresponde a valores de CT em tratamento), os eventos ocorridos e outras condições. Os valores dos restantes parâmetros bioquímicos encontram-se na tabela XI.1 no anexo XI. Os símbolos preenchidos metade a preto representam indivíduos heterozigotos para a mutação c.1176C>A (p.Cys392X); N representa os indivíduos em que não foi encontrada a alteração. **B:** sequência da parte do exão 8 do gene LDLR do caso índice e dos seus familiares onde se observa a deleção de um par de bases (C), que resultam na mutação referida.

• Família 539

No caso índice 10146 foi encontrada a alteração c.1291G>A p.Ala431Thr no exão 9 do gene LDLR. Por dHPLC, seguido de sequenciação automática deste exão foram estudados também 5 familiares deste indivíduo, tendo a alteração referida sido detectada em 3 mais indivíduos, tal como se observa na figura 4.7.

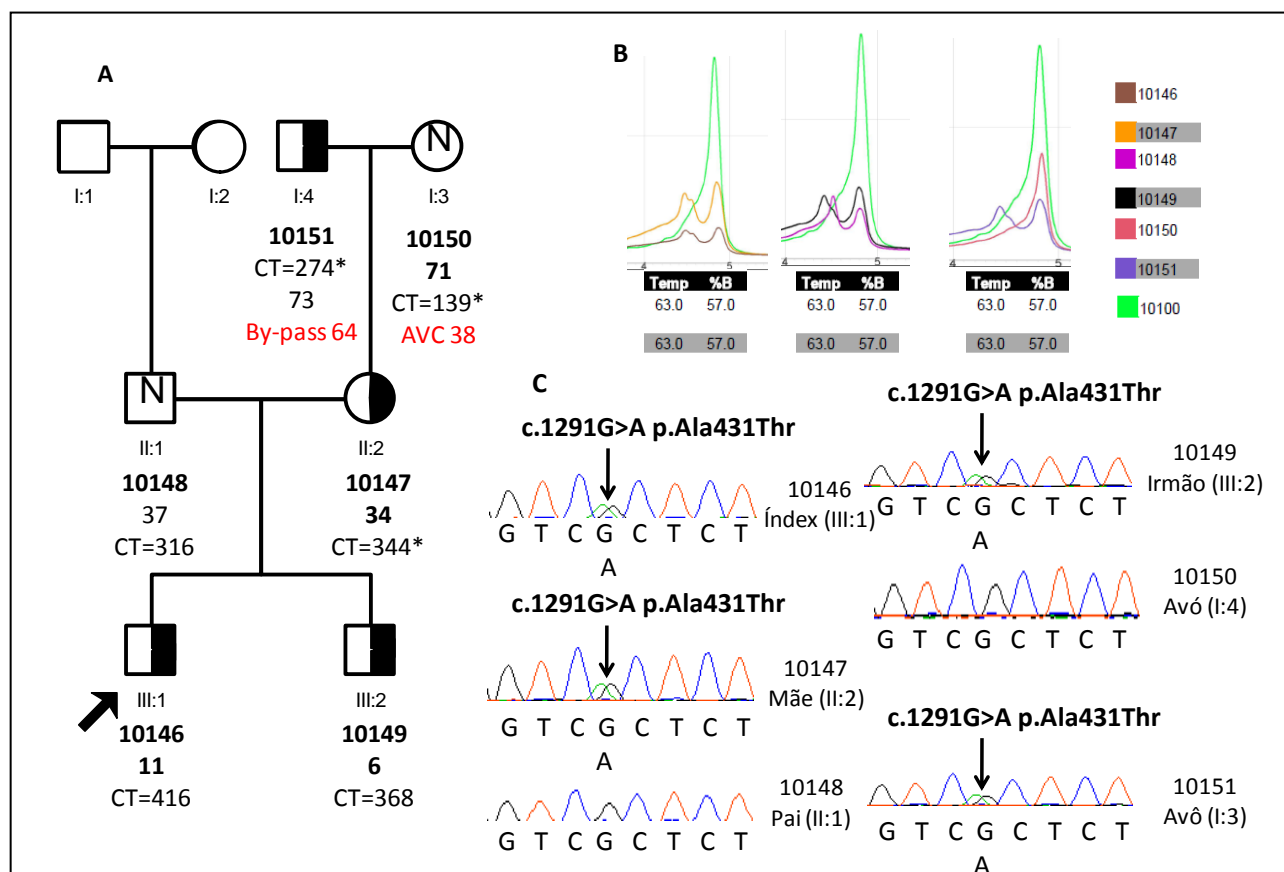


Figura 4.7 - família 539. A: árvore genealógica. A seta indica o caso índice. Por baixo de cada indivíduo encontra-se a sua identificação, a idade em anos, o respectivo valor de Colesterol Total (CT) em mg/dL (*corresponde a valores de CT em tratamento). Os valores dos restantes parâmetros bioquímicos encontram-se na tabela XI.1 no anexo XI. Os símbolos preenchidos metade a preto representam indivíduos heterozigotos para a mutação c.1291G>A (p.Ala431Thr); N representa os indivíduos em que não foi encontrada a alteração. B: detecção da alteração pela metodologia dHPLC à temperatura de 63,5°C, 56,0%B: o perfil do caso índice (castanho) encontra-se alterado em relação ao perfil de uma amostra normal (verde 10100) assim como os perfis da mãe, irmão, pai e avô materno (amarelo, rosa, preto e lilás, respectivamente) são idênticos ao perfil da amostra normal (verde). O perfil da avó materna (10150) não desnaturalizou. C: sequência da parte do exão 9 do gene LDLR do caso índice e dos seus familiares onde se observa a mutação referida.

• Família 289

No caso índice 28069 (F286) após ter sido efectuada a fase I do estudo da FH não foi encontrada nenhuma alteração causadora de FH. Após realizada a fase II do estudo molecular da FH, foi detectado um grande rearranjo do gene LDLR (delecção do promotor ao exão 2 e do exão 8 ao exão 12).[64, 92] Foi depois efectuada a pesquisa da mesma alteração nos pais e nos avós paternos do CI, tendo sido a alteração também encontrada no pai e em ambos os avós paternos, tal como representado na figura 4.8.

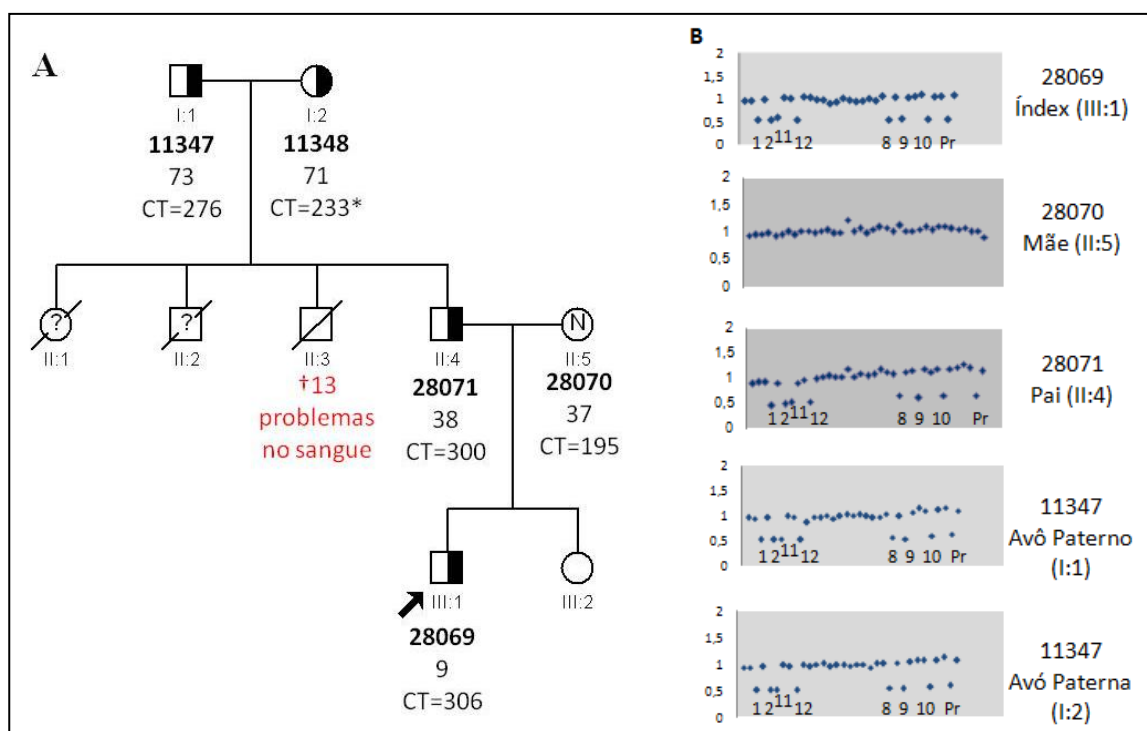


Figura 4.8 - família 289. **A:** árvore genealógica. A seta indica o caso índice. Por baixo de cada indivíduo encontra-se a sua identificação, a idade em anos, o respectivo valor de Colesterol Total (CT) em mg/dL (*corresponde a valores de CT em tratamento). Os valores dos restantes parâmetros bioquímicos encontram-se na tabela XI.1 no anexo XI. Os símbolos preenchidos metade a preto representam indivíduos heterozigotos para a mutação Pr_2+Ex8_12Del; N representa os indivíduos em que não foi encontrada a alteração. **B:** detecção da alteração por MLPA. No caso índice (28069) e nos familiares 28071, 11347 e 11348 denota-se com a normalização dos picos, a perda do rácio dos exões do promotor ao 2 e do exão 8 ao 12. Na figura, cada ponto representa uma sonda que se liga a uma determinada zona do gene LDLR (indicada por baixo do ponto). Já na amostra 28070 (mãe do caso índice) observa-se que não possui a alteração uma vez que todos os picos se encontram alinhados no 1 (valor para o qual os resultados foram normalizados através da utilização de controlos normais).

• **Família 156 – Hipercolesterolemia Familiar heterozigotia composta**

O índice 26061, família 156, apresentava 3 mutações distintas no gene LDLR: c.631C>G (p.His211Asp) no exão 4, c.1816G>T (p.Ala585Ser) no exão 12 e c.1178delA (p.Lys372ArgfsX20) no exão 8, estando as duas primeiras no mesmo alelo. A pesquisa destas três mutações foi efectuada nos progenitores do caso índice, sendo que a mãe do caso índice apresenta as duas mutações *missense* no mesmo alelo e o pai a alteração c.1178delA (p.Lys372ArgfsX20), tal como se observa na figura 4.9. Desta família, apenas se incluíram na amostra os pais do CI, como já referido

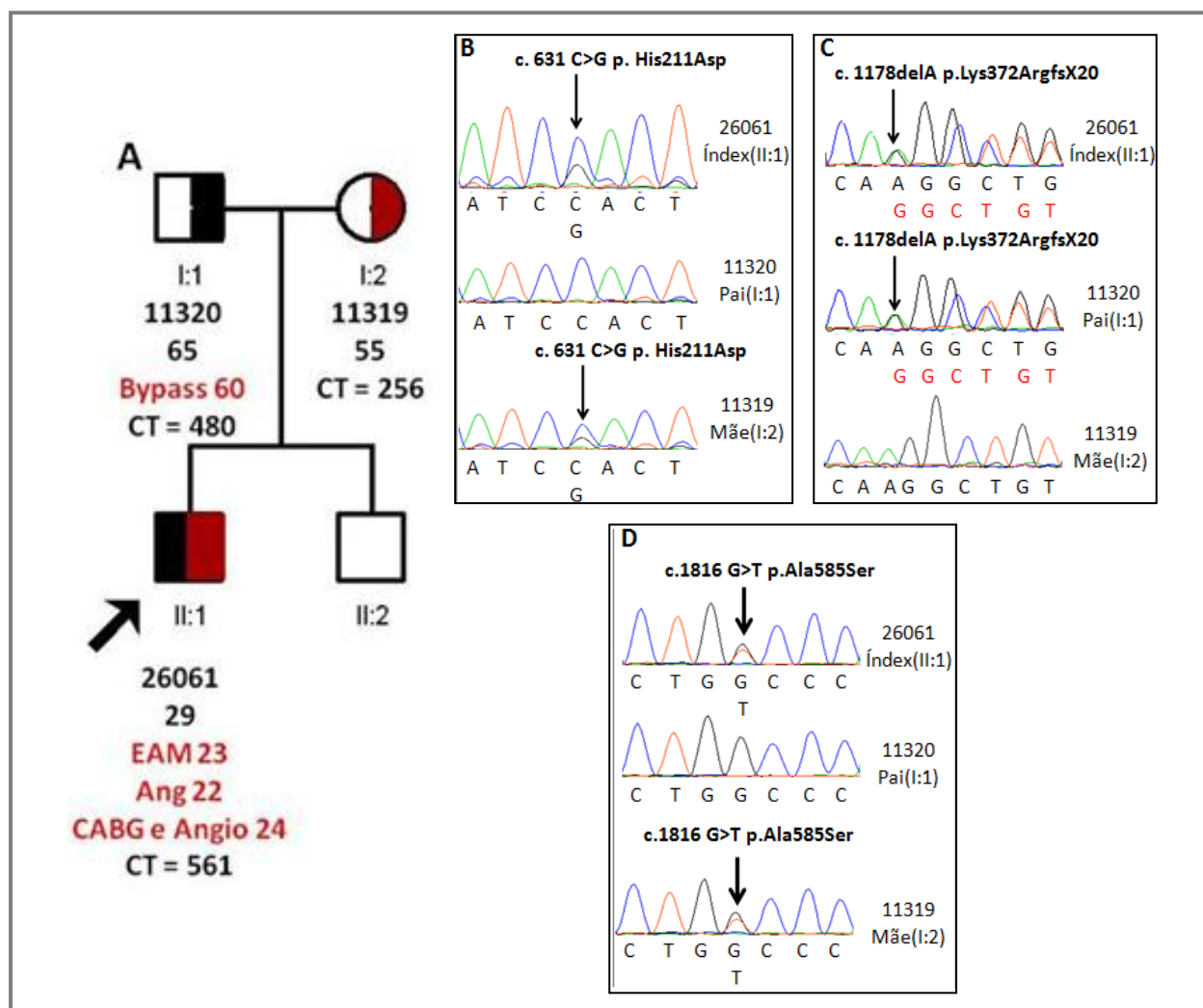


Figura 4.9 - família 156. **A:** árvore genealógica. A seta indica o caso índice. Por baixo de cada indivíduo encontra-se a sua identificação, a idade em anos, o respectivo valor de Colesterol Total (CT) em mg/dL e os eventos ocorridos (EAM – enfarte agudo do miocárdio; Ang - angina; CABG – Revascularização do miocárdio (do inglês *Coronary artery bypass graft*) ; Angio - angioplastia). Os valores dos restantes parâmetros bioquímicos encontram-se na XI.1 no anexo XI. O símbolo metade preto representa a presença em heterozigotia da alteração no exão 8 c.1178delA p. Lys372ArgfsX20; o símbolo metade vermelho representa a presença das alterações no exão 12 c.631C>G p. His 190 Asp e no exão 4 c.1816G>T p. Ala585Ser; o símbolo metade preto e metade vermelho representa a presença das 3 alterações referidas. **B:** sequência da parte do exão 12 do gene LDLR do caso index e dos seus familiares onde se observa a alteração c.631C>G p. His 190 Asp (H190D). **C:** sequência da parte do exão 8 do gene LDLR do caso index e dos seus familiares onde se observa a alteração c.1178delA p. Lys372ArgfsX20 (K372fsX392). **D:** sequência da parte do exão 4 do gene LDLR do caso index e dos seus familiares onde se observa a alteração c.1816G>T p. Ala585Ser (A585S)

4.3. Caracterização Bioquímica

Foi efectuada a caracterização bioquímica de todos os indivíduos da amostra. As médias dos diferentes parâmetros para cada grupo em estudo encontram-se na tabela 4.5 (no anexo XI, tabela XI.1, encontram-se os parâmetros bioquímicos discriminados para todos os indivíduos estudados).

Através da análise estatística foi possível calcular se existiam diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos índice e familiares, dentro dos grupos pediátrico e dos adultos.

Tabela 4.5 - caracterização bioquímica dos indivíduos em estudo com FH.

| Parâmetro Bioquímico (mg/dL) | Grupo Pediátrico | | | | | Grupo dos Adultos | | | | |
|------------------------------|------------------|----|----------------|----|--------------------------|-------------------|----|----------------|----|--------------------------|
| | Índice | n | Familiares | n | P | Índice | N | Familiares | n | P |
| CT ^a | 288,68±46,883 | 22 | 285,50±54,804 | 20 | 0,840 [§] | 373,50±76,805 | 14 | 320,12±88,634 | 43 | 0,049[§] |
| c-LDL ^a | 213,24±46,967 | 21 | 219,05±56,378 | 19 | 0,724 [§] | 310,29±96,776 | 7 | 228,45±79,785 | 31 | 0,044[§] |
| c-HDL ^a | 51,38±19,979 | 21 | 50,56±11,618 | 18 | 0,662 [§] | 50,11±19,180 | 9 | 52,32±13,278 | 31 | 0,694 [§] |
| Triglicéridos ^a | 103,10±82,154 | 20 | 110,22±72,644 | 18 | 0,286 [§] | 125,56±47,511 | 9 | 119,07±73,348 | 30 | 0,395 [§] |
| ApoB* | 117,00±24,353 | 22 | 124,30±32,760 | 20 | 0,414 [§] | 143,933±336,763 | 15 | 130,460±42,919 | 63 | 0,085 [§] |
| ApoA-I* | 132,32±21,986 | 22 | 132,70±17,856 | 20 | 0,951 [§] | 156,267±51,229 | 15 | 142,619±30,841 | 63 | 0,761 [§] |
| Lp(a)* | 44,42±41,571 | 22 | 44,80±51,818 | 20 | 0,979 [§] | 68,853±62,557 | 15 | 50,241±45,743 | 63 | 0,233 [§] |
| ApoA-II* | 27,79±4,917 | 14 | 22,13±4,598 | 15 | 0,248 [§] | 28,564±8,016 | 11 | 27,800±5,089 | 47 | 0,692 [§] |
| ApoC-II* | 3,69±2,057 | 13 | 2,49±1,548 | 15 | 0,073 [§] | 5,482±2,715 | 10 | 4,150±2,190 | 46 | 0,101 [§] |
| ApoC-III* | 7,69±2,720 | 13 | 5,48±1,805 | 15 | 0,011[§] | 11,285±3,557 | 10 | 9,182±3,419 | 46 | 0,069 [§] |
| sdLDL* | 43,93±16,184 | 14 | 34,11±13,142 | 15 | 0,082 [§] | 54,549±32,800 | 11 | 47,667±25,544 | 46 | 0,642 [§] |
| ApoE* | 3,50±1,092 | 14 | 2,38±0,768 | 13 | 0,019[§] | 3,097±1,424 | 11 | 3,446±1,394 | 47 | 0,336 [§] |
| ApoB/ApoA-I* | 0,9006±0,205 | 22 | 0,9275±0,31632 | 20 | 0,742 [§] | 1,047±0,447 | 15 | 1,199±2,224 | 63 | 0,358 [§] |
| Não-HDL/HDL ^a | 5,1495±1,838 | 20 | 5,1798±1,564 | 10 | 0,965 [§] | 7,049±3,880 | 7 | 5,783±2,073 | 12 | 0,673 [§] |

§ - Testes T (paramétricos) φ - Teste Mann-Whitney (não paramétricos); estatisticamente significativo: p<0,05.

^a Apenas considerados para análise indivíduos que não tomam medicação.

*Análise inclui indivíduos que já se encontravam a tomar medicação.

As médias de idades no grupo pediátrico são de 11±4 e 10±4 anos nos casos índice e familiares respectivamente. No grupo dos adultos as médias de idades são 44±12 e 44±16 anos nos casos índice e familiares, respectivamente. Em ambos os casos, as diferenças não são estatisticamente significativas. A diferença observada no número de indivíduos nos diversos parâmetros bioquímicos poderá justificar-se porque nem sempre estavam disponíveis as informações necessárias e amostra de soro para as diversas quantificações.

Tal como indicado na tabela 4.5, em alguns dos parâmetros bioquímicos estudados foram incluídos indivíduos que já estavam a tomar medicação, dada a pequena dimensão da amostra. Considerando os resultados obtidos, para a maioria das análises estatísticas posteriores, eliminou-se a separação entre casos índice e familiares, considerando-se apenas a divisão entre grupo pediátrico e grupo dos adultos.

Dada a dimensão da amostra compararam-se as médias dos diversos parâmetros bioquímicos separados para cada tipo de mutação, estando estes resultados nas tabelas XII.1 e XII.2 (comparação entre todos os tipos de mutação estudados) no anexo XII. Porém, apenas se observou entre o c-HDL nos adultos uma diferença estatisticamente significativa, resultado que não se esperaria. Dado que a grande maioria dos indivíduos apresenta mutações *missense* e *nonsense* comparou-se também as diferenças entre estes dois tipos de mutação (tabelas XII.3 e XII.4, anexo XII). Neste caso, apenas as diferenças nos valores plasmáticos de c-LDL no grupo dos adultos são estatisticamente significativos.

Estes resultados indicam que a análise estatística ficou comprometida, muito provavelmente, devido ao tamanho da amostra, não sendo possível retirar grandes conclusões.

4.4. GENÓTIPO APOE

Neste trabalho foi também determinado o genótipo APOE de todos os indivíduos em estudo, tendo sido calculada a frequência de cada um dos genótipos gerados pelos polimorfismos deste gene. As frequências relativas de cada um dos alelos e a frequência dos genótipos na amostra de indivíduos com mutação em estudo estão discriminadas nas tabelas 4.6 e 4.7 respectivamente.

Tabela 4.6 - frequências relativas dos alelos do gene APOE nos indivíduos com FH dos grupos pediátrico e adultos.

| Alelo | Grupo Pediátrico | Grupo dos Adultos |
|-------|------------------|-------------------|
| E2 | 0,0515 | 0,0445 |
| E3 | 0,846 | 0,87 |
| E4 | 0,1025 | 0,0845 |

Tabela 4.7 – distribuição dos indivíduos da amostra pelos genótipos APOE no grupo pediátrico e no grupo dos adultos em índice e familiares com FH.

| Genótipo | Grupo Pediátrico | | Grupo dos Adultos | |
|----------|------------------|----------------|-------------------|----------------|
| | Índice (n) | Familiares (n) | Índice (n) | Familiares (n) |
| E2/E2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| E2/E3 | 1 | 2 | 0 | 7 |
| E3/E3 | 15 | 13 | 14 | 45 |
| E3/E4 | 4 | 3 | 2 | 8 |
| E2/E4 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| E4/E4 | 0 | 0 | 0 | 1 |

Seria importante tentar compreender se o genótipo do APOE influencia o perfil bioquímico dos indivíduos. Porém, a amostra em estudo é relativamente pequena, não sendo possível, por isso, determinar esta relação. Tentou-se, no entanto, compreender se a presença de pelo menos um determinado alelo influenciava os valores de CT, c-LDL, c-HDL e TG, nos grupos pediátrico e adultos com mutação. Os resultados obtidos não são, contudo, estatisticamente significativos (tabela 4.8).

Tabela 4.8 – comparação entre parâmetros bioquímicos, sem medicação, e a presença de pelo menos um determinado alelo do genótipo APOE no grupo pediátrico e no grupo dos adultos com FH.

| | Grupo pediátrico | | | | | | | |
|----|--------------------|----|--------------------|----|--------------------|----|--------------------|----|
| | CT | n | c-LDL | n | c-HDL | n | TG | n |
| E2 | 262±36,175 | 2 | 181,25±26,209 | 4 | 37,5±6,557 | 4 | 157,75±155,380 | 4 |
| E3 | 289,16±51,520 | 38 | 218,53±51,748 | 36 | 50,86±16,626 | 35 | 112,09±79,195 | 34 |
| E4 | 292,75±66,979 | 8 | 225,43±73,779 | 7 | 45,83±13,438 | 6 | 90,83±64,120 | 6 |
| P | 0,685 [□] | | 0,416 [□] | | 0,137 ^φ | | 0,222 ^φ | |
| | Grupo dos adultos | | | | | | | |
| | CT | n | c-LDL | n | c-HDL | n | TG | n |
| E2 | 307±85,076 | 6 | 223,5±73,823 | 6 | 58,167±4,665 | 6 | 128,333±52,175 | 6 |
| E3 | 334,35±89,255 | 54 | 246,03±87,657 | 37 | 51,23±14,249 | 39 | 122,00±68,045 | 38 |
| E4 | 308,63±87,640 | 8 | 199,75±74,271 | 4 | 52,20±16,858 | 5 | 127,60±65,774 | 5 |
| P | 0,670 [□] | | 0,377 [□] | | 0,101 ^φ | | 0,664 ^φ | |

□ - Testes OneWay Anova (paramétricos); φ - Teste Mann-Whitney (não paramétricos); estatisticamente significativo: p<0,05.

4.4. SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SMALL-DENSE LDL: LIPOPRINT (QUANTIMETRIX) E DAYTONA (RANDOX)

Foram determinadas as subfracções das lipoproteínas presentes no soro dos indivíduos em estudo com FH de forma a determinar a presença de sdLDL (subfracções mais pequenas e mais

densas das LDL). Desta forma, como já referido, indivíduos com, maioritariamente, subfracções menores e mais densas apresentam um perfil não indicativo de tipo A, isto é, um perfil de maior risco para as DCVs. Os resultados obtidos através desta técnica estão representados na figura 4.10.

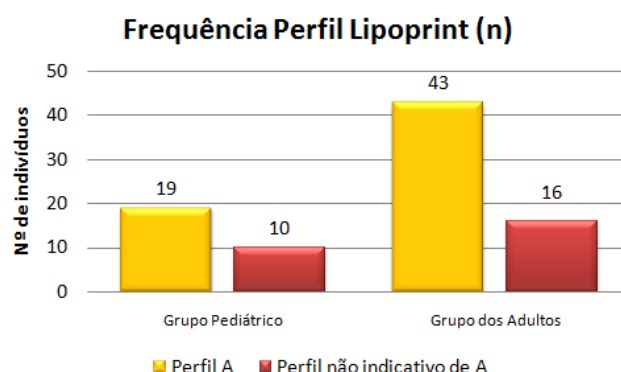


Figura 4.10 - gráfico representativo da distribuição dos indivíduos da amostra com FH com base no seu perfil Lipoprint.

Foram ainda determinadas as idades médias, distribuídas pelo tipo de perfil Lipoprint, nos grupos pediátrico e adultos com FH, estando os resultados discriminados na tabela 4.9.

Tabela 4.9 - idades médias dos indivíduos da amostra com FH distribuídas pelo tipo de perfil Lipoprint nos grupos pediátrico e adultos.

| Perfil Lipoprint | Grupo pediátrico | | Grupo dos adultos | |
|---------------------|--------------------|----|--------------------|----|
| | Idade média | n | Idade média | n |
| A | 10±4 | 19 | 40±15 | 41 |
| Não indicativo de A | 9±5 | 10 | 50±14 | 16 |
| p | 0,414 [Ⓜ] | | 0,046 [Ⓢ] | |

Ⓜ- Testes T (paramétricos); Ⓢ - Teste Mann-Whitney (não paramétricos); estatisticamente significativo: p<0,05.

Os resultados obtidos através da técnica Lipoprint são dados sob a forma de lipidogramas que permitem observar a separação das subfracções lipídicas, estando representados na figura 4.11.

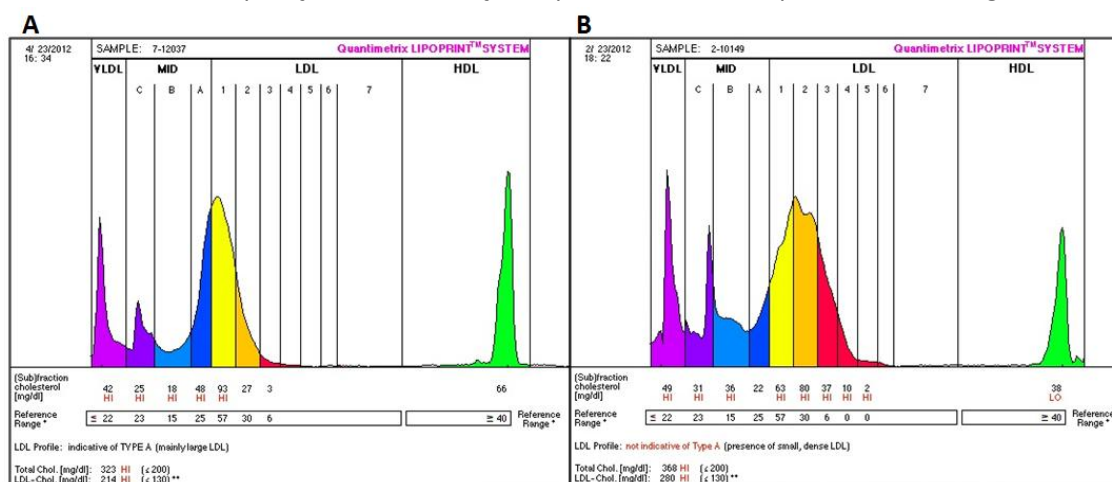


Figura 4.11 – exemplo de lipidogramas obtidos através da técnica Lipoprint. Nos lipidogramas observa-se a estratificação das subfracções lipídicas, da esquerda para a direita: VLDL (lilás); subfracções das IDL (na imagem referidas como MID) C (roxo), B (azul claro) e A (azul escuro); subfracções LDL: 1 (amarelo claro), 2 (amarelo torrado) e 3 a 7 (vermelho); HDL (verde). Por baixo de cada subfracção está indicada a concentração de colesterol (mg/dL) presente em cada uma destas, calculada pela técnica, e ainda o intervalo de referência que a técnica utiliza para cada subfracção. Desta forma, indica quando uma determinada subfracção apresenta valores de colesterol elevado ou baixo (indicado por HI ou LO, respectivamente por baixo da subfracção em questão). Por baixo, está indicado o tipo de perfil Lipoprint: A) indicativo de tipo A (maioritariamente partículas LDL grandes e pouco densas); B) não indicativo de tipo A (presença de sdLDL), denotando-se a diferença nos perfis obtidos. Por fim, no lipidograma é ainda indicada a concentração de CT (mg/dL) que foi previamente introduzido aquando da realização da técnica e a concentração de c-LDL (total), calculado pelo software do Lipoprint.

Através da técnica Lipoprint, através de cálculos estequiométricos, é obtida a concentração de colesterol presente nas diferentes subfracções lipídicas. Pela técnica Daytona, através de reacções enzimáticas é possível também quantificar o colesterol presente nas sdLDL (c-sdLDL). A relação das médias obtidas por cada uma destas técnicas e a sua relação estatística com os perfis obtidos pela técnica *Lipoprint* foi também calculada, estando descritas nas tabelas 4.10 e 4.11.

Tabela 4.10 - relação entre perfil Lipoprint e concentração de c-sdLDL obtido pela técnica Lipoprint nos indivíduos com FH.

| Perfil Lipoprint | Colesterol (mg/dL) Lipoprint | | | |
|---------------------|------------------------------|----|--------------------|----|
| | Grupo pediátrico | n | Grupo dos adultos | n |
| A | 3,474±1,837 | 19 | 3,846±2,508 | 39 |
| Não indicativo de A | 17,500±13,608 | 10 | 21,313±16,447 | 16 |
| P | 0,000 ^φ | | 0,000 ^φ | |

□- Testes T (paramétricos); φ - Teste Mann-Whitney (não paramétricos); estatisticamente significativo: p<0,05.

Tabela 4.11 - relação entre perfil Lipoprint e concentração de c-sdLDL obtido pela técnica Daytona nos indivíduos com FH.

| Perfil Lipoprint | sdLDL (mg/dL) Daytona | | | |
|---------------------|-----------------------|----|--------------------|----|
| | Grupo pediátrico | n | Grupo dos adultos | n |
| A | 39,370±16,734 | 18 | 42,539±18,255 | 41 |
| Não indicativo de A | 40,639±13,259 | 10 | 65,539±9,382 | 16 |
| P | 0,838 [□] | | 0,016 ^φ | |

□- Testes T (paramétricos); φ - Teste Mann-Whitney (não paramétricos); estatisticamente significativo: p<0,05.

Através da quantificação pela técnica Daytona, foi então possível determinar quantos indivíduos em estudo apresentam concentrações de sdLDL plasmáticos abaixo e acima de 35 mg/dL (valor de referência como limiar de risco cardiovascular [38]). Pela aplicação de testes de chi-quadrado compararam-se as concentrações de sdLDL, tendo em conta a divisão acima referida, com o tipo de perfil Lipoprint e com a medicação, tendo-se observado, ainda assim, que não existem diferenças estatisticamente significativas (tabela 4.12), entre estas três variáveis.

Tabela 4.12- relação entre tipo de perfil Lipoprint, medicação e concentração de sdLDL (mg/dL) nos indivíduos com FH.

| Tipo Perfil Lipoprint | Medicação | sdLDL (mg/dL) | Grupo Pediátrico (n) | Grupo dos Adultos (n) |
|-----------------------|-----------|---------------|----------------------|-----------------------|
| Perfil A | Sim | ≤ 35 | 2 | 14 |
| | | > 35 | 1 | 16 |
| | Não | ≤ 35 | 6 | 3 |
| | | > 35 | 9 | 8 |
| | P | | 0,412 ^Δ | 0,226 ^Δ |
| Perfil B | Sim | ≤ 35 | 2 | 2 |
| | | > 35 | 3 | 9 |
| | Não | ≤ 35 | 2 | 1 |
| | | > 35 | 3 | 4 |
| | P | | 0,738 ^Δ | 0,705 ^Δ |

^Δ Teste Qui-Quadrado; estatisticamente significativo: p<0,05

Os valores plasmáticos médios de CT, c-LDL, c-HDL e TG dos indivíduos sem medicação com base no tipo de perfil Lipoprint e na concentração plasmática de sdLDL obtida na técnica Daytona estão discriminados nas tabelas 4.13 e 4.14. Nesta análise apenas foram considerados apenas os indivíduos sem medicação

Tabela 4.13 – relação entre os parâmetros bioquímicos por tipo de perfil Lipoprint no grupo pediátrico e no grupo adultos da amostra em estudo com FH, sem medicação.

| | Parâmetros Bioquímicos (mg/dL) | Perfil Lipoprint A | n | Perfil Lipoprint Não indicativo de A | n | P |
|--------------------------|--------------------------------|--------------------|----|--------------------------------------|---|--------------------------|
| Grupo Pediátrico | CT | 248,19±51,817 | 16 | 287,20±55,188 | 5 | 0,164 [Ⓜ] |
| | c-LDL | 168,31±48,928 | 16 | 225,00±58,822 | 5 | 0,156 [Ⓜ] |
| | c-HDL | 48,88±10,314 | 16 | 44,00±2,915 | 5 | 0,108 [Ⓜ] |
| | TG | 70,81±28,433 | 16 | 119,00±58,885 | 5 | 0,020[Ⓜ] |
| Grupo dos Adultos | CT | 273,17±80,653 | 12 | 339,20±109,500 | 5 | 0,018[Ⓜ] |
| | c-LDL | 200,92±73,461 | 12 | 256,60±101,051 | 5 | 0,220 [Ⓜ] |
| | c-HDL | 48,75±14,007 | 12 | 52,80±3,962 | 5 | 0,374 [Ⓜ] |
| | TG | 118,417±51,417 | 12 | 143,00±49,980 | 5 | 0,380 [Ⓜ] |

Ⓜ- Testes T (paramétricos); Ⓟ - Teste Mann-Whitney (não paramétricos); estatisticamente significativo: p<0,05.

Tabela 4.14 - relação entre os parâmetros bioquímicos por concentração de sdLDL no grupo pediátrico e no grupo dos adultos da amostra em estudo com FH, sem medicação.

| | Parâmetros Bioquímicos (mg/dL) | sdLDL ≤35 (mg/dL) | n | sdLDL >35 (mg/dL) | n | p |
|--------------------------|--------------------------------|-------------------|----|-------------------|----|--------------------------|
| Grupo Pediátrico | CT | 235,44±67,465 | 10 | 281,92±33,318 | 12 | 0,051 [Ⓜ] |
| | c-LDL | 173,778±67,076 | 10 | 29,95±219,25 | 12 | 0,049[Ⓜ] |
| | c-HDL | 47,556±12,350 | 10 | 47,83±6,739 | 12 | 0,952 [Ⓜ] |
| | TG | 79,667±33,151 | 10 | 81,17±49,673 | 12 | 0,722 [Ⓟ] |
| Grupo dos Adultos | CT | 207,25±45,959 | 4 | 328,58±85 | 12 | 0,018[Ⓜ] |
| | c-LDL | 136,00±42,973 | 4 | 250,42±74,335 | 12 | 0,026[Ⓜ] |
| | c-HDL | 51,75±12,945 | 4 | 50,83±11,408 | 12 | 0,453 [Ⓜ] |
| | TG | 91,00±32,455 | 4 | 137,42±53,577 | 12 | 0,129 [Ⓟ] |

Ⓜ- Testes T (paramétricos); Ⓟ - Teste Mann-Whitney (não paramétricos); estatisticamente significativo: p<0,05.

4.5. DOENÇA CARDIOVASCULAR

Dos indivíduos da amostra com mutação (índex e familiares), apenas 7,44%, isto é 9 em 121 indivíduos, tiveram, pelo menos, um episódio de doença cardiovascular (DCV). Estes indivíduos pertencem ao grupo dos adultos (11,39% da amostra de indivíduos adultos), sendo que 3 são casos índex e os restantes 6, familiares, a média de idade do primeiro evento cardiovascular é de 48±13 anos, sendo 1 indivíduo do sexo feminino e 8 do sexo masculino. Os diversos tipos de DCV encontrados, assim como a frequência de cada tipo estão descritos na figura 4.12. Dos indivíduos adultos sem DCV, 35 são do sexo feminino e 35 do sexo masculino, com média de idades 43±13.

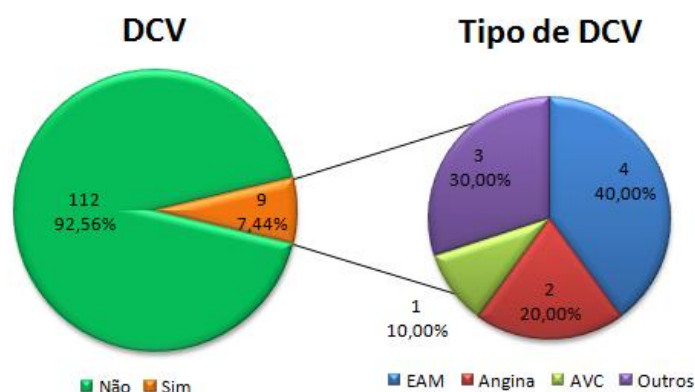


Figura 4.12 – gráfico representativo da frequência de indivíduos com FH e com doença cardiovascular e tipo de doença cardiovascular presente na amostra. Legenda: DCV - doença cardiovascular; EAM – enfarte agudo do miocárdio; AVC – acidente vascular cerebral.

- **A FH como factor de risco cardiovascular**

A FH é comprovadamente um factor de risco cardiovascular na medida em que os valores de CT, c-LDL, sdLDL, apoB, apoB/apoAI e não-HDL/HDL estão aumentados e do c-HDL reduzidos, promovendo assim um perfil lipídico de maior risco cardiovascular (tabela 4.15). Tal resultado foi observado quando se compararam os valores plasmáticos destes lípidos entre indivíduos familiares com diagnóstico molecular de FH e indivíduos familiares da amostra nos quais não foi detectada a alteração pesquisada.

Tabela 4.15 - diferenças observadas em diversos parâmetros bioquímicos entre indivíduos familiares com mutação causadora de FH e sem mutação causadora de FH.

| Parâmetro Bioquímico (mg/dL)* | | Crianças | n | Adultos | n |
|-------------------------------|---------------------|--------------------------|----|--------------------------|----|
| CT | Com FH ^a | 285,50±54,804 | 20 | 320,12±88,634 | 43 |
| | Sem FH ^b | 197,13±48,898 | 8 | 212,57±46,553 | 44 |
| | p | 0,001[§] | | 0,000[§] | |
| c-LDL | Com FH ^a | 219,05±56,378 | 19 | 228,45±79,785 | 31 |
| | Sem FH ^b | 122,50±41,172 | 8 | 130,08±39,871 | 40 |
| | p | 0,000[§] | | 0,000[§] | |
| c-HDL | Com FH ^a | 50,56±11,618 | 18 | 52,32±13,278 | 31 |
| | Sem FH ^b | 59,00±11,314 | 8 | 56,20±17,720 | 41 |
| | p | 0,085 [§] | | 0,554 [§] | |
| TG | Com FH ^a | 110,22±72,644 | 18 | 119,07±73,348 | 30 |
| | Sem FH ^b | 85,25±52,117 | 8 | 130,90±80,373 | 41 |
| | p | 0,232 [§] | | 0,488 [§] | |
| sdLDL | Com FH ^a | 34,556±13,151 | 15 | 47,667±25,544 | 46 |
| | Sem FH ^b | 26,243±8,442 | 6 | 33,405±21,120 | 34 |
| | p | 0,024[§] | | 0,002[§] | |
| ApoB | Com FH ^a | 124,300±32,749 | 20 | 130,460±42,919 | 63 |
| | Sem FH ^b | 74,125±22,087 | 8 | 91,983±29,241 | 58 |
| | p | 0,001[§] | | 0,000[§] | |
| ApoB/ApoAI | Com FH ^a | 0,928±0,316 | 20 | 1,199±2,224 | 63 |
| | Sem FH ^b | 0,537±0,167 | 8 | 0,649±0,427 | 58 |
| | p | 0,003[§] | | 0,000[§] | |
| Não-HDL/HDL | Com FH ^a | 5,179±1,524 | 10 | 5,783±2,307 | 12 |
| | Sem FH ^b | 2,656±1,091 | 4 | 2,232±1,297 | 5 |
| | p | 0,013[§] | | 0,003[§] | |

§- Testes T (paramétricos); § - Teste Mann-Whitney (não paramétricos); estatisticamente significativo: p<0,05.

*-valores bioquímicos sem medicação;

^a indivíduos familiares da amostra com mutação causadora de FH

^b indivíduos familiares da amostra que não apresentam mutações nos genes LDLR, APOB ou PCSK9.

- **Marcadores bioquímicos de risco cardiovascular**

Quando se comparou a presença de DCV com o perfil Lipoprint, observou-se que 5 dos indivíduos com presença de DCV apresentava um perfil Lipoprint tipo A e 4 indivíduos um perfil não indicativo de tipo A. Todos estes indivíduos já se encontravam a tomar medicação quando se realizou a sua caracterização bioquímica. Com base nestes resultados, a relação entre o tipo de perfil Lipoprint e a presença de DCV apresenta um p=0,191 (estatisticamente não significativo) pela aplicação de testes paramétricos (teste T).

Relativamente ao genótipo APOE, observou-se que 8 dos casos que apresentam DCV têm o genótipo E3/E3 e 1 dos casos, genótipo E3/E4. Desta forma, aplicando um teste chi-quadrado, a relação entre o genótipo APOE e a presença de DCV apresenta um p=0,732 (estatisticamente não significativo).

Compararam-se ainda os parâmetros comumente utilizados como marcadores de risco cardiovascular – apoB, Lp(a), sdLDL, Não-HDL/HDL e apoB/apoAI – com a presença/ausência de DCV. Os resultados estão descritos na tabela 4.16.

Tabela 4.16 - marcadores de risco cardiovascular e presença de doença cardiovascular nos indivíduos com FH

| Adultos | | | | | | | | | | | | |
|---------|--------------------|----|--------------------|----|--------------------|----|---------------------|----|--------------------|----|--------------------|----|
| DCV | ApoB (mg/dL) | n | Lp(a) (mg/dL) | n | sdLDL (mg/dL) | n | Não-HDL/HDL (mg/dL) | n | ApoB/ApoAI (mg/dL) | n | Idade média (anos) | n |
| Sim | 136,67±29,93 | 9 | 51,58±48,79 | 9 | 45,73±22,939 | 9 | 10,931 | 1 | 1,11±0,377 | 9 | 48±13 | 9 |
| Não | 132,58±43,39 | 69 | 54,11±49,66 | 69 | 49,61±27,759 | 48 | 5,99±2,67 | 18 | 1,18±2,674 | 69 | 42±15 | 68 |
| p | 0,516 ^φ | | 0,731 ^φ | | 0,743 ^φ | | 0,144 ^φ | | 0,131 ^φ | | 0,033 ^φ | |

φ - Teste Mann-Whitney (não paramétricos); estatisticamente significativo: p<0,05.

Analisando os valores de Lp(a) da amostra estudada neste trabalho, com base nos valores de referência, foi possível determinar a distribuição dos indivíduos relativamente a este parâmetro, estando os resultados representados na figura 4.13.

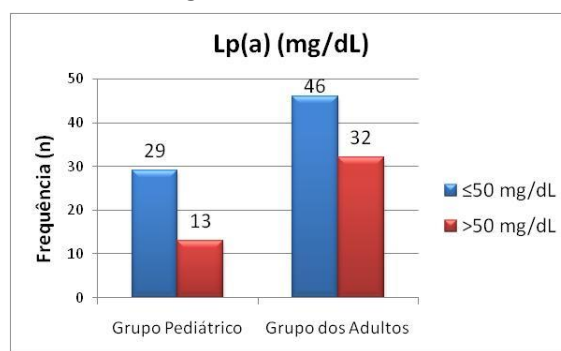


Figura 4.13 – gráfico representativo da distribuição dos indivíduos da amostra com FH com base na sua concentração de Lp(a) plasmática.

• Lipoproteína(a) como factor de risco cardiovascular

Uma vez que na literatura está descrita uma forte associação entre os níveis de Lp(a) e a presença de DCV, foi efectuada ainda uma análise a todos os casos índice já estudados no EPHF, já que a amostra estudada neste trabalho é relativamente pequena.

Dos 607 casos índice estudados, apenas 88 apresentam DCV (23,78% da amostra de indivíduos adultos), não existindo nenhum indivíduo do grupo pediátrico com DCV. A distribuição do grupo dos adultos por género dos indivíduos com e sem DCV está representada na figura 4.14. No total de índice estudados 225 apresentavam FH geneticamente comprovada (85 do grupo pediátrico e 140 do grupo dos adultos).

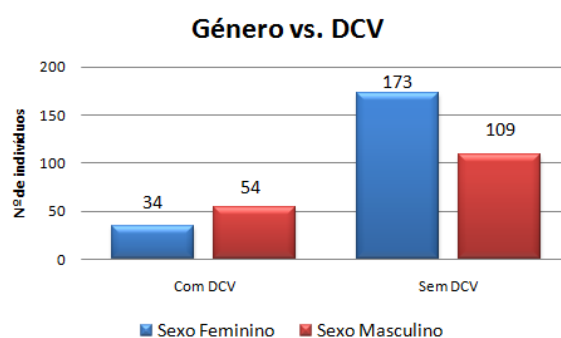


Figura 4.14 – gráfico representativo do número de índice adultos com e sem DCV distribuídos pelo sexo.

Compararam-se os valores plasmáticos de Lp(a) (mg/dL) entre indivíduos com FH e sem FH (tabela 4.17) e entre indivíduos com DCV e sem DCV (tabela 4.18), obtendo-se um resultado estatisticamente significativo apenas no último caso.

Tabela 4.17 - valores de Lp(a) em mg/dL nos grupos pediátrico e dos adultos com e sem FH.

| Lp(a) (mg/dL) | Grupo Pediátrico | n | Idade | n | Grupo dos Adultos | N | Idade | n |
|---------------|--------------------|-----|--------------------|-----|--------------------|-----|--------------------|-----|
| Com FH | 49,409±51,642 | 82 | 10±4 | 85 | 58,770±59,543 | 122 | 44±15 | 135 |
| Sem FH | 57,907±62,255 | 140 | 10±3 | 149 | 60,108±61,929 | 204 | 45±13 | 226 |
| P | 0,511 ^φ | | 0,493 ^φ | | 0,839 ^φ | | 0,324 ^φ | |

φ - Teste Mann-Whitney (não paramétricos); estatisticamente significativo: p<0,05.

Tabela 4.18 - valores de Lp(a) em mg/dL nos grupos pediátrico e dos adultos com e sem doença cardiovascular.

| Lp(a) (mg/dL) | Grupo Pediátrico | n | Idade | n | Grupo dos Adultos | N | Idade | n |
|---------------|------------------|-----|-------|-----|--------------------|-----|--------------------|-----|
| Com DCV | - | - | - | - | 78,550±71,918 | 80 | 53±13 | 87 |
| Sem DCV | 55,050±58,774 | 220 | 10±4 | 231 | 53,447±55,729 | 246 | 42±13 | 274 |
| P | - | | - | | 0,001 ^φ | | 0,000 ^φ | |

φ - Teste Mann-Whitney (não paramétricos); estatisticamente significativo: p<0,05.

Comparam-se ainda as diferenças existentes nos valores plasmáticos de Lp(a) entre indivíduos com e sem DCV, em indivíduos com FH (tabela 4.19) e sem FH (tabela 4.20), sendo os resultados estatisticamente significativos em ambos os casos.

Tabela 4.19 - valores de Lp(a) em mg/dL nos grupos pediátrico e dos adultos com FH com e sem doença cardiovascular.

| Lp(a) (mg/dL) | Grupo Pediátrico | n | Idade | n | Grupo dos Adultos | n | Idade | n |
|---------------|------------------|---------------|-------|------|--------------------|----|--------------------|----|
| Com FH | Com DCV | - | - | - | 81,697±73,614 | 33 | 57±12 | 37 |
| | Sem DCV | 49,402±51,642 | 82 | 10±4 | 50,270±51,310 | 89 | 39±12 | 98 |
| | p | - | - | - | 0,020 ^φ | | 0,000 ^φ | |

φ - Teste Mann-Whitney (não paramétricos); estatisticamente significativo: p<0,05

Tabela 4.20 - valores de Lp(a) em mg/dL nos grupos pediátrico e dos adultos sem FH com e sem doença cardiovascular.

| Lp(a) (mg/dL) | Grupo Pediátrico | n | Idade | n | Grupo dos Adultos | n | Idade | n |
|---------------|------------------|---------------|-------|------|--------------------|-----|--------------------|-----|
| Sem FH | Com DCV | - | - | - | 76,340±71,420 | 47 | 50±12 | 50 |
| | Sem DCV | 58,406±62,568 | 138 | 10±3 | 55,248±58,167 | 157 | 43±13 | 176 |
| | p | - | - | - | 0,022 ^φ | | 0,002 ^φ | |

φ - Teste Mann-Whitney (não paramétricos); estatisticamente significativo: p<0,05.

É ainda referido [38] que a presença de DCV nos familiares directos (1º grau) – pais ou filhos – é igualmente importante considerar os valores de Lp(a) como um factor de risco, dado que a Lp(a) é maioritariamente condicionada por factores genéticos. Desta forma, nos indivíduos sem doença cardiovascular foram comparados os valores plasmáticos desta lipoproteína nos indivíduos cujos familiares em primeiro grau apresentam ou não doença cardiovascular (tabela 4.21).

Tabela 4.21 - valores de Lp(a) em mg/dL nos grupos pediátrico e dos adultos sem DCV comparando a presença/ausência de doença cardiovascular nos familiares em 1º grau.

| Lp(a) (mg/dL) | Grupo Pediátrico | n | Idade | n | Grupo dos Adultos | n | Idade | n |
|---------------|---------------------|--------------------|-------|--------------------|--------------------|-----|--------------------|-----|
| Sem DCV | Fam 1º Grau Com DCV | 63,800±58,094 | 25 | 10±3 | 73,222±68,879 | 72 | 44±12 | 77 |
| | Fam 1º Grau Sem DCV | 53,912±59,066 | 194 | 10±4 | 45,405±47,229 | 173 | 41±13 | 195 |
| | P | 0,360 ^φ | | 0,911 ^φ | 0,005 ^φ | | 0,022 ^φ | |

φ - Teste Mann-Whitney (não paramétricos); estatisticamente significativo: p<0,05. (Legenda: Fam – familiares)

Quando se fez o mesmo tipo de comparação, adicionando ainda a variável FH observou-se que no grupo pediátrico as diferenças observadas não eram estatisticamente significativas. Porém, no

grupo dos adultos, observou-se apenas um resultado significativo quando os casos índice não apresentavam genótipo de FH (Tabelas 4.22 e 4.23).

Tabela 4.22 - valores de Lp(a) em mg/dL nos grupos pediátrico e dos adultos sem FH e sem DCV comparando a presença/ausência de doença cardiovascular nos familiares em 1º grau.

| | Lp(a) (mg/dL) | Grupo Pediátrico | n | Idade | N | Grupo dos Adultos | n | Idade | n |
|-------------------|---------------------|--------------------|-----|--------------------|-----|--------------------|-----|--------------------|-----|
| Sem FH Sem DCV | Fam 1º Grau Com DCV | 72,077±54,505 | 13 | 10±3 | 13 | 76,841±73,739 | 44 | 45±12 | 46 |
| | Fam 1º Grau Sem DCV | 56,984±63,629 | 124 | 10±3 | 132 | 46,841±46,669 | 113 | 43±13 | 130 |
| | P | 0,330 ^φ | | 0,857 ^φ | | 0,022 ^φ | | 0,249 ^φ | |

φ - Teste Mann-Whitney (não paramétricos); estatisticamente significativo: p<0,05. (Legenda: Fam – familiares)

Tabela 4.23 - valores de Lp(a) em mg/dL nos grupos pediátrico e dos adultos com FH e sem DCV comparando a presença/ausência de doença cardiovascular nos familiares em 1º grau.

| | Lp(a) (mg/dL) | Grupo Pediátrico | n | Idade | n | Grupo dos Adultos | n | Idade | n |
|-------------------|---------------------|--------------------|----|--------------------|----|--------------------|----|--------------------|----|
| Com FH Sem DCV | Fam 1º Grau Com DCV | 54,833±62,881 | 12 | 10±4 | 12 | 67,536±61,331 | 28 | 43±13 | 31 |
| | Fam 1º Grau Sem DCV | 48,471±49,944 | 70 | 10±4 | 73 | 42,700±44,622 | 60 | 37±12 | 65 |
| | P | 0,748 ^φ | | 0,951 ^φ | | 0,072 ^φ | | 0,016 ^φ | |

□ - Testes T (paramétricos); φ - Teste Mann-Whitney (não paramétricos); estatisticamente significativo: p<0,05. (Legenda: Fam – familiares)

4.6. TERAPÊUTICAS

Foi estimado o número de indivíduos índice e familiares da amostra com FH que estavam sob medicação e/ou dieta (tabela 4.24).

Tabela 4.24 – frequência de indivíduos índice e familiares dos grupos pediátricos e adultos com FH que tomam medicação e/ou fazem dieta.

| | Índice | | | | Familiares | | | |
|---------------|----------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------|-----|----------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------|-----|
| | Grupo Pediátrico (n _{total} =22) | | Grupo dos Adultos (n _{total} =16) | | Grupo Pediátrico (n _{total} =20) | | Grupo dos Adultos (n _{total} =63) | |
| | Sim | Não | Sim | Não | Sim | Não | Sim | Não |
| Medicação (n) | 5 | 17 | 15 | 1 | 6 | 14 | 37 | 26 |
| Dieta (n) | 5 | 17 | 0 | 16 | 3 | 17 | 0 | 63 |

As diferenças nos valores plasmáticos dos principais parâmetros bioquímicos à data de diagnóstico quando se comparam no grupo pediátrico e no grupo dos adultos os indivíduos que tomam e não tomam medicação encontram-se descritas na figura 4.15.

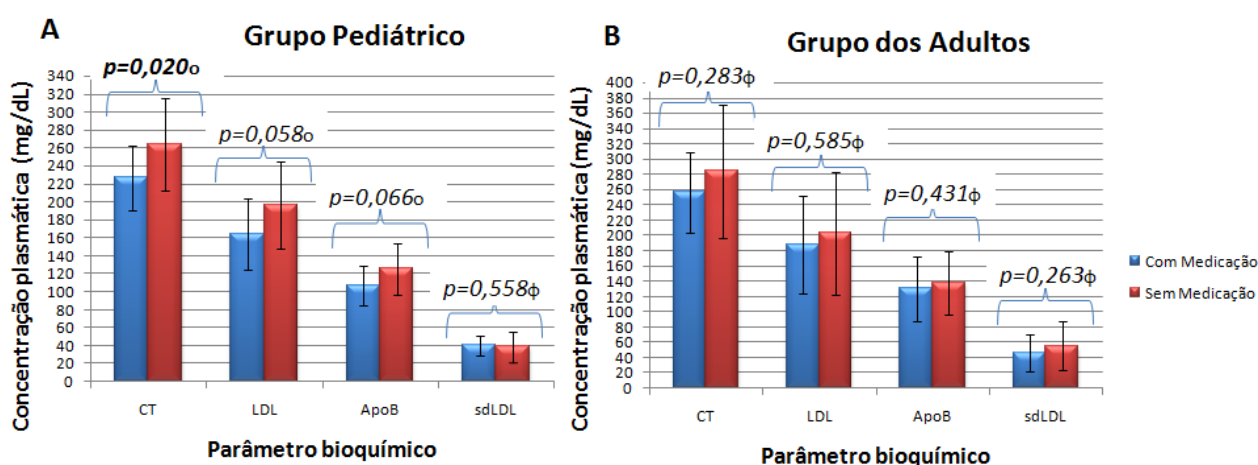


Figura 4.15 - diferenças entre parâmetros bioquímicos no grupo pediátrico e no grupo dos adultos com e sem medicação.

Foi determinada a distribuição dos indivíduos adultos, com mutação, que estavam sob medicação, pelos respectivos valores de CT e c-LDL (tabela 4.25). Observou-se que apenas 1 indivíduo adulto apresenta um valor de CT inferiores a 170 mg/dL e 3 apresentam um valor inferior a 100 mg/dL (valores recomendados para indivíduos com alto risco de desenvolver uma DCV).

Tabela 4.25 – número de indivíduos adultos com mutação e em medicação distribuídos pelos valores de colesterol total e colesterol LDL.

| | | Grupo dos adultos | |
|-------------|---------|-------------------|----------------|
| | | Índex (n) | Familiares (n) |
| CT (mg/dL) | ≤ 170 | 0 | 1 |
| | 171-190 | 0 | 3 |
| | 191-220 | 2 | 6 |
| | >220 | 12 | 23 |
| LDL (mg/dL) | < 70 | 0 | 0 |
| | 70-99 | 1 | 2 |
| | 100-115 | 0 | 2 |
| | >115 | 13 | 33 |

Nos indivíduos com mutação e medicados, determinou-se ainda o tipo de terapêutica utilizado nos diferentes grupos estudados, observando-se que as estatinas são as mais comuns (figura 4.15).

Devido à pequena dimensão da amostra não é possível ver se existem diferenças estatisticamente significativas dentro de cada grupo, comparando com os diferentes tipos de terapêutica aplicada. É importante ainda referir que 7 efectuem já uma terapêutica combinada de estatinas e ezetimiba, tal como indicado na figura 4.16.

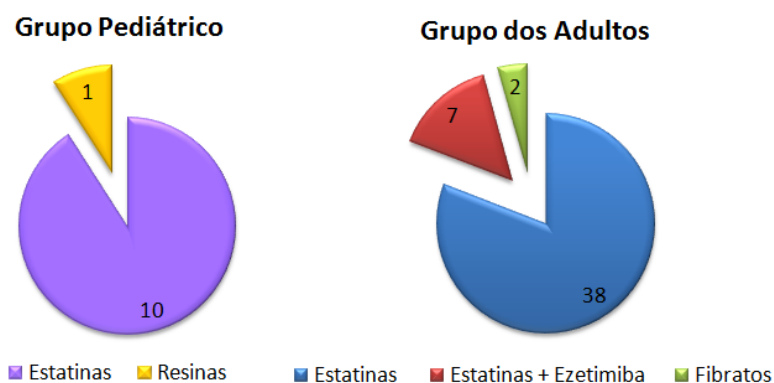


Figura 4.16 - distribuição dos tipos de medicação nos indivíduos com mutação.

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

No âmbito do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar (EPHF), neste trabalho foi realizado o *Cascade screening*, durante aproximadamente 12 meses, tendo sido recebidos 106 familiares, de 45 casos índice, nos quais havia sido encontrada uma alteração genética eventualmente responsável pelo fenótipo de hipercolesterolemia observado. A estes indivíduos foi efectuado o estudo bioquímico e ainda o estudo molecular através da pesquisa da alteração que havia sido detectada no CI de cada família. Desta forma, foi possível identificar alterações em 69 (65,09%) dos familiares estudados. Porém, apenas 66 destes indivíduos (62,26% dos indivíduos estudados durante este período) foram considerados como novos doentes com FH, dado os restantes 4 familiares apresentarem alterações de patogenicidade duvidosa, sendo necessários estudos funcionais que comprovem o efeito destas alterações na função da proteína.

Dado que em algumas destas famílias o estudo familiar já havia sido iniciado, o número de total de familiares considerados para a amostra deste trabalho compreende 149 indivíduos.

5.2. ANÁLISE MOLECULAR

Apenas 2 famílias das 45 estudadas, tal como se observa na tabela 4.2, apresentavam alterações já descritas como patogénicas no gene APOB, correspondendo a 4,44% da amostra.[86, 98] Sabe-se que alterações neste gene são raramente encontradas na população portuguesa, sendo que até 2010 apenas 2% dos casos identificados com FH apresentavam alterações neste gene [52] indo a frequência obtida de encontro ao esperado.

Por sua vez, em 15,56% das famílias estudadas não foi possível identificar uma causa genética responsável pelo fenótipo observado, pelo menos não sem mais estudos. Aos casos índice (CI) 10098, 11215 e 12037, após estudo molecular completo, apenas foram detectadas as alterações referidas na tabela 4.2 e cuja patogenicidade não está descrita na literatura. Desta forma, não foi possível justificar o fenótipo observado nesta família. Por sua vez, nos CI 29105, 26043 e 12021, cujo estudo molecular completo foi também realizado, apenas foram detectadas alterações que não parecem influenciar a função da proteína sintetizada. Estes casos serão discutidos posteriormente.

Em 80% das famílias foi detectada uma alteração no gene LDLR causadora de hipercolesterolemia familiar, justificando o fenótipo observado. Este resultado vai de encontro ao esperado, pois tal como foi descrito em 2010, alterações no gene LDLR são as mais comuns, incluindo em Portugal.[52]

Desta forma, foram considerados 83 familiares e 38 casos índice com mutação causadora de FH, excluindo da análise estatística os indivíduos das famílias cujas alterações detectadas não estão ainda descritas na literatura ou têm patogenicidade duvidosa.

5.2.1. ALTERAÇÕES NÃO DESCRITAS/PATOGENICIDADE DUVIDOSA

A designação de mutação pode ser definida como qualquer alteração na sequência genómica que origina alterações estruturais na proteína sintetizada, afectando o fenótipo. Para serem consideradas mutações, têm de obedecer a alguns critérios, como descrito por Cotton e Scriver (1998).[104]

Alterações numa sequência codificadora (exão) que originem codões STOP prematuros ou alterações na grelha de leitura da proteína, originando uma proteína truncada, são plausíveis de alterarem o fenótipo. Quando se trata da alteração de um aminoácido (alterações *missense*) é importante ver se este é conservado entre espécies. Se o aminoácido que é alterado for conservado entre espécies nessa posição, é provável que apresente uma função importante e a sua alteração provoque alterações na estrutura e função da proteína sintetizada, sendo requeridos estudos funcionais para comprovar a sua patogenicidade.[104]

O estudo da co-segregação da alteração, isto é, quando se observa que indivíduos com o fenótipo alterado apresentam a alteração ao mesmo tempo que esta não está presente em indivíduos cujo fenótipo é normal, é outro dos principais critérios a que uma alteração deve obedecer para ser considerada mutação.[104]

Uma alteração que ocorra em menos de 1% dos alelos numa população é considerada rara, podendo ser causadora de doença, ao contrário dos polimorfismos (encontrados em mais de 1% da população, parecendo não causar doença).[104]

Porém, para confirmar a sua patogenicidade devem, sempre que possível, ser realizados estudos funcionais que permitam observar se existem diferenças na funcionalidade da proteína sintetizada, comparativamente a células que não possuam a alteração em questão.[104]

Todas as alterações não descritas/de patogenicidade duvidosa detectadas na amostra devem então ser sujeitas a análise de forma a verificar se cumprem os critérios acima referidos. Sendo a FH uma patologia autossómica dominante, sabe-se que, cada filho de um indivíduo com FH apresenta 50% de probabilidade de herdar a doença. O *cascade screening* demonstra-se como uma ferramenta útil na avaliação das novas alterações detectadas, permitindo estudar a co-segregação dessas alterações.

- **Caso índice 10098 (Família 513)**

No caso índice 10098 (família 513) foi detectada a alteração c.13158delA (p.Glu4387AsnfsX7) no exão 29 do gene APOB. Pelo método *Cascade screening* foi possível estudar o irmão deste CI que também apresenta a alteração em questão.

Não existem referências na literatura sobre esta alteração nem sobre a sua patogenicidade. Em Portugal, esta foi a única família em que foi detectada. Ainda que esta proteína origine um codão STOP prematuro 7 nucleótidos após a deleção de uma adenina na posição c.13158, esta alteração ocorre já no final do exão 29, último exão que codifica a apoB, sendo difícil prever o seu efeito.[106]

Seria importante observar se esta alteração está presente num painel de 100 indivíduos normolipidémicos e ainda realizar estudos funcionais, nomeadamente com recurso a células U937,

como descrito por Frostegård e a sua equipa em 1990 [106], para confirmar a patogenicidade desta alteração. Estas células não são capazes de sintetizar colesterol (pela ausência de actividade da enzima 3-cetoesteróide reductase), necessitando de internalizar colesterol exógeno para proliferar e se multiplicarem. Desta forma, é possível, através da incubação destas células com partículas LDL dos indivíduos com a alteração na APOB, observar as taxas de crescimento e multiplicação que, caso a alteração seja patogénica, deverão ser inferiores quando comparadas com células que foram incubadas com partículas LDL de indivíduos sem alterações na apoB.[106-107]

Neste CI não foi detectada mais nenhuma alteração nos 3 genes estudados, não tendo sido ainda possível obter nova amostra deste CI para a realização de estudos funcionais. Se através da análise funcional esta alteração não demonstrar ser patogénica, serão necessários mais estudos de forma a compreender se a hiperlipidemia observada tem origem genética ou ambiental.

- **Caso índice 11215 (Família 619)**

No caso do índice 11215 foi detectada a alteração c.2291T>C (p.Ile764Thr) no exão 15 do gene LDLR. Este exão codifica 58 aminoácidos ricos em resíduos de serina e treonina, cuja função se pensa ser a ligação às cadeias de açúcares glicosilados.[108] Porém, em estudos anteriores, a ausência deste exão não demonstrou ter consequências funcionais.[109]

Esta alteração origina a substituição de uma isoleucina por uma treonina, correspondendo a uma alteração *missense*. Desta forma, para afirmar o efeito que esta alteração poderá surtir na proteína, a sua patogenicidade tem de ser testada, segundo descrito por Cotton e Scriver.[104] Através da análise com recurso a três ferramentas bioinformáticas (tabela 4.4) observou-se que esta alteração apresenta uma forte probabilidade de ser tolerada/não patogénica. Para além disso, observou-se ainda que o aminoácido alterado não está conservado entre espécies e, portanto, a sua função não deverá ser essencial. Contudo, esta alteração não estava presente num painel de 100 indivíduos normolipidémicos, isto é, cujos parâmetros bioquímicos se encontram dentro dos limites recomendados (correspondendo a 1% da população portuguesa).

Neste trabalho foi realizado o estudo familiar para avaliação da co-segregação da alteração, que foi detectada no pai e na avó paterna do CI (figura 4.2). Observando o perfil lipídico dos familiares, a alteração parece estar presente nos indivíduos com fenótipo de hipercolesterolemia. Porém, a mãe do CI encontra-se medicada com estatinas, o que pode influenciar a análise (tabela XI.1, anexo XI).

Para avaliar o efeito que esta alteração poderá causar, seria interessante que fossem realizados estudos funcionais com recurso, por exemplo, a células CHO-IIdA7 (linha estável de células de ovário de hamster chinês [CHO] que expressa o LDLR humano) nas quais seria induzida a alteração em estudo através de mutagénese dirigida, permitindo determinar a capacidade de ligação e internalização celular de partículas LDL aos seus receptores LDLR), ou com recurso a linfócitos de indivíduos com essa alteração através de ensaios de citometria de fluxo utilizando LDL marcado. Estes métodos, como descrito em outros estudos, permitem observar actividade das células cujo LDLR está alterado, permitindo determinar a patogenicidade da alteração.[110-111]

- **Caso índice 12037 (Família 670)**

No índice 12037 foi encontrada a alteração c.1802A>T (p.Asp601Val) no exão 12 do gene LDLR, que origina a substituição de um ácido aspártico por uma valina. Este exão faz parte da sequência genómica do *LDLR* que codifica o precursor tipo EGF, cujo domínio é requerido para a dissociação das lipoproteínas do LDLR durante a sua reciclagem, no interior do endossoma. É ainda importante na ligação entre as partículas LDL e o seu receptor na superfície celular dos hepatócitos. Alterações neste exão podem afectar estas funções.[108]

Tal como no caso anterior, esta é uma alteração *missense*. Porém, neste caso o ácido aspártico, que é substituído na posição 601 da sequência proteica, está conservado entre espécies, sugerindo que deve apresentar um papel importante na função da proteína. Para além disso, o resultado da previsão do seu efeito na função da proteína, com recurso a ferramentas bioinformáticas, indicou uma forte probabilidade de a alteração ser patogénica/não ser tolerada (tabela 4.4).

Com o objectivo de estudar a co-segregação da alteração, neste trabalho foi também realizado o estudo familiar aos pais do CI (figura 4.3). A alteração foi detectada no pai, cujo fenótipo é sugestivo de heFH, estando, inclusive a realizar uma terapia combinada de estatinas e ezetimiba (tabela XI.1, anexo XI). Seria então importante estudar mais familiares geneticamente relacionados de modo a verificar se a co-segregação se mantém. Para além disso, assim como foi efectuado no caso anterior, seria importante pesquisar se a alteração está presente num painel de 100 indivíduos normolipidémicos, e efectuar estudos funcionais que permitam observar a patogenicidade da alteração e, desta forma, explicar o motivo da dislipidemia observada nos indivíduos desta família para que possam ser acrescentadas medidas para reduzir o risco cardiovascular.

5.2.2. ALTERAÇÕES EM QUE FOI COMPROVADA A NÃO PATOGENICIDADE

- **Caso índice 29105 (Família 390)**

Na família 390, do caso índice 29105, já havia sido efectuado o estudo familiar, que permitiu detectar a alteração c.-13A>G no promotor do gene LDLR, no irmão e na filha do índice, parecendo co-segregar na família com o fenótipo de hipercolesterolemia (figura 4.4, A e B). No âmbito deste trabalho foi então realizado o estudo funcional através da sequenciação do cDNA do caso índice. Uma outra forma de avaliar a patogenicidade deste tipo de alterações seria por ensaios com luciferase.

Através do estudo do DNA genómico, realizaram-se as três fases do estudo EPHF a este CI, tendo-se detectado apenas a alteração referida. Concomitantemente foram também analisados os polimorfismos (variações de sequência genética com frequência superior a 1% [64, 104]) presentes no gene LDLR, tendo-se observado que na posição c.81 no exão 2 (posição onde existe o polimorfismo SfaNI C>T), este indivíduo apresentava o genótipo C/T (figura 4.4, C2). A presença deste polimorfismo em heterozigotia permitiu testar se a alteração detectada no promotor influenciava a capacidade de expressão do alelo em que estava presente, nomeadamente através da amplificação e sequenciação do fragmento de cDNA que contém os exões 1, 2 e 3 do gene LDLR do CI (contendo o polimorfismo referido).

Dado que através da sequenciação do fragmento de cDNA (figura 4.4 C1) foi possível observar a presença dos dois alelos na zona do polimorfismo referido, pode afirmar-se que ambos os alelos são expressos e portanto, a alteração detectada no promotor não afecta a expressão da proteína (não sendo patogénica).

De facto, num estudo publicado recentemente, esta alteração já tinha sido descrita como não patogénica, através de estudos de predição do efeito *in silico* com recurso a ferramentas bioinformáticas (PolyPhen, PolyPhen 2, SIFT e *Refined* SIFT) e ensaios com Luciferase.[63]

Desta forma não foi possível detectar uma causa genética que justifique a dislipidemia observada. É importante, porém, referir ainda que no caso 29105, o efeito das estatinas permitiu uma redução significativa dos valores plasmáticos de CT e de c-LDL (tabela XI.1 no anexo XI).

A causa responsável pela dislipidemia pode então dever-se a alterações em outros genes envolvidos no metabolismo do colesterol, das quais ainda não se tem conhecimento. Porém, factores ambientais podem também influenciar o perfil lipídico observado. De facto, o IMC (Índice de massa corporal) do caso índice é de 27,24 Kg/m² (excesso de peso) que podem influenciar o fenótipo observado. Relativamente aos outros indivíduos da família não há informação sobre outros factores de risco ambientais.

- **Caso índice 26043 (Família 147)**

Após o estudo molecular do caso índice 26043, a única alteração encontrada foi a c.829G>A (p.Glu277Lys) no exão 6 do gene LDLR. Foi depois efectuado o estudo familiar, tendo-se detectado a mesma alteração no pai (27043) e na irmã (27045). Esta alteração consiste na substituição de um glutamato por uma lisina, na posição 277, que codifica a zona de ligação ao ligando, ocorrendo próxima de um resíduo de cisteína envolvido em pontes de dissulfureto que parecem ser essenciais para a conformação do primeiro domínio proteico.[90] Para além disso, esta alteração parece igualmente co-segregar com o fenótipo de FH nesta família.

Porém, quando foram realizados estudos funcionais *in vitro* (mutagénesis dirigida) a células contendo esta alteração, estas demonstraram essencialmente a mesma ligação, *uptake* e degradação das partículas LDL marcadas quando comparadas com células *wild-type*, isto é, sem alteração. Estes resultados sugerem então que a alteração referida não apresenta efeito na função da proteína.[90]

Segundo os mesmo autores [90], através de estudos funcionais utilizando células CHO-IIdIA7 (células de ovário de hamster chinês sem expressão endógena do LDLR) e partículas LDL marcadas com ¹²⁵I, foi possível observar que, em associação com a alteração c.1205T>C (p.Ile423Thr) no exão 9 do gene LDLR, a alteração c.829G>A afecta o *uptake* e a degradação das partículas LDL. Porém, nenhum dos indivíduos da família apresenta esta alteração, não tendo sido possível determinar uma causa genética para a dislipidemia observada.

É importante referir ainda que nos indivíduos desta família, através da caracterização bioquímica observou-se que apenas o caso índice apresentava valores de CT superiores aos recomendados (346 mg/dL) aquando do seu diagnóstico clínico. Porém, quando as análises foram repetidas, observou-se que este valor reduziu consideravelmente até 158 mg/dL, sem influência de

medicação. Tendo em conta que os pais e a irmã do caso índice também apresentam valores normolipidémicos, ainda que o pai esteja a tomar estatinas (tabela XI.1 no anexo XI) poderá afirmar-se que a dislipidemia observada, pode dever-se a factores ambientais. Para além disso, o caso índice apresenta um IMC de 31,95 Kg/cm² (obesidade grau I) que, por sua vez, proporciona um aumento dos valores plasmáticos de CT e de c-LDL.[7]

- **Caso índice 12021 (Família 665)**

No caso índice 12021 foi detectada a alteração c.90C>T (p.Asn30Asn) no exão 2 do gene LDLR, tendo sido estudados também os genes APOB e PCSK9.

Apesar de ser a primeira vez que esta alteração foi detectada em Portugal, já havia sido descrita como um polimorfismo, dado que a alteração é sinónima, isto é, codifica para o mesmo aminoácido.[102] Porém, não foram ainda realizados estudos funcionais à alteração.

De forma a tentar estudar a co-segregação desta alteração com o fenótipo estudou-se ainda a mãe do caso índice (único familiar que foi possível incluir no estudo), que não apresentava a alteração em questão. Desta forma, seria importante estudar o lado paterno da família de modo a tentar obter resultados acerca da co-segregação da alteração. Dado que a mãe apresenta um perfil bioquímico normolipidémico, caso a alteração seja responsável pelo fenótipo, justifica-se a sua ausência neste indivíduo. Após estudo da co-segregação seria então importante realizar estudos funcionais de forma a aferir o efeito que a alteração pode produzir na proteína. De facto, como referido anteriormente, já foram observados casos em que alterações sinónimas originam alterações no *splicing* da proteína, justificando a importância da realização de estudos funcionais a todas as alterações encontradas.[61]

Note-se que ao CI foi efectuado o estudo molecular a todo o gene LDLR, aos fragmentos dos exões 26 e 29 do gene APOB nos quais se conhecem alterações causadoras de FH, assim como aos 12 exões do gene PCSK9, não tendo sido encontrada mais nenhuma alteração para além da referida.

Desta forma, também nesta família não foi possível determinar uma causa genética responsável pelo fenótipo de hipercolesterolemia observado. Este resultado pode sugerir, mais uma vez, que o fenótipo possa ser causado por alterações em outros genes ainda não conhecidos como causadores de hiperlipidemia ou dever-se a factores ambientais.

5.3. RELAÇÕES GENÓTIPO-FENÓTIPO

O diagnóstico clínico que segue as recomendações descritas na tabela II.1 (anexo II) [79-80] na população portuguesa não é simples de aplicar, pois na maioria dos casos não existe a presença de xantomas e de DCV. Para além disso, muitas vezes também não se tem conhecimento sobre a história familiar de hipercolesterolemia e/ou DCV prematura. É ainda comum que os familiares apresentem fenótipos menos agressivos do que os casos índice e, por isso, recorrendo apenas ao diagnóstico clínico, muitos indivíduos podem não ser diagnosticados. Desta forma, o diagnóstico molecular mostra-se extremamente útil na identificação da FH.[54, 112]

Quando se compararam as médias dos parâmetros bioquímicos entre os grupos índice e familiares nos grupos pediátrico e adultos (tabela 4.4) apenas se observaram diferenças estatisticamente significativas nas concentrações plasmáticas de apoC-III ($p=0,011$) e de apoE ($p=0,019$), no grupo das crianças e nas concentrações de CT ($p=0,049$) e c-LDL ($p=0,044$) no grupo dos adultos, sendo no grupo de familiares que se observam as menores concentrações destes lípidos plasmáticos.

Estes resultados vão, em parte, contra a literatura, dado que se esperava que os familiares apresentassem um fenótipo menos agressivo do que os casos índice, especialmente no grupo pediátrico.[54] De facto, na população portuguesa, quando se analisou toda a amostra de indivíduos diagnosticados com FH até à data, foi observado que os valores de CT e c-LDL entre casos índice e familiares apresentavam diferenças estatisticamente significativas, sendo inferiores nos familiares.[112] Tal foi apenas observado no grupo dos adultos, ainda que as médias em ambos os grupos sejam consideravelmente altas.

Na amostra estudada, não existem também diferenças estatisticamente significativas entre as idades de índice e familiares, nos dois grupos referidos. Desta forma, os factores ambientais não parecem ter influência nos resultados obtidos, principalmente nas crianças, sendo que é defendido que quanto mais novas forem, menor a influência dos factores ambientais no seu perfil lipídico (por haver menos tempo de exposição a estes factores).[54] Deve contudo ter-se em conta que esta análise engloba indivíduos de todas as famílias estudadas, com variados tipos de mutação. Ainda que o fenótipo observado não se deva unicamente ao tipo de mutação, os resultados podem dever-se ao tipo de análise, nomeadamente porque a amostra é consideravelmente pequena, condicionando os resultados obtidos.

É importante referir, porém, que tanto nos casos índice como nos familiares da amostra estudada, os valores plasmáticos médios observados são elevados e o diagnóstico clínico poderia, eventualmente, ser realizado. Contudo, o diagnóstico clínico não compreende apenas a avaliação do perfil lipídico e, na ausência de outras condições poderia supor-se que o perfil bioquímico tivesse origem ambiental. Para além disso, a falta de informação e apoio clínico pode promover a que os indivíduos não sejam diagnosticados.

Dada a variedade de efeitos na funcionalidade que os diferentes tipos de mutação provocam na proteína sintetizada, seria também de esperar que existissem diferenças estatisticamente significativas nos valores dos parâmetros bioquímicos, especialmente de CT e c-LDL plasmáticos. Esperar-se-ia, assim, que na amostra estudada existissem diferenças estatisticamente significativas entre os parâmetros bioquímicos e o tipo de mutação, contudo, tal não se observou, à excepção do valor de c-HDL no grupo dos adultos (tabelas XII.1 e XII.2 no anexo XII). Uma vez que a maioria dos indivíduos da amostra apresenta mutações *missense* e *nonsense*, compararam-se também os valores dos parâmetros bioquímicos apenas entre estes dois tipos de mutação (tabelas XII.3 e XII.4 no anexo XII). Neste caso, apenas o valor de c-LDL no grupo dos adultos apresenta diferenças estatisticamente significativas.

Dado que entre as idades dos grupos estudados também não se observam diferenças estatisticamente significativas, tal resultado pode dever-se, mais uma vez, à dimensão da amostra. Para compreender se o tipo de mutação influencia o perfil lipídico dos indivíduos, seria importante realizar este tipo de análise a uma amostra de dimensões superiores, tal como já foi realizado em Portugal em 2010, a toda a amostra de indivíduos diagnosticados molecularmente até à data.[52] Para além disso, sabe-se que a penetrância das mutações é elevada, observando-se que ambas conduzem a um aumento acentuado dos valores de CT e c-LDL.[54]

A FH apresenta uma elevada variabilidade fenotípica, não só relativamente aos parâmetros bioquímicos observados, mas também à presença de xantomias, ao desenvolvimento da aterosclerose e de doenças cardiovasculares bem como na resposta às terapêuticas. Desta forma, o fenótipo FH é modulado, não só pela mutação causadora da patologia, mas também por outros factores de risco ambientais, como a alimentação, obesidade, entre outros.[30]

Na amostra estudada, apenas 3 indivíduos adultos (2,46% da amostra), com idade média de $44 \pm 8,484$, apresentam xantomias. Dois destes indivíduos foram diagnosticados molecularmente com uma mutação *missense* no gene LDLR. No outro indivíduo com presença de xantomias foram detectadas 3 mutações no gene LDLR (2 *missense* e uma *nonsense*). Confirma-se assim que a presença de xantomias é uma característica importante no diagnóstico clínico destes indivíduos.[54]

O número reduzido de xantomias diagnosticados na população portuguesa pode dever-se a uma menor susceptibilidade que os indivíduos com FH podem apresentar para o seu desenvolvimento, provavelmente devido a influências ambientais. Porém, pensa-se que a principal causa sejam falhas de diagnóstico, nomeadamente porque o exame é dispendioso e os indivíduos, muitas vezes, optam por não o realizar devido a questões financeiras.[65]

Relativamente às doenças cardiovasculares, no grupo de indivíduos estudados, apenas 11,39% dos indivíduos adultos da amostra já haviam sofrido uma DCV, antes de ser molecularmente diagnosticados com FH. Estes resultados serão discutidos mais à frente em 5.6.

Para além de observar os resultados obtidos para a totalidade da amostra é importante também compreender a dinâmica existente dentro de cada família. Nas próximas secções serão descritas algumas famílias que permitiram extrapolar algumas relações entre o genótipo e o fenótipo.

- **Caso índice 99011 (Família 10)**

No caso índice 99011, após estudo molecular, iniciado no ano 1999, foi detectada a alteração c.2054C>T (p.Pro685Leu) no exão 14 do gene LDLR. Esta mutação parece alterar a estrutura da proteína LDLR sintetizada dado que reduz a restrição sobre a flexibilidade da cadeia provocada pela rigidez das ligações peptídicas adjacentes à prolina, estando descrita como pertencente às classes 2/3 da classificação das mutações no LDLR.[87] Desta forma, pela remoção insuficiente de c-LDL do plasma para os hepatócitos, ocorre um aumento plasmático desta lipoproteína, assim como de CT.

No âmbito do *cascade screening*, já havia sido estudado um filho do CI (caso 29229) que primeiramente se disponibilizou para que o seu estudo molecular fosse realizado e cujo resultado foi negativo. Dois irmãos do caso índice já haviam falecido, sendo que um deles havia sofrido um AVC

aos 57 anos de idade e o outro havia colocado um *bypass*, não se sabendo com que idade. Durante o decorrer deste trabalho foram estudados mais 8 indivíduos geneticamente relacionados (figura 4.5). A maior adesão dos familiares poderá dever-se às alterações no contacto com os familiares, que passaram a ser dinamizados por uma enfermeira de investigação com o acordo do CI.

No total estudaram-se 9 familiares, tendo a alteração sido detectada em 5 destes (figura 4.5). Porém, observando a relação entre o genótipo e o fenótipo destes indivíduos, nota-se que a alteração foi detectada em familiares cujo fenótipo não apresenta critérios clínicos de FH (tabela XI.1 no anexo XI).

Sobre esta família, obteve-se depois a informação de que os casos 11143 (sobrinho-neto do CI) e 11140 (sobrinho do CI) são portadores de β -talassémia, patologia que está descrita como causadora de uma redução em cerca de 25% dos valores plasmáticos de c-LDL.[113] Estes indivíduos, porém, apresentam uma concentração plasmática de c-LDL superior a 190 mg/dL, sem tratamento, um valor consideravelmente alto para indivíduos com esta condição, mas baixo para indivíduos com FH que não tomam medicação.

A presença de β -talassémia na família pode justificar a ausência de critérios clínicos de FH nos indivíduos que foram diagnosticados molecularmente. Se o CS não tivesse sido efectuado a esta família era altamente provável que os indivíduos que têm β -talassémia não fossem diagnosticados com FH. Desta forma, mais uma vez, é importante focar a importância da presença de outros factores ambientais na modulação do fenótipo FH.

Os resultados obtidos com o estudo bioquímico e molecular desta família demonstram a dinâmica que existe relativamente ao fenótipo em indivíduos com FH e ainda as dificuldades que existem no diagnóstico clínico de FH. De facto, o caso índice é o indivíduo desta família com o fenótipo mais agressivo, apresentando, sem influência de terapêuticas, um valor plasmático de CT de 541 mg/dL e de c-LDL de 490 mg/dL. No entanto, este indivíduo tem 50 anos, hipertensão e IMC de 32 Kg/m² (obesidade), factores que influenciam o perfil lipídico, o que pode promover as diferenças observadas no seu perfil lipídico, comparando com os restantes indivíduos da família.[7] Este tipo de informação não foi facultada sobre os restantes membros da família, porém, da mesma forma que podem estar a influenciar o perfil lipídico do caso índice, o mesmo pode acontecer nos familiares sem mutação, nomeadamente nos filhos do CI.

Esta família representa a importância e utilidade do *cascade screening*, dado que foi possível estudar todos os familiares geneticamente relacionados em risco, uma vez que, no total, estudaram-se 10 indivíduos na família, sendo que 60% destes foram identificados com FH para além de permitir detectar indivíduos cujo fenótipo estava influenciado pela presença de outra patologia genética, demonstrando a forma como o fenótipo FH pode ser modulado pela presença de outros factores quer sejam genéticos ou ambientais.

- **Caso índice 11061 (Família 579)**

No caso índice 11061 foi detectada a alteração *nonsense* c.1176C>A (p.Cys392X) no exão 8 do gene LDLR, mutação já descrita, que origina uma proteína truncada, uma vez que a alteração origina

um codão STOP (TGA) prematuro, sendo esta uma alteração classificada como pertencente à classe 1 das mutações deste gene.[98]

Esta família é particularmente interessante, dado que, além do caso índice, a sua mãe e o seu tio materno haviam já sofrido 2 episódios de DCV prematuras cada um, tendo ambos já falecido. Também o pai do caso índice já havia falecido à altura do estudo.

O CS foi iniciado aos indivíduos que primeiramente aceitaram ser estudados, os irmãos do caso índice. Dos 3 irmãos estudados, apenas a irmã (caso 11062) apresenta a alteração, cujo filho foi depois estudado e no qual a mesma alteração foi detectada. Durante o tempo em que decorreu este trabalho foi depois ainda possível estudar mais 3 indivíduos da família: os dois filhos do CI (12004 e 12005) e ainda um primo materno (12006), tendo sido a alteração também detectada nos casos 12004 e 12006 (figura 4.6).

Nesta família, é possível observar uma relação entre o genótipo e o fenótipo, na medida em que a maioria dos indivíduos que foram diagnosticados com FH apresentam valores de CT superiores a 300 mg/dL, provavelmente pelo tipo de alteração na proteína que esta mutação produz.

O indivíduo 12004, porém, quando comparado com os restantes familiares diagnosticados com FH, apresenta um fenótipo menos agressivo e, muito provavelmente, passaria despercebido no diagnóstico clínico de FH. De facto, o seu valor plasmático de CT é de 221 mg/dL, não estando a tomar medicação, sendo similar ao da sua irmã, caso 12005, cujo valor plasmático de CT é de 229 mg/dL, mas não apresenta a alteração.

Dado que este resultado suscitava algumas dúvidas, foi pesquisado um pouco mais sobre a envolvimento ambiental destes dois irmãos, tendo-se obtido a informação de que o caso 12005, apresenta IMC > 25 Kg/m², não sabendo porém se é apenas excesso de peso ou já obesidade, para além de não praticar qualquer tipo de desporto ou dieta específica. Porém, o caso 12004 apresenta um IMC normal, pratica desporto regularmente e ainda uma alimentação cuidada, ainda que não cumpra nenhum tipo de dieta específico para a redução dos valores dos lípidos plasmáticos. De facto, comparando os restantes parâmetros bioquímicos (tabela XI.1, anexo XI), o perfil lipídico do caso 12005 parece ter a influência de uma alimentação não cuidada, nomeadamente pelo valor de TG.

Este é um caso que claramente demonstra a importância dos factores ambientais na modulação do perfil lipídico, demonstrando que, não só a presença de FH é um factor de risco. De facto, comparando também o caso 12004 e o caso 11063, que têm idades similares, observa-se que o caso 11063 apresenta valores plasmáticos consideravelmente mais elevados do que o caso 12004 (ambos sem medicação), o que indica que o caso 11063, muito provavelmente não tem qualquer tipo de cuidado no que diz respeito à alimentação ou à prática de desporto.

Porém, quando o caso 11063 repetiu as análises bioquímicas, já após ter iniciado o tratamento com estatinas, denotou-se que o seu CT reduziu consideravelmente, para 148 mg/dL. Este resultado, provavelmente, deve-se não só à acção da terapêutica, mas também à influência de factores ambientais idênticos aos presentes no caso 12006.

Nesta família existem ainda, pelo menos, mais dois indivíduos aos quais seria importante realizar o estudo bioquímico e molecular que, por indisponibilidade dos mesmos, não foi possível realizar. Estes são indivíduos que podem apresentar um elevado risco de desenvolver uma DCV prematura e que, por desconhecimento da sua situação, poderão ter comportamentos que podem aumentar o seu risco cardiovascular.

- **Caso índice 10146 (Família 539)**

A alteração c.1291G>A (p.Ala431Thr) no exão 9 do gene LDLR foi detectada no caso índice 10146, (família 539). Esta alteração pertence à classe 5 da classificação das mutações do gene LDLR, inibindo a libertação da partícula LDLR dos endossomas, impedindo, por sua vez, a sua reciclagem.[95, 109]

Para a pesquisa de alterações no exão 9 do gene LDLR, recorreu-se à técnica de dHPLC. Antes de ser optimizado este método a pesquisa de alterações no nosso grupo de investigação era feita através da sequenciação dos exões 9 e 10, dado o intrão existente entre estes exões ser muito pequeno. Durante a optimização e validação do dHPLC, verificou-se que o conjunto de *primers* utilizados para a amplificação e sequenciação directa deste fragmento não detectava todas as alterações presentes na sequência genómica.

Com recurso a ferramentas informáticas apropriadas verificou-se que o *primer reverse* (9+10F) emparelha numa zona polimórfica, parecendo estar a influenciar a ligação do *primer* à cadeia de DNA e, por sua vez, à redução da efectividade da amplificação por PCR. Desta forma, o resultado da sequenciação pode ficar também comprometido levando a que algumas alterações pudessem não ser detectadas.[114]

Após optimização do dHPLC foi possível verificar que os *primers* actuais utilizados para a amplificação do exão 9 não apresentam esta característica e, portanto, a efectividade no emparelhamento é conseguido. Desta forma o dHPLC tem sido utilizado com sucesso como método de rastreio.[114]

Dado o dHPLC ser um método bastante sensível e específico para a pesquisa de alterações no exão 9, utiliza-se esta metodologia como técnica complementar à sequenciação, permite então observar em que indivíduos se espera detectar uma alteração após sequenciação da mesma amostra de DNA.[82, 115].

O estudo molecular desta família (figura 4.7) foi, então, iniciado pela realização da técnica dHPLC em três indivíduos: a mãe (caso 10147), o pai (caso 10148) e o irmão (caso 10149) do caso índice. Nos três casos obteve-se um perfil alterado, quando comparado com o controlo normal, porém, o perfil do caso 10148 é relativamente diferente do observado nos outros dois casos (figura 4.7 B).

Tal como referido anteriormente, a técnica dHPLC não é utilizada para diagnóstico, sendo apenas informativa da presença de uma alteração no fragmento estudado. Após sequenciação automática, observou-se que os casos 10147 e 10149 apresentavam a mesma alteração que o caso índice. O caso 10148, por sua vez, não apresentava a alteração em questão (figura 4.7, C) mas

apresentava um polimorfismo em heterozigotia na posição c.1187+56C>T no exão 9, que levou a que o perfil obtido pelo dHPLC também apresentasse um perfil alterado.

Dado que a alteração em questão foi encontrada na mãe do CI, estudaram-se ainda os seus avós maternos (casos 10150 e 10151), primeiramente por dHPLC e depois por sequenciação, observando-se que apenas o avô (caso 10151) apresentava a alteração em questão (figura 4.7 B e C). Ainda que seja comum apenas realizar sequenciação automática às amostras cujo resultado do dHPLC é indicativo da presença de uma alteração, sequenciou-se também o DNA do caso 10150 (cujo perfil do dHPLC era normal) para confirmar que o resultado e a efectividade do dHPLC. Através da sequenciação foi possível observar que o caso 10150 é o único indivíduo da família em que o polimorfismo c.1187+56C>T não foi detectado em heterozigotia, justificando o perfil de dHPLC obtido. Desta forma, é importante referir que a eficácia do dHPLC está dependente da zona que se está a estudar, sendo importante que o fragmento a amplificar não possua polimorfismos, para que os perfis obtidos não originem falsos positivos.

Avaliando os valores plasmáticos dos indivíduos 10150 e 10151, ambos a tomar estatinas, esperar-se-ia o resultado obtido, dado que o caso 10151 apresentava valores plasmáticos de CT e c-LDL superiores ao caso 10150, ainda que este tenha sofrido um AVC aos 38 anos. Nos pais do caso índice (casos 10147 e 10148), avaliando apenas o perfil lipídico, não seria possível identificar, sem estudo molecular, qual dos dois apresentava a alteração pois a concentração plasmática de c-LDL é relativamente idêntica nos dois indivíduos (tabela XI.1, anexo XI).

Dado que no pai do CI não se detectou a alteração referida, não foi realizado o estudo molecular dos seus avós paternos, uma vez que o estudo familiar deve ser feito por gerações para assegurar a sua eficácia laboral e monetária.

No CI, apenas se detectou a alteração referida no gene LDLR, mesmo após ter sido efectuado o estudo molecular completo também aos genes APOB e PCSK9. Porém, dado o perfil lipídico observado no pai do caso índice, seria interessante seguir a evolução destes indivíduos no que diz respeito ao efeito das terapêuticas e, caso existam mais familiares plausíveis de ser estudados, também avaliá-los, dado que, a dislipidemia observada poderá ter influência ambiental, ou ser causada por uma outra mutação que não tenha sido detectada no caso índice (que o pai pode ter herdado e não ter transmitido ao caso índice ou em outro gene não estudado, por exemplo).

- **Caso índice 28069 (Família 289)**

No caso índice 28069, após estudo completo dos 18 exões e promotor do gene LDLR, não foi detectada nenhuma alteração. Quando se realizou a fase II do estudo, isto é, a pesquisa de grandes rearranjos do gene LDLR através da técnica MLPA (descrita em 3.3.9), observou-se que existia uma grande deleção deste gene em heterozigotia, desde o promotor ao exão 2 [93] e ainda do exão 8 ao exão 12 [64]. Esta técnica, ao contrário do dHPLC, é utilizada para diagnóstico, dado que permite saber qual a alteração responsável pelo fenótipo. Este tipo de alteração pertence à classe 1, segundo a classificação das mutações do gene LDLR.[85]

Nesta família, cujo início de diagnóstico molecular teve início no ano 2008, primeiramente foram estudados os progenitores do caso índice (casos 28070 (mãe) e 28071 (pai)), tendo sido detectada a

alteração no caso 28070. Este resultado vai de encontro ao esperado na medida em que o indivíduo 28070 apresentava um perfil lipídico normal, (tabela XI.1, anexo XI).

Durante a realização deste trabalho foram recebidos e estudados os avós paternos do caso índice (casos 11347 [avô] e 11348 [avó]), tendo sido a mesma alteração detectada em ambos os casos (figura 4.8). De facto, observando o perfil lipídico indicado à data do estudo, ambos apresentam um perfil de hipercolesterolemia (tabela XI.1, anexo XI).

Para além do perfil lipídico dos indivíduos que foram estudados, é importante ter em conta a história familiar. De facto, sabe-se terem existido 3 mortes prematuras na família (tios paternos do caso índice), duas delas de causa desconhecida e uma, aos 13 anos, referida como causada por problemas no sangue e presença de xantomas tendinosos e nas nádegas. Muito provavelmente, a causa de morte deste indivíduo tão prematuramente poderá ter estado relacionado com a acumulação excessiva de CT e c-LDL desde o nascimento, dado que poderá ter herdado a mutação de ambos os progenitores, tendo FH homozigota. De facto, em indivíduos homozigotos é comum ocorrerem DCVs ainda na primeira década de vida. Tendo em conta a idade do indivíduo, na altura em que faleceu os médicos que seguiram o caso podiam não ter o conhecimento que existe hoje sobre estas patologias e modos de actuação das mesmas.

Provavelmente os outros dois indivíduos que também morreram prematuramente, poderiam igualmente ter FH em homozigotia que, como já referido, pode levar a que os indivíduos tenham valores plasmáticos de CT 4 vezes superiores do que indivíduos sem FH, podendo atingir mais de 800 mg/dL.

Caso o diagnóstico de FH tivesse sido efectuado previamente aos casos 11347 e 11348, talvez estas três mortes pudessem ter sido evitadas, pelo menos tão precocemente, através da aplicação de medidas terapêuticas adequadas capazes de evitar o aparecimento de DCVs nestes indivíduos pelo menos até à idade adulta.

- **Caso índice 26061 (Família 156)**

O estudo molecular do caso índice 26061, que teve início no ano 2006, levou à detecção de 3 mutações no gene LDLR, duas *missense* c.631C>G (p.His211Asp) no exão 4, c.1816G>T (p.Ala585Ser) no exão 12 e uma *nonsense* c.1178delA (p.Lys372ArgfsX20) no exão 8, tendo então sido diagnosticado com FH heterozigotia composta.[65] Alterações no exão 4 podem alterar a capacidade de ligação ao ligando, estando por isso classificadas na classe 3. Por sua vez, a alteração *missense* no exão 12 e a alteração *nonsense* no exão 8 parecem influenciar a dissociação das lipoproteínas do seu receptor nos endossomas, dado que ocorrem na zona homóloga ao EGF.[108]

Foi descrito que o índice 26061 é o único caso descrito em Portugal que apresenta um fenótipo homozigoto típico, ainda que o seu genótipo não o seja.[65] As mutações no gene LDLR apresentam uma relação dosagem-efeito, logo, indivíduos homozigotos e heterozigotos compostos (com alterações diferentes, nos dois alelos) tendem a apresentar um fenótipo mais agressivo, quando comparados com indivíduos heterozigotos, justificando-se o resultado observado.

Porém, para além do seu genótipo, sabe-se que este indivíduo, ainda que pratique exercício físico, é fumador, consumindo cerca de 20 cigarros por dia, e apresenta um IMC de 25,02 kg/m²,

mostrando uma tendência para o excesso de peso. A interação entre estes factores pode propiciar o desenvolvimento das doenças cardiovasculares, sendo que este indivíduo sofreu um episódio de EAM aos 23 anos. Desta forma, pode referir-se que, efectivamente, existem factores moduladores do fenótipo de FH. Para confirmar esta teoria e estratificar mais eficazmente o risco cardiovascular destes indivíduos, mais estudos são necessários, nomeadamente pelo estudo de indivíduos homozigotos que, segundo a frequência estimada (1:1 milhão), serão 10 na nossa população.

Os pais do caso índice, casos 11319 e 11320 foram estudados (figura 4.9) neste trabalho e, após estudo molecular, observou-se que a mãe (caso 11319) apresenta as duas alterações *missense*, c.631C>G (p.His211Asp) no exão 4, c.1816G>T (p.Ala585Ser) no exão 12 do gene LDLR. O pai (caso 11320), por sua vez, apresenta a alteração *nonsense* c.1178delA (p.Lys372ArgfsX20) no exão 8 do mesmo gene.

Ainda que este indivíduo não entre na análise estatística deste trabalho, no âmbito no CS e do EPHF foi importante, dado que permitiu estudar mais 2 indivíduos em risco, existindo ainda um irmão que deveria ser estudado pois apresenta 75% de probabilidade de ter FH. Para além disso, o índice 26061 demonstra a importância de estudar sempre a totalidade do gene LDLR, dado poderem ser detectadas alterações em vários exões no mesmo gene. Para além disso, o estudo desta família permite compreender a dinâmica das mutações, nomeadamente a forma como afectam o fenótipo.

5.4. GENÓTIPO APOE

Na amostra de indivíduos com mutação, relativamente à genotipagem do *APOE*, observou-se que o alelo mais frequente é o alelo $\epsilon 3$, seguindo-se o alelo $\epsilon 4$ e, por fim, o alelo $\epsilon 2$, como descrito na tabela 4.6. Desta forma, o genótipo mais comum é o $\epsilon 3/\epsilon 3$ (tabela 4.7). Este resultado vai de encontro a outros estudos já realizados em Portugal e na Europa.[23, 37]

Analisando as médias das concentrações dos lípidos plasmáticos distribuídas pela presença de pelo menos cada um dos alelos do gene *APOE*, no grupo pediátrico observa-se que os valores de CT e c-LDL parecem superiores nas crianças que apresentam, pelo menos um alelo $\epsilon 4$. Já os triglicéridos (maioritariamente transportados pelas VLDL), estão em concentrações inferiores às observadas na presença dos outros alelos. O resultado inverso parece ocorrer na presença de pelo menos um alelo $\epsilon 2$ (tabela 4.8). Ainda que as diferenças observadas não sejam estatisticamente significativas, este resultado vai de encontro ao esperado, estando descrito que quando se comparam os valores plasmáticos de CT e de c-LDL com os diferentes alelos deste gene denota-se que, a presença de pelo menos um alelo $\epsilon 2$ está associada a valores plasmáticos inferiores, quando comparado à presença de um alelo $\epsilon 3$. O contrário acontece na presença do alelo $\epsilon 4$ que parece estar associado a uma remoção preferencial das VLDL e, consequentemente a valores mais elevados de c-LDL, assim como a menores concentrações de TG.[23, 34-35]

No grupo dos adultos, porém, apenas se denotam pequenas diferenças nos valores plasmáticos de CT e c-LDL, estando ligeiramente aumentados na presença do alelo $\epsilon 3$ (tabela 4.8). Este facto, para além do superior número de indivíduos que apresentam este alelo, pode dever-se à maior heterogeneidade da amostra relativamente à idade (44 ± 15) enquanto o grupo pediátrico é mais

homogéneo ($10,67 \pm 4,160$). Também factores ambientais, como a alimentação e o sedentarismo podem influenciar estes resultados, uma vez que nas crianças os factores ambientais não apresentam, regra geral, uma influência tão significativa.[54]

Contudo, o tamanho da amostra não permite afirmar a presença de qualquer tipo de associação entre um determinado alelo e as concentrações dos parâmetros bioquímicos. A continuidade deste estudo seria importante para compreender estas relações e permitir uma melhor estratificação do risco cardiovascular, nomeadamente através do estudo desta associação em todos os indivíduos referenciados ao EPHF.

5.5. ESTRATIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS *SMALL-DENSE* LDL: LIPOPRINT (QUANTIMETRIX) VS. DAYTONA (RANDOX)

Para além de estudar o perfil lipídico de um indivíduo, o estudo das subfracções de LDL parece ser útil na estratificação do seu risco cardiovascular. De facto, tem sido descrito que quanto mais densas e pequenas forem as LDL presentes em circulação no plasma, maior parece ser o seu potencial aterogénico e, consequentemente, maior o risco cardiovascular dos indivíduos.[38]

É importante referir que esta análise não foi efectuada à totalidade da amostra dado que alguns dos indivíduos com mutação foram diagnosticados molecularmente antes de se ter iniciado este estudo bioquímico no EPHF, daí as diferenças observadas no número de indivíduos em cada grupo.

Para a estratificação do tamanho e densidade das partículas de LDL presentes numa amostra de soro realizou-se a técnica Lipoprint (*Quantimetrix*), descrita em 3.2.2. Esta técnica origina resultados sob a forma de lipidogramas (figura 4.11), indicativos do perfil lipídico na amostra em questão – Perfil A (maioritariamente subfracção maiores e menos densas) ou Perfil não indicativo de A (presença de subfracções de menor tamanho e maior densidade).

Na amostra de indivíduos com mutação estudados neste trabalho, observou-se que 19 indivíduos do grupo pediátrico (10 casos índice e 9 familiares) e 43 do grupo dos adultos (10 casos índice e 33 familiares) apresentavam “Perfil A”. Por sua vez, 10 indivíduos do grupo pediátrico (5 casos índice e 5 familiares) e 16 do grupo dos adultos (2 casos índice e 14 familiares) apresentam um “Perfil não indicativo de tipo A” (figura 4.10). Assim, do número total de indivíduos aos quais foi possível efectuar a técnica Lipoprint, 65,51% dos indivíduos do grupo pediátrico e 72,88% do grupo dos adultos não parecem ter um perfil de risco cardiovascular, relativamente à presença de sdLDL (apresentam perfil A). Porém, cerca de 50% dos indivíduos da amostra total estão medicados, o que pode influenciar estes resultados.

A técnica Lipoprint utiliza um corante lipofílico que se liga proporcionalmente ao colesterol presente nas lipoproteínas. Após a migração estar completa, a área relativa das bandas de cada lipoproteína é determinada e multiplicada pela concentração de colesterol total da amostra, de modo a determinar a concentração de colesterol em cada banda, isto é, em cada fracção. Desta forma, o *software* origina o valor (em mg/dL) do CT presente em cada uma das fracções presentes na amostra, tal como se observa na figura 4.11, representando as diferenças obtidas entre um perfil A (A) e de um perfil não indicativo de A (B).

Comparando as diferenças entre as concentrações obtidas através desta técnica, relativamente ao tipo de perfil obtido (tabela 4.10), tanto no grupo pediátrico, como no grupo dos adultos, observou-se que os indivíduos com perfil A apresentam concentrações de colesterol sempre inferiores à observada nos indivíduos com perfil não indicativo de A, sendo a diferença entre as concentrações estatisticamente significativa, mesmo considerando indivíduos medicados.

Esta técnica parece ser útil como um método avaliativo da proporção das várias subfracções lipoproteicas, porém, não parece ser aceitável no que diz respeito à avaliação do tamanho absoluto das LDL.[116] Para além disso, no que diz respeito à quantificação das sdLDL, esta técnica parece não ter valor preditivo, dado apenas quantificar estequiometricamente o CT presente em cada subfracção. É consideravelmente importante, para além de determinar o seu tamanho, quantificar as partículas sdLDL presentes em circulação. De facto, avaliando apenas o tamanho das partículas de sdLDL, ao contrário da sua concentração, não parece estar associado à concentração de c-LDL. Assim, quanto maior for a concentração de sdLDL, maior a concentração de c-LDL e maior o potencial aterogénico, promovendo um maior desenvolvimento da aterosclerose.[117-118]

Através do analisador automático Daytona (Randox), procedeu-se à quantificação das sdLDL através de métodos químicos e enzimáticos, como explicado em 3.2.3. Esta técnica foi realizada em amostras de soro colhido no mesmo dia das utilizadas na técnica Lipoprint, estando os resultados obtidos descritos na tabela 4.11. Quando se comparou os resultados da quantificação obtida na técnica Daytona relativamente com o perfil obtido através da técnica Lipoprint, apenas se observaram diferenças estatisticamente significativas quando se comparou a concentração de sdLDL e o tipo de perfil Lipoprint no grupo dos adultos.

De facto, a expressão das sdLDL tem influência de factores ambientais, como a idade, o sexo e a alimentação, e ainda de factores genéticos. Para além disso, não é independente das concentrações dos outros lípidos, nomeadamente níveis elevados de triglicéridos.[11, 117-119] Desta forma, seria de esperar que existissem relações estatisticamente significativas também no grupo pediátrico.

Porém, a dimensão da amostra do grupo pediátrico é inferior à amostra do grupo dos adultos, podendo influenciar a análise. Para além disso, tal como descrito na tabela 4.9, no grupo dos adultos observa-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre as idades dos indivíduos com cada tipo de perfil Lipoprint (sendo superior nos indivíduos com perfil não indicativo de A) o que, por sua vez, pode também influenciar os resultados. Para além disso, mais de 50% dos indivíduos adultos está medicado e apenas cerca de 26% das crianças toma medicação para reduzir os seus valores de lípidos plasmáticos, que pode ter influência no resultado.

Tentou perceber-se se a toma de medicação influenciava a concentração de sdLDL. No grupo pediátrico denota-se que a maioria dos indivíduos não toma medicação e apresenta valores plasmáticos de sdLDL superiores a 35 mg/dL. No grupo dos adultos, ainda que a maioria dos indivíduos tome medicação, também apresenta maioritariamente valores plasmáticos de sdLDL superiores a 35 mg/dL. Observou-se ainda que não existem diferenças estatisticamente significativas entre a concentração de sdLDL e a toma de medicação, independentemente do tipo de perfil Lipoprint (tabela 4.12). Porém, é necessário ter em consideração o reduzido tamanho da amostra.

No entanto, estes resultados podem dever-se ao facto de grande parte dos indivíduos da amostra estar medicado com estatinas que, ainda que sejam eficazes na redução dos valores plasmáticos de c-LDL, parecem não ter o efeito desejado nas sdLDL ou podem não estar a ser aplicada a dose necessária para doentes com FH. Num estudo realizado em 2010 [120], é referido que o efeito das estatinas pode, inclusive, aumentar a proporção de sdLDL enquanto reduz os níveis plasmáticos de subfracções de tamanho superior, que apresentam maior afinidade para o LDLR. Porém, existem terapêuticas, como as niacinas e os fibratos, que parecem ser mais eficazes na redução da concentração de sdLDL, assim como uma dieta adequada e a prática regular de exercício físico.[117]

Dado que as sdLDL são também responsáveis pelo transporte de colesterol, é de esperar que indivíduos com maiores concentrações de sdLDL apresentem também, concentrações mais elevadas de CT. Concomitantemente, indivíduos com maiores concentrações de sdLDL, apresentando um perfil não indicativo de A, tendem a apresentar também concentrações mais elevadas de c-LDL e triglicéridos. Está descrito [121-122] que na ausência/diminuição dos LDLR, como acontece na FH, observa-se um aumento dos níveis de VLDL. Quando a concentração de VLDL está elevada (quando a concentração de TG também está elevada), os triglicéridos podem ser transferidos para as LDL que, por sua vez, podem ser hidrolisadas a sdLDL pela enzima *lipase hepática*. O mesmo pode acontecer às partículas de HDL e, quanto mais pequenas forem estas lipoproteínas, mais rapidamente são removidas de circulação, conduzindo a uma redução do seu nível plasmático.

Procedeu-se então à comparação dos valores plasmáticos de CT, c-LDL, c-HDL e TG entre os grupos com cada tipo perfil Lipoprint e ainda com os grupos de indivíduos que apresentam valores de sdLDL superiores ou inferior ao valor de referência de 35 mg/dL, na amostra de indivíduos com FH.[38] Dado a medicação tomada pelos indivíduos em estudo ter acção na redução dos níveis plasmáticos destes lípidos, para esta análise apenas se consideraram os indivíduos que não estão sob a influência de terapêuticas.

Ainda que, comparando pelo tipo de perfil lipoprint, se observe, em ambos os grupos, que os indivíduos com perfil não indicativo de A apresentam concentrações mais elevadas de CT, c-LDL e TG, as diferenças observadas apenas são estatisticamente significativas para os TG no grupo pediátrico e para o CT no grupo dos adultos (tabela 4.13). Teoricamente era esperado que existissem diferenças significativas entre as concentrações plasmáticas destes lípidos em ambos os grupos. A ausência deste resultado poderá justificar-se pela não homogeneidade na distribuição dos indivíduos por cada perfil lipoprint (que é superior no tipo de perfil A) acoplado à reduzida dimensão da amostra.

Relativamente à análise efectuada entre os indivíduos que apresentam concentrações de sdLDL superiores ou inferiores a 35 mg/dL, obtidas pela técnica Daytona, a distribuição dos valores plasmáticos destes parâmetros bioquímicos segue a mesma tendência. Contudo, apenas o c-LDL no grupo pediátrico apresenta diferenças estatisticamente significativas. No grupo dos adultos, por sua vez, observam-se diferenças significativas entre as concentrações de CT e c-LDL (tabela 4.14). Para além do tamanho da amostra, a própria análise realizada pode estar na origem dos resultados obtidos. De facto, o limite de 35 mg/dL é referido como o valor desejável em indivíduos adultos, não

existindo nenhum valor especificado para o grupo pediátrico, sendo que a utilização deste valor de referência não seja adequado para a análise pretendida neste grupo de indivíduos.[38]

No perfil não indicativo de A é esperado que a concentração de sdLDL seja superior à observada no perfil A e, desta forma, seria de esperar que os resultados obtidos por ambas as técnicas fossem equiparáveis. Porém, tal relação linear não é observada nos indivíduos em estudo.

Dado que tanto a detecção de sdLDL, como a determinação da sua concentração são importantes para a estratificação do risco cardiovascular, seria importante compreender se os resultados obtidos se devem à amostra em questão ou a motivos relacionados com as técnicas referidas. Compreende-se que, efectivamente, o Lipoprint não pode ser utilizado como uma técnica quantitativa, originando apenas a estratificação das subfracções do perfil lipídico assim como, através de cálculos estequiométricos, a concentração de CT presente em cada subfracção. Porém, deveria ser possível obter uma relação entre o tipo de perfil Lipoprint com a quantificação obtida pelo Daytona. Esta relação foi obtida num estudo publicado recentemente, tendo sido demonstrado haver correlação entre estas duas técnicas numa população normolipidémica.[123] No entanto, tal ainda nunca foi observado em amostras de indivíduos com distúrbios do metabolismo lipídico.

Neste sentido, mais estudos são necessários, recorrendo a amostras mais homogêneas e de dimensões superiores de forma a poder, inclusive, criar subgrupos (nomeadamente pelo género) que sejam mais representativos da população e assim obter conclusões relativamente à utilidade de ambas as técnicas, quer individualmente, quer como complemento uma da outra na avaliação do risco cardiovascular dos indivíduos com FH.

5.6. DOENÇA CARDIOVASCULAR (DCV)

As DCV são doenças complexas e multifactoriais e, desta forma, a sua compreensão passa pela associação de diversos factores genéticos e ambientais, quer fixos ou modificáveis que, de algum modo, podem influenciar o seu aparecimento e a sua gravidade, bem como a capacidade de recuperação.

Está já descrito que o aparecimento de doenças cardiovasculares em indivíduos com heFH é altamente variável em termos da idade dos indivíduos, sofrendo a influência do perfil lipídico do indivíduo, bem como da presença ou ausência de outros factores de risco cardiovasculares. Também a gravidade dos eventos cardiovasculares é altamente variável nestes indivíduos pelo mesmo motivo. Sabe-se, porém, que nos indivíduos com heFH, a idade média do primeiro evento cardiovascular é de 40 anos nos homens e 50 nas mulheres.[11, 38]

Na amostra estudada, apenas 11,39% dos indivíduos adultos já haviam sofrido uma doença cardiovascular (figura 4.12) e cuja média de idade do primeiro evento é de 48 ± 13 anos, sendo este número relativamente inferior ao anteriormente observado no EPFH (17% de indivíduos com FH em 2010 [52]).

A amostra em estudo apresenta, porém, algumas características que podem justificar os resultados observados. A amostra de indivíduos adultos com FH que não apresenta DCV tem uma média de idades (de diagnóstico da FH) de 43 ± 15 . Desta forma, estes indivíduos, caso não sejam

medicados eficazmente, podem ainda desenvolver uma DCV a curto-prazo, estando dentro da idade média comum de desenvolvimento das DCVs em indivíduos com heFH.

Outro factor importante é o sexo dos indivíduos, sendo que 50% dos indivíduos adultos sem DCV são do sexo masculino e 50% do sexo feminino. Neste ponto, a amostra é bastante homogénea. Porém, sabe-se que as mulheres, regra geral, apresentam maior probabilidade de desenvolver uma doença cardiovascular após a menopausa, (que surge, geralmente, depois dos 50 anos) devido à redução dos níveis de estrogénios, que parecem ser um factor protector para o desenvolvimento das DCVs. Assim, a ausência de DCV na amostra poderá, em parte, ser compreendida.

Em indivíduos com heFH, é comum observarem-se fenótipos com valores de CT cerca de duas vezes superiores aos valores da população em geral, variando entre os 290 e 500 mg/dL. No caso da amostra em questão, a média dos valores de CT no grupo dos adultos $264,22 \pm 67,460$ (valores à data de diagnóstico de FH) sendo que destes, 65,4% dos indivíduos, estavam já medicados. Caso se considera-se o valor de CT indicado sem medicação, seria, de $332,53 \pm 88,364$, mais favorável ao desenvolvimento da aterosclerose e suas consequências. Uma vez que os indivíduos iniciaram a toma de medicação precocemente, o valor médio de CT nestes indivíduos é inferior aos valores comuns em indivíduos com heFH, reduzindo o seu risco cardiovascular.

A influenciar estes resultados podem estar ainda outros factores biológicos e ambientais que podem condicionar o fenótipo observado e, consequentemente, o aparecimento de doenças cardiovasculares. Sobre a amostra em estudo, apenas existia a informação sobre a presença de outros factores de risco relativamente aos casos índice (21% da amostra total de adultos), sendo impossível garantir que os resultados obtidos tenham realmente uma justificação biológica, não estando falseados pelo reduzido tamanho da amostra.

Relativamente à dieta, nenhum indivíduo do grupo dos adultos refere estar a realizar um regime alimentar específico para a redução dos seus valores lipídicos. No entanto, se for considerado que Portugal é um dos países que pratica o tipo de dieta mediterrânica, na qual se consomem alimentos com características cardio-protectoras (por exemplo, ricos em ómega-3), estes resultados podem ser, em parte, compreendidos. De facto, este tipo de dieta tem sido associada a menores, ainda que consideravelmente preocupantes, taxas de incidência de DCVs, comparando com outros países que não praticam este tipo de alimentação.[124]

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre ter um determinado perfil Lipoprint e a presença de DCV, bem como associações entre a presença de um determinado alelo do gene APOE e um maior risco de desenvolver uma DCV. Estes resultados podem, mais uma vez, ser influenciados pelo reduzido tamanho da amostra, não permitindo extrapolar co-relações.

- **A FH como factor de risco cardiovascular**

Um dos objectivos deste trabalho focou-se na avaliação/confirmação da FH como um factor de risco cardiovascular. Para tal, foram comparadas as médias dos parâmetros bioquímicos na amostra de familiares com mutação com as médias dos parâmetros bioquímicos na amostra de familiares sem mutação nos genes estudados.

Foi possível observar na amostra pediátrica e de adultos que, exceptuando o c-HDL e os TG em ambos os grupos, os parâmetros bioquímicos analisados apresentam diferenças estatisticamente significativas, sendo inferiores nos indivíduos sem FH, tal como se observa na tabela 4.15.

Este resultado vai de encontro ao esperado, na medida em que os indivíduos com heFH tendem a acumular colesterol desde o nascimento e a apresentar valores cerca de duas vezes superiores aos indivíduos normolipidémicos, como já referido. Sabe-se que valores plasmáticos de LDL aumentados, por longos períodos de tempo, podem ter grande influência no desenvolvimento da aterosclerose e, por consequência, das DCVs. De facto, a redução da capacidade de o fígado catabolizar as partículas de c-LDL, leva a que o tempo de vida destas lipoproteínas no plasma seja prolongado, aumentando a sua susceptibilidade à oxidação. As LDL oxidadas, por sua vez, influenciam o endotélio vascular dado que se acumulam no mesmo, conduzindo à redução do diâmetro das artérias e, até mesmo, o seu bloqueio, tal como explicado em 1.1.2.

Relativamente ao c-HDL, é importante referir que os seus valores são dependentes não só de factores ambientais e do sexo dos indivíduos, mas também do efeito combinado de alguns polimorfismos em genes envolvidos no seu metabolismo. Associados à pequena dimensão da amostra, a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de familiares com FH e sem FH poderá ser compreendida.[125]

A concentração plasmática de triglicéridos, não é, regra geral, muito elevada em indivíduos com FH, estando já descrito que o metabolismo deste lípido plasmático não parece alterado em indivíduos com FH, justificando assim os resultados obtidos.[121]

Uma vez que os indivíduos com FH apresentam concentrações dos lípidos plasmáticos superiores aos indivíduos sem FH, é então de esperar que estes, caso não sejam controlados, possam desenvolver mais prematuramente uma DCV. Porém, nota-se que mesmo os indivíduos sem FH na amostra estudada apresentam valores de CT e c-LDL relativamente aumentados, segundo as recomendações para a população em geral (anexo I, tabela I.1), sendo este um resultado consideravelmente preocupante. Ainda que a amostra seja pequena, pode representar que a população portuguesa apresenta o perfil lipídico como um factor de risco cardiovascular e, desta forma, deveriam ser tomadas medidas para avaliar e melhorar o estado de saúde da nossa população.

- **Marcadores bioquímicos de risco cardiovascular**

Para além dos parâmetros bioquímicos comumente utilizados para avaliar o perfil lipídico, existem alguns marcadores bioquímicos que estão a ser estudados como potenciais marcadores de risco cardiovascular. A avaliação de todo o conjunto de marcadores bioquímicos permite quantificar mais eficazmente o risco de um dado indivíduo. De entre estes marcadores cardiovasculares consideram-se a quantificação das partículas apoB, a razão entre as partículas apoB e apoA-I e a razão entre as moléculas não-HDL e as HDL. Também a determinação da concentração plasmática de sdLDL e da Lp(a) parecem ser indicadores do risco cardiovascular.

Na tentativa de compreender a utilidade da avaliação destes marcadores de risco, compararam-se os valores médios de cada um dos parâmetros referidos no grupo de indivíduos adultos com

doença cardiovascular com o grupo de indivíduos adultos sem doença cardiovascular. Porém, em nenhum dos parâmetros se observaram diferenças estatisticamente significativas (tabela 4.16). Dado que a amostra compreende apenas 9 indivíduos com DCV, os resultados obtidos podem dever-se à pequena dimensão da amostra e não à real relação entre os marcadores de risco e a presença de DCV. Para avaliar a relação entre os marcadores e a DCV, seria necessário aumentar o número de indivíduos estudados. Posteriormente discute-se cada um dos parâmetros referidos.

- **Concentração plasmática de ApoB e rácio ApoB/ApoA-I**

As apolipoproteínas B fazem parte da constituição das VLDL, IDL e LDL (lipoproteínas com potencial aterogénico), servindo de ligando entre estas e o seu receptor celular. Desta forma, a quantificação das partículas apoB parece ser preditiva na avaliação do risco cardiovascular, permitindo estimar qual a concentração total destas lipoproteínas no plasma. Indivíduos com elevado risco cardiovascular, nomeadamente indivíduos com FH, devem apresentar concentrações de apoB inferiores a 100 mg/dL.[38]

Porém, quando se compararam as diferenças existentes nos indivíduos com FH entre os grupos com DCV e sem DCV, denotou-se que a média da concentração de apoB em ambos é superior ao valor recomendado, sendo relativamente superior nos indivíduos que apresentam DCV.

As apolipoproteínas A-I, por sua vez, são constituintes das HDL e parecem actuar como cofactor para a lecitina colesterol:aciltransferase (LCAT, *lecithin-cholesterol acyltransferase*), desempenhando um papel importante na esterificação do colesterol livre nas partículas de HDL. A quantificação da apoA-I providência uma estimativa da concentração plasmática da HDL que deve ser superior a 120 mg/dL nos homens e a 140 mg/dL nas mulheres.[38]

O rácio apoB/apoA-I combina informação de risco associado às duas lipoproteínas, sendo recomendado como uma alternativa à análise do risco cardiovascular.

Ainda que na amostra estudada não tenha sido possível observar diferenças estatisticamente significativas, denotou-se que em ambos os grupos, o valor do rácio obtido é superior a 1, o que indica que a concentração de apoB nestes indivíduos é superior à concentração de apoA-I. Desta forma, parece que os indivíduos da amostra apresentam um potencial aterogénico aumentado.

- **Rácio não-HDL/HDL**

A quantificação das partículas não-HDL permite estimar o número total de partículas aterogénicas presentes no plasma, reflectindo a quantificação de lipoproteínas contendo apoB. A sua avaliação, que se baseia na diferença entre a concentração de CT e a concentração de c-HDL é importante, nomeadamente em indivíduos com hiperlipidemias familiares que, regra geral, apresentam valores reduzidos de c-HDL e valores aumentados de c-LDL. Para além disso, este parâmetro é ainda importante na avaliação de indivíduos com níveis de TG moderadamente elevados, na medida em que uma concentração elevada de partículas VLDL pode conduzir a um aumento do potencial aterogénico das LDL e à redução do potencial cardio-protector das HDL.[38, 126]

Desta forma, a quantificação das partículas não-HDL, origina uma estimativa do número total de partículas aterogénicas, parecendo ser mais informativo quanto ao risco cardiovascular, do que a avaliação da concentração do c-LDL individualmente. O resultado da razão entre as partículas não-HDL e as partículas HDL, permite observar qual o balanço existente entre as partículas aterogénicas e as partículas protectoras, originando informações sobre o risco cardiovascular.[127-128]

Na amostra estudada, observa-se que, ainda que sem significância estatística, os valores obtidos para este rácio são superiores nos indivíduos com DCV. Este rácio é importante uma vez que quanto maior o seu resultado, maior a concentração de partículas aterogénicas presentes.

Os dois rácios referidos originam informações semelhantes, sendo a predição do risco cardiovascular dada por cada um, também idêntico. Para fins de diagnóstico ou como alvos terapêuticos, os componentes que os compõe devem ser, porém, considerados em separado.[38]

- **Concentração plasmática de sdLDL**

A importância das sdLDL como factor de risco cardiovascular foi já descrita em 5.5. Nesta análise os resultados obtidos vão contra o esperado, na medida em que no grupo de indivíduos sem DCV a média da concentração plasmática de sdLDL é superior à observada no grupo de indivíduos com DCV. Todavia, na medida em que a amostra de indivíduos com DCV é consideravelmente mais pequena do que a amostra de indivíduos sem DCV, e não se tendo obtido diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, não se pode afirmar que os resultados obtidos tenham algum significado biológico. É importante referir que os indivíduos com DCV já se encontravam a tomar medicação, podendo também influenciar os resultados, como referido em 5.5.

- **Concentração plasmática de Lipoproteína(a)**

A lipoproteína(a) [Lp(a)] tem sido diversas vezes descrita como um factor de risco cardiovascular adicional devido às suas propriedades trombogénicas e aterogénicas, independentemente de factores como a idade, a dieta, a actividade física ou o sexo, apesar de os mecanismos em que actua não estarem ainda totalmente elucidados. Os níveis plasmáticos desta lipoproteína são particularmente determinados pelo tamanho da apo(a) que, por sua vez, é determinado a nível genético.[40]

Segundas as normas internacionais para o controlo das dislipidemias [38], as concentrações plasmáticas de Lp(a) devem ser consideradas sempre em pessoas com elevado risco de desenvolver uma doença cardiovascular, como é o caso de indivíduos com hipercolesterolemia familiar, ou quando existe história familiar de doenças cardiovasculares prematuras, sendo o valor de referência desejável inferior a 50 mg/dL.[38] Na figura 4.13 observa-se, porém, que na amostra estudada 39,74% dos indivíduos adultos e 30,92% dos indivíduos do grupo pediátrico apresentam valores plasmáticos de Lp(a) superiores a 50 mg/dL

Na amostra estudada observou-se ainda que os indivíduos sem DCV apresentam uma concentração plasmática desta lipoproteína relativamente superior aos indivíduos com DCV, indo também este resultado contra o esperado, provavelmente pelas mesmas razões referidas para os outros factores.

Em todas as análises referidas, os resultados podem ainda ter influência na diferença de idades observada entre os grupos com e sem DCV, cuja diferença é estatisticamente significativa (tabela 4.16), não se podendo por de parte a importância da idade como factor de risco cardiovascular, observando-se idades superiores nos indivíduos com DCV.

Em suma, ainda que não se tenham obtido resultados estatisticamente significativos nesta análise, a avaliação individual destes marcadores de risco parece permitir determinar mais eficazmente o perfil de risco cardiovascular dos indivíduos, na medida em que, como já referido, o aparecimento das DCVs é dependente de um conjunto de factores que interagem entre si, e a presença de valores de risco para estes marcadores parece influenciar o desenvolvimento das DCVs. Note-se ainda que a concentração plasmática destes parâmetros está aumentada nos indivíduos da amostra com FH, comparativamente ao grupo de indivíduos da amostra sem FH (tabela 4.15). Assim, conjugam-se diversos factores de risco cardiovascular que devem ser tidos em conta na prevenção das DCVs.

- **Lipoproteína(a) como factor de risco cardiovascular**

Dado que na literatura está descrita uma forte associação entre os valores plasmáticos desta lipoproteína e o desenvolvimento das DCVs, foram avaliados todos os casos índice já estudados pelo EPHF.

Dos 607 casos índice estudados, 225 apresentavam genótipo FH (85 do grupo pediátrico e 140 do grupo dos adultos) e 88 já haviam sofrido um episódio de DCV (23,78% dos indivíduos adultos da amostra).

Quando se compararam individualmente as diferenças existentes na concentração de Lp(a) entre indivíduos com e sem FH, observou-se que estas não eram significativas, quer no grupo pediátrico, quer no grupo dos adultos (tabela 4.17). Porém, quando se comparou com a presença/ausência de DCV, as diferenças nos valores plasmáticos de Lp(a) já eram estatisticamente significativas, sendo superiores nos indivíduos com DCV (tabela 4.18). Note-se que, quando se compara indivíduos com DCV, apenas se refere indivíduos adultos uma vez que não há crianças (idade igual ou inferior a 17 anos) com DCV.

Para tentar perceber se a FH teria alguma influência nos valores plasmáticos de Lp(a), testaram-se as diferenças entre indivíduos com e sem DCV nos grupos com FH e sem FH (tabelas 4.19 e 4.20, respectivamente). Neste caso, em ambas as análises obteve-se um resultado estatisticamente significativo onde indivíduos com DCV apresentam valores plasmáticos mais elevados. Desta forma, parece que o risco cardiovascular relacionado com a Lp(a) é independente do genótipo FH, mas parece ser um marcador de risco cardiovascular adicional à dislipidemia causada pela FH.

Como referido, os valores plasmáticos de Lp(a) são maioritariamente determinados por factores genéticos. Assim, as concentrações desta lipoproteína devem ser igualmente tidas em conta como um marcador de risco cardiovascular em indivíduos cujos familiares em primeiro grau (pais e/ou filhos) sofreram uma doença cardiovascular prematura. Desta forma, foi testada a hipótese de existirem diferenças estatisticamente significativas entre os valores plasmáticos de Lp(a) de

indivíduos sem DCV, que tinham, ou não, familiares em primeiro grau que já haviam sofrido uma DCV. Neste caso, os resultados obtidos foram estatisticamente significativos apenas no grupo dos adultos, ainda que nos índices cujos familiares apresentam DCV, a concentração de Lp(a) seja superior (tabela 4.21).

Curiosamente, quando se adicionou a variável FH à análise anterior, observou-se que, independentemente dos indivíduos do grupo pediátrico terem ou não FH as diferenças nos seus valores plasmáticos de Lp(a), comparando a presença/ausência de DCV nos familiares, não são estatisticamente significativas. (tabelas 4.22 e 4.23) Este resultado poderá dever-se à percentagem de indivíduos do grupo pediátrico cujos familiares apresentam DCV ser apenas de 11,42%, sendo por isso, difícil comparar os dois grupos. Porém, também nesta análise se observa que os valores plasmáticos de Lp(a) são superiores nos CI cujos familiares já tiveram uma DCV.

Apenas no grupo dos adultos sem DCV e sem FH se observaram diferenças estatisticamente significativas (tabelas 4.22), parecendo este resultado indicar que a Lp(a) é, de facto, um factor de risco cardiovascular independente.

Contudo, há que notar que, exceptuando no grupo de indivíduos sem FH e sem DCV (tabela 4.22), existem também diferenças estatisticamente significativas entre a idade dos indivíduos adultos em que se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os valores de Lp(a). Porém, a idade referida é idade de diagnóstico de FH e não idade do primeiro evento cardiovascular, denotando-se que indivíduos com DCV ou com familiares com DCV apresentam idades mais elevadas. Ainda que os valores de Lp(a) estejam descritos como praticamente independentes da idade do indivíduo, esta é um factor preditivo no que diz respeito ao desenvolvimento das DCV (quanto maior a idade, maior o risco), podendo influenciar os resultados obtidos.

Dado que no grupo de indivíduos sem DCV e sem FH (tabela 21.4), a diferença entre as idades dos casos índice não é significativa, sendo-o, no entanto, entre os valores plasmáticos de Lp(a), é possível presumir que a concentração de Lp(a) parece estar realmente associada a um maior risco de DCV, independentemente do genótipo FH.

Quando se analisa o sexo dos indivíduos, observa-se que 55,95% dos indivíduos sem DCV são do sexo feminino (figura 4.14), o que pode justificar as diferenças observadas entre as idades, dado que, como referido, as mulheres tendem a desenvolver DCVs em idades mais tardias que os homens.[7]

Os resultados obtidos com esta análise parecem ir de encontro à literatura. São necessárias, porém, mais análises na tentativa de elucidar o significado dos resultados, principalmente devido à idade dos indivíduos. Para além disso, sabendo que a concentração plasmática de Lp(a) é fortemente determinada pelo tamanho da sua apolipoproteína [apo(a)], cuja determinação é genética, seria importante realizar o estudo genético do gene LPA (quantificação por PCR em tempo real para genotipagem do gene LPA, permitindo depois correlacionar a concentração de Lp(a) da amostra e o tamanho da proteína sintetizada). Desta forma seria possível confirmar que, tal como descrito na literatura, maiores concentrações de Lp(a) parecem estar associadas a moléculas apo(a) de menores dimensões que, por sua vez, parecem apresentar um maior potencial trombogénico e aterogénico, propiciando o desenvolvimento de DCVs.[40-42, 46]

Ainda que não haja, uma terapêutica adequada para a redução dos níveis plasmáticos de Lp(a), a prevenção e/ou adequação do tratamento de outros factores de risco cardiovascular apresentam influência no controlo da Lp(a) como factor de risco. Note-se que quanto mais factores de risco individuais, maior o risco de um indivíduo desenvolver uma DCV. Assim, conhecendo os factores de risco presentes num dado indivíduo mais facilmente se opta pela estratégia de prevenção adequada.[129]

5.8. TERAPÊUTICAS

A redução dos valores de CT e c-LDL assim como o aumento dos níveis de c-HDL, quer através da aplicação de terapêuticas, ou por medidas alimentares é importante para a redução da formação da aterosclerose. Desta forma, a redução dos valores plasmáticos de CT e c-LDL constituem a primeira linha terapêutica em indivíduos com FH.[11, 16, 38]

Como se observa na tabela 4.24, 47,93% (58 indivíduos) do número total de indivíduos da amostra com FH, não se encontram a tomar medicação. Destes 58 indivíduos, 31 são crianças e 27 adultos, sendo 18 casos índice (17 do grupo pediátrico e 1 do grupo dos familiares) e 40 familiares (14 do grupo pediátrico e 26 do grupo dos adultos). Relativamente à dieta, nenhum indivíduo em idade adulta indica estar a realizar um regime alimentar. Já no grupo pediátrico, apenas 19,05% das crianças da amostra diz estar a seguir um plano alimentar apropriado de forma a tentar controlar a sua dislipidemia.

Estes resultados parecem indicar que praticamente metade dos indivíduos da amostra com FH não tomam precauções para controlar a sua dislipidemia e, como consequência, o seu risco de desenvolver uma doença cardiovascular mantém-se elevado. De facto, existem estudos que indicam que pelo menos 50% dos homens e 20% das mulheres com FH que não recebam uma terapêutica efectiva sofrerão um problema cardiovascular até aos 50 anos.[130] Um dos principais motivos para que estes indivíduos não estejam medicados pode ser a falta de diagnóstico quer clínico, quer molecular (note-se que 68,97% dos indivíduos que não tomam medicação são familiares), evidenciando a importância do *Cascade screening*.

Na figura 4.15, observam-se diferenças a nível das concentrações plasmáticas entre os indivíduos a tomar medicação e os que não tomam medicação, sendo mais elevadas neste último. Porém, os resultados só foram estatisticamente significativos para o CT no grupo pediátrico.

No grupo dos adultos, a ausência de diferenças estatisticamente significativas pode dever-se à presença de outros factores, como é o caso do sedentarismo, da alimentação rica em gorduras, da hipertensão ou da obesidade, que influenciam a eficácia dos fármacos utilizados. De facto, nenhum dos indivíduos da amostra que toma medicação diz estar sobre um regime alimentar adequado. Para além disso, existe uma maior probabilidade de os indivíduos adultos, ao contrário do grupo pediátrico, não cumprirem com a toma dos fármacos. Regra geral, os pais incitam as crianças a seguir a medicação, porém, os adultos, muitas vezes, negligenciam a toma da mesma seja por razões sócio-económicas, seja porque simplesmente não compreendem a importância da sua toma.

Sendo a quantificação da apoB uma medida de avaliação do total de partículas aterogénicas presentes no plasma (não só c-LDL, mas também VLDL e IDL), a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de indivíduos que toma medicação e o grupo que não toma, pode ainda dever-se à capacidade moderada que a maioria das estatinas apresenta na redução dos valores plasmáticos de VLDL e IDL.[122, 131]

Relativamente às sdLDL, o grupo dos adultos que tomam medicação apresentam valores inferiores aos observados no grupo que não toma, ainda que a diferença seja pequena. Porém, no grupo pediátrico observa-se o contrário. Ainda que as estatinas, único fármaco utilizado por 87,30% dos indivíduos da amostra em medicação, potencialmente sejam capazes de reduzir todas as subclasses de LDL, o seu efeito sob o tamanho das partículas LDL é bastante reduzido ou até mesmo nulo, o que pode justificar os resultados observados. De facto, existe alguma controvérsia sobre o efeito efectivo que este tipo de terapia tem sob as partículas sdLDL, havendo inclusive indícios de que podem aumentar os seus valores plasmáticos. Porém, mais estudos são necessários para que se confirme esta premissa.[120]

Na amostra de indivíduos adultos em medicação observa-se ainda que a maioria destes apresenta valores de CT e de c-LDL de risco (tabela 4.25). De facto, 90,19% dos indivíduos da amostra estudada (92,85% dos CI e 89,19% dos familiares) apresentam valores plasmáticos de c-LDL superiores a 115 mg/dL (valor máximo desejável para a população em geral). Relativamente ao CT 70% dos indivíduos (85,7% dos CI e 63,78% dos familiares) apresentam valores superiores a 220 mg/dL de CT, valor superior ao recomendado para a população em geral (cujo valor óptimo é inferior a 190 mg/dL). Assim, apenas 1 indivíduo conseguiu atingir o valor plasmático de CT desejáveis e 3 indivíduos o valor de c-LDL recomendado para indivíduos com FH.

Ainda que os valores plasmáticos desejáveis para indivíduos com FH e indivíduos com FH e DCV, referidos anteriormente, sejam difíceis de alcançar, observa-se que a medicação não está a ser eficaz nestes indivíduos. Uma das razões poderá estar relacionada com o tipo de mutação que parece influenciar a efectividade da terapêutica aplicada. Para além disso, a combinação entre outros factores genéticos (como os polimorfismos do gene APOE), metabólicos e ambientais influenciam o fenótipo observado assim como a resposta às terapêuticas. De facto, quanto maior o número de factores de risco (por exemplo ter FH e ainda ser hipertenso e/ou ter $IMC > 25 \text{ kg/m}^2$) presentes num dado indivíduo, maior a necessidade de as terapêuticas serem ajustadas de forma a intensificar a sua efectividade.[38, 53, 132]

Para além disso, tal como já descrito para a população portuguesa [54] o tipo de medicação utilizada pode também justificar os resultados. Dos indivíduos medicados, 90,90% do grupo pediátrico e 73,08% dos adultos estão medicados apenas com estatinas (figura 4.16). Esta classe de fármacos apresenta-se como o mais efectivo na medida em que são, geralmente, bem tolerados e fáceis de administrar sendo, por norma, os principais escolhidos para a redução dos níveis de c-LDL e CT.[11] Em indivíduos com FH podem, no entanto, não surtir a redução desejada destes lípidos plasmáticos.

Na maioria dos casos, indivíduos com FH apenas conseguem atingir os valores desejados através de LDL aférese ou da aplicação de estatinas mais potentes bem como pela combinação de estatinas de doses mais elevadas e outros fármacos como a ezetimiba ou resinas.[54]

Não obstante os indivíduos que não tomam medicação por não terem conhecimento da causa da sua dislipidemia, 66,13% dos indivíduos medicados na amostra referida, não sabiam ser portadores de FH. Desta forma, a medicação prescrita pode não ser a mais indicada para a condição destes indivíduos. De facto, na amostra estudada, apenas 7 indivíduos (1 índice e 6 familiares adultos) se encontram a tomar uma terapia combinada de estatinas e ezetimiba (figura 4.16).

Se ter FH é, por si só, um elevado factor de risco cardiovascular, é importante tentar que a este não se somem outros factores de risco. O acompanhamento destes indivíduos a nível clínico torna-se, praticamente, indispensável na tentativa de assegurar a efectividade da medicação, assim como a continuidade da sua toma e, ainda, no aconselhamento a nível de hábitos alimentares e de vida.

5.9. *CASCADE SCREENING*: IMPORTÂNCIA, VANTAGENS E LIMITAÇÕES

Desde 1999 que o Grupo de Investigação Cardiovascular se dedica ao estudo de dislipidemias familiares, nomeadamente a Hipercolesterolemia Familiar, projecto denominado Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar (EPHF). Desde o início deste projecto, até 2010 [52, 54], foram recebidos 482 casos índice, ao qual foi efectuado o estudo molecular completo que compreende a pesquisa de alterações patogénicas nos genes LDLR, APOB e PCSK9. O estudo completo demora cerca de 4 a 6 meses, um processo moroso, cujos custos são semelhantes a outros diagnósticos moleculares. De todos os casos índice recebidos, apenas 35,48%, foram diagnosticados com alterações descritas como causadoras de FH. Este resultado é relativamente baixo, demonstrando que muitas vezes o diagnóstico clínico não é eficaz.

A ineficácia do diagnóstico clínico é facilmente compreendida por vários factores. De facto, um dos critérios deste tipo de diagnóstico é a presença de xantomias que, na população portuguesa, são muito raros, como referido em 5.3. Para além disso, tal como se observou na amostra estudada, é possível afirmar que, em muitos casos, a dislipidemia observada pode ter a influência de factores ambientais, principalmente em adultos.

Regra geral, incluindo a amostra estudada, quando se comparam os valores plasmáticos dos indivíduos com e sem FH molecularmente diagnosticada, observa-se que, existem diferenças estatisticamente significativas entre os seus valores plasmáticos. Os indivíduos podem, no entanto, apresentar valores plasmáticos superiores aos recomendados para a população em geral, mas que são determinados por influências ambientais, ou podem passar despercebidos. De facto, no grupo pediátrico é comum não se observar a influência de factores ambientais no fenótipo destes indivíduos devido ao menor período de tempo a que estão expostos a estes factores.[54]

Para que o diagnóstico clínico de FH seja efectuado, é ainda necessário que os indivíduos realizem 3 a 6 meses de regime alimentar para posterior repetição das análises bioquímicas. Porém, é difícil controlar se realmente os indivíduos cumprem as recomendações e, sendo assim, o resultado da repetição das análises pode ser idêntico, influenciando o diagnóstico clínico. Para além disso,

muitas vezes não é possível conhecer a história familiar sobre dislipidemias e/ou doenças cardiovasculares.

O diagnóstico molecular é confirmatório do diagnóstico clínico, sendo gastos imensos recursos, sem que, no entanto, seja confirmado o diagnóstico em mais de metade dos casos índice estudados, devido a falhas no diagnóstico clínico.

É importante ter em conta que existem casos com fenótipos consideravelmente alterados em que não é detectada nenhuma alteração patogénica causadora de FH nos três genes estudados. Porém, é possível que existam alterações noutros genes responsáveis pelo metabolismo do colesterol, que justifiquem a dislipidemia observada, ou serem portadores de Dislipidemia Familiar Combinada. Neste sentido, são necessários mais estudos de investigação. Dado ser defendido, que nas crianças os factores ambientais não têm grande influência nos valores plasmáticos observados, por haver pouco tempo de exposição aos mesmos é de esperar que nos indivíduos do grupo pediátrico sem nenhuma alteração que justifique fenótipo de dislipidemia sejam bons alvos para a pesquisa molecular de novos genes relacionados com dislipidemias.[54]

A FH é, como referido, uma patologia genética autossómica dominante, querendo isto dizer que os familiares em primeiro grau (filhos e pais) de um caso índice com heFH têm 50% de probabilidade de também serem portadores de FH. Assim, o estudo dos familiares de casos índice nos quais foi detectada pelo menos uma alteração genética causadora de FH é altamente vantajoso para a detecção de indivíduos com FH. Este tipo de abordagem, denominado de rastreio em cascata, do inglês *Cascade Screening* (CS), é efectuado apenas pela pesquisa da(s) alteração(ões) encontradas no caso índice, primeiramente a familiares em primeiro grau, depois a familiares de segundo grau e assim sucessivamente, estudando o máximo possível de indivíduos geneticamente relacionados.

Em Portugal, até 2010 [52] foram também diagnosticados molecularmente com FH 233 familiares dos casos índice com alterações.

Durante este trabalho, foram, como referido, recebidos e estudados 106 familiares, pertencentes a 45 famílias, tendo sido identificados como portadores de FH, 66 indivíduos, 53 adultos e 13 crianças. Desta forma, o estudo molecular aos familiares permitiu identificar 62,26% dos indivíduos estudados. Assim, mais de metade dos indivíduos estudados apresentava uma alteração genética descrita como causadora de FH, tendo sido diagnosticados a partir da amplificação de um único exão, poupando-se, imensos recursos no diagnóstico molecular. Tendo em conta que, a probabilidade de familiares em 1º grau apresentarem a alteração é de 50%, este resultado indica que neste trabalho, o CS, foi consideravelmente eficaz.

Neste prisma, é então importante compreender qual a relevância deste tipo de abordagem. Como referido, a FH é considerada um factor risco cardiovascular e os indivíduos portadores desta patologia têm uma elevada probabilidade de desenvolver uma DCV ainda antes de atingirem os 50 anos de idade. De facto, na amostra estudada neste trabalho, os indivíduos que já haviam sofrido uma DCV apresentam uma idade média de 48 ± 13 anos. Porém, ao contrário do que acontece com outras patologias genéticas, existem, como já mencionado, terapêuticas eficazes que permitem reduzir o risco cardiovascular proporcionado pela FH, ao reduzir os valores plasmáticos de CT e c-LDL.

Neste trabalho, 47,93% do número de indivíduos com FH da amostra estudada não toma medicação. Note-se ainda que nenhum dos indivíduos adultos diz estar sob um regime alimentar adequado e que apenas 19,05% das crianças o faz. O correcto diagnóstico destes indivíduos deve proporcionar uma melhoria nos cuidados tomados por estes indivíduos com vista a reduzir o seu risco cardiovascular pela aplicação de terapêuticas adequadas e eficazes que quanto mais cedo forem iniciadas, maior a probabilidade destes doentes não desenvolverem uma DCV precoce.

Observando a caracterização bioquímica é importante notar, no entanto, que mesmo os indivíduos em medicação apresentam valores de risco para os lípidos plasmáticos. O CS, através do diagnóstico molecular, possibilita a compreensão da causa para a maior dificuldade em atingir os valores desejáveis, permitindo aos clínicos ajustar a medicação destes indivíduos. Para além disso, pode compreender-se a necessidade de acompanhar estes indivíduos de forma mais restrita e eficaz, aconselhando-os ainda a nível do estilo de vida, promovendo o exercício físico e uma alimentação equilibrada, ao mesmo tempo que ajudam no controlo de outros factores de risco cardiovascular, como a hipertensão. Se o acompanhamento for eficaz, e os indivíduos com FH seguirem as recomendações, o seu risco cardiovascular pode mesmo tornar-se equivalente ao da população em geral (sem alterações genéticas causadoras de dislipidemias). Não obstante, pela experiência obtida ao longo dos anos de EPHF, o facto de os indivíduos terem conhecimento do seu diagnóstico molecular, parece proporcionar uma maior aderência dos indivíduos à toma da medicação.[52]

Relativamente às crianças com familiares com heFH, o seu diagnóstico deve ser, preferencialmente, efectuado entre os 2 e os 3 anos, porém, um regime alimentar adequado deve ser posto em prática mesmo sem o diagnóstico molecular. Dada a sua baixa eficácia a longo prazo, quando identificadas crianças com FH a partir dos 10 anos, é já recomendada a utilização de estatinas, tendo sido já efectuados estudos que comprovam que este tipo de terapêutica não trás consequências nefastas para as mesmas.[132]

Por existirem terapêuticas eficazes na redução dos valores de CT e de c-LDL, a esperança e qualidade de vida dos indivíduos diagnosticados com FH pode ser aumentada. Porém, para ser realmente eficaz, a terapêutica tem de ser efectuada até ao resto da vida do doente. Dado que o diagnóstico clínico, como referido, apresenta bastantes falhas na detecção dos indivíduos e sendo o diagnóstico molecular crucial na confirmação da presença de FH, permitindo compreender qual a melhor forma de actuação para que o risco cardiovascular destes indivíduos seja reduzido, compreende-se que este tipo de abordagem seja altamente vantajosa. De facto, a FH é uma das patologias genéticas que preenche os critérios da Organização Mundial de Saúde para programas de rastreio.[54, 133]

O CS sendo direccionado, ao contrário dos estudos populacionais, permite uma identificação mais rápida de indivíduos com FH. Consequentemente, é possível a aplicação de medidas preventivas eficazes contra o desenvolvimento das DCVs, gastando, para isso, menos recursos. De facto, evitando as DCVs, evitam-se os custos associados à morbilidade que estas patologias causam, nomeadamente gastos com internamento. Para além disso, para os investigadores desta patologia, o CS beneficia ainda o estudo da co-segregação de alterações não descritas, essencial no estudo de novas

alterações, como descrito anteriormente.[104] Neste trabalho foi realizado o estudo de co-segregação em 3 famílias cuja patogenicidade das alterações encontradas no CI não está ainda descrita na literatura.

De facto, em 2011 Nherera e o seu grupo [134] publicaram que os métodos de diagnóstico baseados na análise molecular parecem ser mais custo-efectivos do que os métodos que apenas consideram os parâmetros bioquímicos.

Existem, porém, uma série de implicações éticas e práticas que condicionam a implementação e o sucesso do CS nomeadamente no que diz respeito ao contacto com os familiares em risco, como já referido. São aceites duas formas de contacto com os familiares: o contacto directo, em que os familiares são contactados pela equipa médica (sempre com autorização do CI) e o contacto familiar, sendo a informação transmitida ao caso índice que, depois, transmite aos seus familiares. Ambas as formas apresentam implicações éticas e legais, nomeadamente a nível da confidencialidade dos indivíduos. De facto, o caso índice pode não querer que o seu diagnóstico molecular seja revelado, inclusive à sua família, pois este pode afectar a sua vida a nível profissional e na possibilidade de obter um seguro de saúde, passando-se o mesmo com os familiares.[53, 57] Desta forma, ainda que, do ponto de vista clínico, a finalidade do CS apresente as vantagens já referidas, existe sempre a necessidade ética de contrabalançar a utilidade e aplicabilidade do método com a privacidade dos casos índice e seus familiares, assim como respeitar o direito dos mesmos em não querer ser informados sobre a eventual possibilidade de terem uma alteração genética.[73]

Após diagnóstico clínico de casos índice, são recebidos os questionários adaptados de Simon Broome (anexo II) preenchidos pelo médico e depois realizado o estudo molecular. Quando é detectada uma alteração que se sabe ser causadora de FH, contacta-se o médico a informar que seria importante estudar os familiares respectivos do CI, sendo o médico ou a enfermeira que questionam a disponibilidade dos familiares em participar no estudo. Por vezes, quando um caso índice é direccionado para o grupo o médico direcciona também os familiares do mesmo, com recurso também a um questionário (anexo II). Estes familiares só são estudados após a confirmação do diagnóstico do caso índice.

No âmbito do EPHF, o contacto com os familiares não é efectuado pelo grupo de investigação, existindo já uma enfermeira de investigação a colaborar no EPHF, nomeadamente, na dinamização do contacto aos familiares de CI com FH. Contudo, a participação dos familiares é inferior à esperada, à semelhança do que se observa, por exemplo, no Reino Unido.[134] De facto, a aceitação dos familiares ao contacto da enfermeira não é tão eficaz quanto se esperava, dado que os indivíduos se mostram reticentes às informações recebidas. Para contornar esta dificuldade, seria importante, tal como acontece na Holanda, Espanha e País de Gales, países em que o CS está bem implementado, que existisse uma associação de profissionais de saúde com o objectivo de disseminar informação sobre a FH a doentes e famílias com FH.[57]

A realização deste trabalho, permitiu ao EPHF identificar 66 novos indivíduos, o que, somando aos já identificados (e cujos resultados já foram publicados [52]), perfaz 2,35% dos indivíduos que se

estimam existir em Portugal com FH, tendo em conta a frequência esperada (1:500). Desta forma, denota-se esta patologia mantém-se altamente sub-diagnosticada no nosso país.

Neste trabalho, porém, a efectividade do CS é notável, na medida em que o estudo molecular a 45 casos índice permitiu a identificação de mais 82 indivíduos com FH (incluindo familiares que já haviam sido identificados), tendo em muitas famílias sido possível estudar grande parte dos indivíduos geneticamente relacionados. Em algumas das famílias isto não foi possível pelo facto de alguns dos indivíduos já terem falecido. Um exemplo é o índice 11247 cujo pai já havia falecido, tendo sido estudados apenas a mãe e a irmã do caso índice. Estas não apresentavam a alteração em questão, contudo, não foi possível estudar familiares do lado paterno do caso índice. Muitas vezes também se verifica que os indivíduos não apresentam interesse em participar quer por problemas dentro do seio familiar, quer por não considerarem relevante obter conhecimento sobre a possível causa da sua dislipidemia.

Seria também altamente benéfico para este projecto que existisse uma maior cooperação por parte clínica no contacto aos familiares. Para além disso, ainda existem muitos clínicos no país que desconhecem a existência deste projecto, o que pode promover a baixa taxa de diagnóstico molecular observado.

Ainda que a adesão dos médicos esteja a aumentar, existe muita falta de conhecimento sobre a FH e sobre este projecto que não apresenta custos para as instituições médicas nem para os doentes. Campanhas de prevenção e de elucidação sobre a FH deviam ser levadas a cabo para que as equipas médicas, assim como a população em geral, tivessem conhecimento que a FH é uma realidade que pode conduzir a consequências irreversíveis mas que podem ser evitáveis através de simples cuidados como a toma da medicação e alteração de alguns riscos ambientais, como uma alimentação correcta. Para todos os indivíduos já diagnosticados é importante que exista apoio na continuidade dos tratamentos, de forma a assegurá-los, sendo neste ponto, o apoio clínico, também fundamental.

Por fim, é importante ter em conta que para confirmar a efectividade do CS deviam ainda ser realizados estudos de acompanhamento clínico em que se estudariam as diferenças observadas nos parâmetros bioquímicos após o diagnóstico molecular e aplicação de terapêuticas adequadas nestes indivíduos. Para além disso, será ainda mais notável o aumento dos benefícios, comparativamente aos custos deste método, à medida que o número de indivíduos identificados for aumentado.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

As doenças cardiovasculares têm a influência de diversos factores de risco que interagem entre si, nomeadamente características genéticas, como a hipercolesterolemia familiar. Desta forma, a genética cardiovascular torna-se uma ferramenta importantíssima, permitindo identificar eficazmente a causa de várias doenças, entre elas a FH.

Dado que a FH é promotora do desenvolvimento de DCVs prematuras, tem um forte impacto no contexto socioeconómico, quer das famílias, quer da sociedade. Assim, o correcto diagnóstico e caracterização bioquímica permite escolher qual o melhor modo de actuação para que as DCVs possam ser prevenidas, tanto pela aplicação de terapêuticas adequadas como de estilos de vida adaptados ao perfil de cada indivíduo.

O *cascade screening* parece ser um método efectivo, relativamente ao custo/benefício na detecção da FH por vários motivos. Primeiramente, o estudo molecular é efectuado através da pesquisa apenas da mutação previamente detectada no caso índice e que se pensa que co-segrega na família. Ou seja, através da análise molecular apenas do(s) exão(ões) em que foi detectada uma mutação no caso índice, é possível diagnosticar outros familiares geneticamente relacionados, poupando-se imensos recursos. Para além disso, o fenótipo dos familiares pode ser menos severo do que o observado nos casos índice, não permitindo a identificação clínica de FH. Por conseguinte, o conhecimento da existência de FH na família pode levar a que outros indivíduos da família procurem aconselhamento médico.

O CS permite, desta forma, detectar prematuramente a FH e estratificar o risco cardiovascular dos indivíduos, levando à redução da mortalidade e morbilidade, como referido, através da implementação de aconselhamento e terapêuticas.

Contudo, a FH continua altamente sub-diagnosticada no nosso país (menos de 3% de indivíduos identificados dos 20.000 indivíduos estimados com FH). Neste sentido, são necessárias medidas que permitam aumentar o conhecimento, quer da comunidade médica, quer da própria população, sobre esta patologia e das suas consequências. Para além disso, para aumentar a efectividade do CS é ainda importante que haja mais apoio clínico (médicos e enfermeiros) quer na identificação clínica de novos indivíduos, quer no acompanhamento dos indivíduos já identificados, garantindo a efectividade das medidas tomadas, assim como no contacto aos familiares dos mesmos, tentando aumentar a sua adesão.

Mais estudos devem ainda ser feitos de forma a compreender a dinâmica existente por detrás das doenças cardiovasculares, nomeadamente sobre a importância dos marcadores bioquímicos de risco e da interacção da FH com outros factores de risco, pois só assim é possível estratificar o risco cardiovascular dos indivíduos, assim como a aplicação de medidas efectivas.

Em suma, o CS é uma ferramenta importante para confirmar a causa das dislipidemias observadas, bem como estudar a co-segregação das alterações encontradas. Desta forma, a sua efectividade será maior à medida que o número indivíduos identificados aumenta. O objectivo do EPHF passa por identificar os 20000 casos com FH que se estimam existir no nosso país, contribuindo, assim, para uma melhoria do estado de saúde da nossa população a nível cardiovascular.

7. BIBLIOGRAFIA

1. **Gaziano TA**, Reddy KS, Paccaud F, Horton S, Chaturvedi V. Cardiovascular diseases. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, Jha P, Mills A, Musgrove P. Disease Control Priorities in Developing Countries. New York: Oxford University Press 2006:645-662.
2. **DGS** (Direção Geral de Saúde). Circular Normativa, 2006, N.º03/DSPCS. Disponível online em: <http://www.acs.min-saude.pt/files/2007/12/circularnormativadgs03dsps060206.pdf> (acedido a: 12.09.2011)
3. **Silva PM**. Doenças cardiovasculares e aterosclerose: Um repto aos portugueses...Um desafio para todos. 2006. Disponível online em: <http://www.jasfarma.pt/artigo.php?artigo=14&numero=52&publicacao=sp> (acedido a: 12.09.2011).
4. **WHO** (World Health Organization). Cardiovascular diseases (CVDs). 2011; Fact Sheet N.º317. Disponível online em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> (acedido a: 12.09.2011)
5. **WHO** (World Health Organization). NCD country profiles. Cardiovascular diseases in Portugal. 2011; Disponível online em: http://www.who.int/nmh/countries/prt_en.pdf (acedido a: 10.08.2012)
6. **Bourbon M**. Factores genéticos e a doença cardiovascular. *Rev Port Cardiol* 2008;27(12):1559-1563.
7. **Black HR**. Cardiovascular risk factors. In: Zaret BL, Moser M, Cohen LS, editors. Heart Book. Yale University School of Medicine, 1992:23-35
8. **Keef JH**, Carter MD, Lavie CJ. Primary and secondary prevention of cardiovascular diseases: a practical evidence-based approach. *Mayo Clin Proc* 2009;84(8):741-757.
9. **Mozaffarian D**, Wilson PWF, Kannel EB. Beyond established and novel risk factors: lifestyle risk factors for cardiovascular disease. *Circulation* 2008;117:3031-3038.
10. **Zlatohlávek L**, Zídková K, Vrablík M, Haas T, Prusíková M, Svobodová H, Ceska R. Lipoprotein(a) and its position among other risk factors of atherosclerosis. *Physiol Res* 2008;57:777-783.
11. **American Heart Association**. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol. *Circulation* 2002;106:3143-3421.
12. **Lusis AJ**. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407(6801):233-241.
13. **Cachafeiro V**, Miana M, Heras N, Martín-Fernández B, Ballesteros S, Balfagón G, Lahera V. Inflammation: a link between hypertension and atherosclerosis. *Curr Hypertens Rev* 2009;5:40-48.
14. **Life Beat** – Centro de diagnóstico. Doenças Cardiovasculares. Disponível online em: <http://www.lifebeat.pt/2.php>. (acedido a: 12.09.2011).
15. **Libby P**, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005;111:3481-3488.
16. **Rosenson RS**. Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. *Atherosclerosis* 2004;173:1-12.
17. **Rifai N**, Bachorik PS, Albers JJ. Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. In: Burtis CA, Ashwood E, editors. Text Book of Clinical Chemistry. Philadelphia: WB Saunders & Co, 1999:809-861.
18. **Meng CQ**. Inflammation in atherosclerosis: new opportunities for drug discovery. *Mini Rev Med Chem* 2005;5:33-40.
19. **Nelson DL**, Cox MM. Lehninger principles of biochemistry. New York: W. H. Freeman 2005; 4th ed p.787-832.
20. **Davidson MH**, Jacobson TH. How Statins Work: The Development of Cardiovascular Disease and Its Treatment With 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors. Medscape Education (CME/CE) 2001. Disponível online em http://www.medscape.org/viewarticle/416521_4. (Acedido a 13.09.2011).
21. **Feyer MD**, Richmonf W. Lipids and lipid disorders. London: Mosby-Wolfe Medical Communications 1997;2nd ed.
22. **Bourbon M**, Rato Q. Lipoproteínas, Genética e Aterosclerose. *RFML* 2006;Série III:11(2):67-73.
23. **Eichner JE**, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a huge review. *Am J Epidemiol* 2002;155(6):487-495.
24. **Koba S**, Yokota Y, Hirano T, Ito Y, Ban Y, Tsunoda F, Sato T, Shoji M, Suzuki H, Geshi E, Kobayashi Y, Katagiri T. Small LDL-Cholesterol is superior to LDL-Cholesterol for determining severe coronary atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2008;15:250-260.
25. **Hoefner DM**, Hodel SD, O'Brien JF, Branum EL, Sun D, Meissner I, McConnell JP. Development of a rapid, quantitative method for LDL subfractionation with use of the Quantimetrix Lipoprint LDL System. *Clin Chem* 2001;47(2):266-274.

26. **Rader DJ**, Cohen J, Hobbs HH. Monogenic Hypercholesterolaemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J Clin Invest* 2003;**111**:1795-1803.
27. **Berglund L**, Ramakrishnan R. Lipoprotein(a): an elusive cardiovascular risk factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;**24**:2219-2226.
28. **Boerwinkle E**, Leffert CC, Lin J, Lackner C, Chiesa G, Hobbs HH. Apolipoprotein (A) gene accounts for greater than 90% of the variation in plasma Lipoprotein (a) concentrations. *J Clin Invest* 1992;**90**:52-60.
29. **Farrer M**, Game FL, Albers CJ, Neil HAW, Winocour PH, Laker MF, Adams PC, Alberti KGMM. Coronary Artery Disease is associated with increased lipoprotein (a) concentrations independent of the size of circulating apolipoprotein(a) isoforms. *Arterioscler Thromb* 1994;**14**(8):1272-83.
30. **Soutar AK**, Naoumova RP. Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolaemia. *Cardiovasc Med* 2007;**4**(4):214-225.
31. **Soutar AK**. Rare genetic causes of autosomal dominant or recessive hypercholesterolaemia. *Life* 2010;**62**(2):125-131.
32. **Xavier HT**, Abdalla DSP, Martinez TLR, Ramires JAF, Gagliardi ART. Efeitos da lipoproteína LDL-oxidada sobre a proliferação e a motilidade espontânea in vitro de células endoteliais de artérias coronárias humanas. *Arq Bras Cardiol* 2004;**83**(6):488-492.
33. **Bourbon M**, Rato Q. Alterações genéticas do metabolismo lipoproteico. *RFML* 2006;**Série III:11**(4):193-201.
34. **Rodrigues MO**, Fonseca A, Dias CM, Albergaria I, Martins G, Alpendre ML, Martins MC. APOE genotypes and dyslipidemias in a sample of the portuguese population. *Clin Chem Lab Med* 2005;**43**(9):907-912.
35. **Nascimento H**, Silva L, Lourenço P, Weinfurterová R, Castro E, Rego C, Ferreira H, Guerra A. Lipid profile in Portuguese obser children and adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2009;**163**(11):1030-1036.
36. **Davignon J**, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1988;**8**:1-21.
37. **Nordestgaard BG**, Chapman MJ, Ray K, Borén J, Andreotti F, Watts GF, Ginsberg H, Amarenco P, Catapano A, Descamps OS, Fisher E, Kovanen PT, Kuivenhoven JÁ, Lesnik P, Masana L, Reiner Z, Taskinen MJ, Tokgözoğlu L, Tybjaerg-Hansen T, for the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J* 2010;**31**:2844-2853.
38. **Reiner Z**, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen M-R, Wiklund O, Agewall S, Alegria E, Chapman MJ, Durrington P, Erdine S, Halcox J, Hobbs R, Kjekshus J, Filardi PP, Riccardi G, Storey RF, Wood D. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: The task force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J* 2011;**32**:1769-1818.
39. **Bermúdez V**, Arráiz N, Aparicio D, Rojas E, Gotera D, Guerra X, Canelón R, Faría J, Sorell L, Amell A, Reyna N, Cabrera M, Mengual E, Cano R, Cano C, Velasco M. Lipoprotein(a): from molecules to therapeutics. *Am J Ther* 2010;**17**:263-273.
40. **Enkhmaa B**, Anuurad E, Zhang W, Tran T, Berglung L. Lipoprotein(a): genotype-phenotype relationship and impact on atherogenic risk. *Metab Syndro Relat Disord* 2011.
41. **Pati U**, Pati N. Lipoprotein(a), Atherosclerosis and Apolipoprotein(a) gene polymorphism. *Mol Genet Metab* 2000;**71**:87-92.
42. **Wade DP**, Clarke JG, Lindhal GE, Liu AC, Zysow BR, Meer K, Schwartz K, Lawn RM. 5' control regions of the apolipoprotein(a) gene and members of the related plasminogen gene family. *Proc Natl Acad Sci* 1993;**90**:1369-1373.
43. **Dumitrescu L**, Glenn K, Brown-Gentry K, Shepard C, Wong M, Rieder MJ, Smith JD, Nickerson DA, Crawford DC. Variations in LPA is associated with Lp(a) levels in three populations from the third national health and nutrition examination survey. *PLoS ONE* 2011;**6**(1):e16604.
44. **Erqou S**, Thompson A, Angelantonio ED, Saleheen D, Kaptoge S, MArcovina S, Danese J. Apolipoprotein(a) isoforms and the risk of vascular disease: systematic review of 40 studies involving 58,000 participants. *J Am Coll Cardiol* 2010;**55**:2160-2167.
45. **Paultre F**, Pearson TA, Weil HFC, Tuck CH, Myerson M, Rubin J, Francis CK, Marx HF, Philbin EF, Reed RG, Berglund L. High levels of Lp(a) with a small apo(a) isoform are associated with coronary artery disease in African American and White Men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;**20**:2619-2624.
46. **Spence JD**. The role of lipoprotein(a) in the formation of arterial plaques, stenoses and occlusions. *Can J Cardiol* 2010;**26**(A):37A-40A.

47. **Rosby O**, Berg K. LPA gene: interaction between the apolipoprotein(a) size ('kringle IV' repeat) polymorphism and a pentanucleotide repeat polymorphism influences Lp(a) lipoprotein level. *J Int Med* 2000;**247**:139-152.
48. **Campos EM**. Da classificação dos efeitos fenotípicos de Freckrickson – perfis das lipoproteínas – ao entendimento dos genótipos. *Acta Med Port* 2005;**18**:189-198.
49. **American Heart Society**. World Health Organization Memorandum: Classification of hyperlipidemias and hyperlipoproteinemias. *Circulation* 1972;**45**:501-508.
50. **Goldstein JL**, Hobbs H, Brown MS. Familial hypercholesterolaemia. In: The metabolic basis of inherited diseases. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) McGraw-Hill: New York; 1995; 7th ed, Vol II, p.1981-2021.
51. **Bourbon M**, Duarte AM, Alves AC, Medeiros AM, Marques L, Soutar AK. Genetic diagnosis of familial hypercholesterolaemia: the importance of functional analysis of potential splice-site mutations. *J Med Genet* 2009;**46**:352-357.
52. **Medeiros AM**, Alves AC, Francisco V, Bourbon M, on behalf of the investigators of the Portuguese FH study. Update of the Portuguese Familial Hypercholesterolaemia study. *Atherosclerosis* 2010;**212**:553-558.
53. **Fahed AC**, Nemer GM. Familial Hypercholesterolaemia: the lipids or the genes? *Nutr Metab* 2011;**8**:23.
54. **Alves AC**, Medeiros AM, Francisco V, Gaspar IM, Rato Q, Bourbon M. Molecular diagnosis of familial Hypercholesterolaemia: an important tool for cardiovascular risk stratification. *Rev Port Cardiol* 2010;**29**(6):907-921.
55. **Bourbon M**, Rato Q, pelos investigadores do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar. Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar: apresentação do estudo e resultados preliminares. *Rev Port Cardiol* 2006;**25**(11):999-1013.
56. **Austin MA**, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Genetic causes of monogenic heterozygous Familial Hypercholesterolaemia: a huge prevalence review. *Am J Epidemiol* 2004;**160**:407-420.
57. **Defesche JC**. Defining the challenges of FH screening for familial hypercholesterolaemia. *J Clin Lipidol* 2010;**4**:338-341.
58. **Herman K**, Heyningen V, Wile D. *Cascade screening* for familial Hypercholesterolaemia and its effectiveness in the prevention of vascular disease. *Br J Diabetes Vasc Dis* 2009;**9**(4):171-174.
59. **Yuan G**, Wang J, Hegele RA. Heterozygous familial Hypercholesterolaemia: an underrecognized cause of early cardiovascular disease. *CMAJ* 2006;**174**(8):1124-1129.
60. **Ned RM**, Sijbrands EJG. *Cascade screening* for familial Hypercholesterolaemia (FH). *PIOS Curr* 2011;**3**:RRN1238
61. **Bourbon M**, Sun X-M, Soutar AK. A rare polymorphism in the low density lipoprotein (LDL) gene that affects mRNA splicing. *Atherosclerosis* 2007;**195**:e17-e20.
62. **Livy A**, Lye SM. Familial Hypercholesterolaemia in Asia: a review. *OMICS Res* 2011;**1**(1):22-31.
63. **Usifo E**, Leigh SEA, Whittall RA, Lench N, Taylor A, Yeats C, Orenge CA, Martin ACR, Calli J, Humphries SE. Low-density lipoprotein gene familial Hypercholesterolaemia variant database: Update and pathological assessment. *Ann Hum Genet* 2012;**76**(5):387-401.
64. **Grilo LT**, Videira A. Do DNA à proteína in Videira A. Engenharia Genética - princípios e aplicações. *LIDEL* 2001;p.15-23
65. **Bourbon M**, Alves AC, Medeiros AM, Silva S, Soutar AK. Familial hypercholesterolaemia in Portugal. *Atherosclerosis* 2008;**196**:633-642.
66. **Heath KE**, Gahan M, Whittall RA, Humphries SE. Low-density lipoprotein receptor gene (LDLR) world-wide website in familial hypercholesterolaemia: update, new features and mutation analysis. *Atherosclerosis* 2001;**154**:243-246.
67. **Fard-Esfahani P**, Mohammadi-Torbati P, Khatami S, Zeinali S, Taghikhani M, Allhyari M. Familial defective apolipoprotein B 100: frequency of R3500Q mutation of apolipoprotein B gene in Iranian hypercholesterolemic patients. *Acta Med Iran* 2005;**43**(3): 193-196.
68. **Burnett JR**, Hooper AJ. Common and rare gene variants affecting plasma LDL Cholesterol. *Clin Biochem* 2008;**29**:11-26.
69. **Lopez D**. PCSK9: na enigmática protease. *BBA* 2008;**1781**:184-191.
70. **Horton JD**, Cohen JC, Hobbs HH. PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism. *J Lipid Res* 2008;**50**:S172-S177.
71. **Fasano T**, Sun XM, Patel DD, Soutar AK. Degradation of LDLR protein mediated by 'gain of function' PCSK9 mutants in normal and ARH cells. *Atherosclerosis* 2009;**203**(1):166-171.

72. **Newson AJ**, Humphries SE. Cascade testing in familial hypercholesterolaemia: how should family members be contacted? *Eur J Hum Genet* 2005;**13**:401-408.
73. **Taylor A**, Wang D, Patel K, Whittall R, Wood G, Farrer M, Neely RDG, Fairgrieve S, Nair D, Barbir M, Jones JL, Egan S, Everdale R, Lolin Y, Hughes E, Cooper JA, Hadfield SG, Norbury G, Humphries SE. Mutation detection rate and spectrum in familial hypercholesterolaemia patients in UK pilot cascade project. *Clin Genet* 2010;Jonh Wiley & Sons A/S.
74. **Hadfield SG**, Horara S, Starr BJ, Yazdgerdi S, Marks D, Bhatnagar D, Cramb R, Egan S, Everdell R, Ferns G, Jones A, Marenah CB, Marples J, Prinsloo P, Sneyd A, Stewart MF, Sandle L, Wang T, Watson MS, Humphries SE, on behalf of the Steering Group for the Department of Health Familial Hypercholesterolaemia Cascade Testing Audit Project. Family tracing to identify patients with familial hypercholesterolaemia: the second audit of the department of health familial hypercholesterolaemia cascade testing project. *Ann Clin Biochem* 2009;**46**:24-32.
75. **Kessling AM**, Seed M, Taylor R, Wynn V, Humphries SE. Rising cholesterol levels in children with familial hypercholesterolaemia. *Biomed Pharmacother* 1990;**40**:373-379.
76. **Hemphill LC**. Familial Hypercholesterolaemia: current treatment options and patients selection for low-density lipoprotein apheresis. *J Clin Lipid* 2010;**4**:346-349.
77. **Krass I**, Walker AT, Watts GF. Detection and care of familial Hypercholesterolaemia in the community: is there a role for the pharmacist? *Int J Clin Pharm* 2012;**34**:501-505.
78. **Golberg AN**. Novel therapies and new targets of treatment for familial Hypercholesterolaemia. *J Clin Lipid* 2010;**4**:350-356.
79. **Scientific Steering Committee** on behalf of the Simon Broome Register. Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. *BMJ* 1991;**303**:893-896.
80. **Steering Committee** on behalf of the Simon Broome Register Group. Mortality in treated heterozygous familial hypercholesterolaemia: implications for the clinical management. *Atherosclerosis* 1999;**142**:105-112.
81. **Lahiri DK**, Numberger JI. A rapid non-enzymatic methos fotr the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991;**19**(19):5444
82. **Sambrook J**, Russell DW, Wessler SR, Lewontin RC, Gelbart WM, Suzuki DT, Miller JH. An Introduction to Genetic Analysis. New York: W. H. Freeman and Company 2004:357-362.
83. **Bodamer OA**, Bercovich D, Shlabach M, Ballantyne C, Zoch D, Beaudet AL. Use of denaturing HPLC to provide efficient detection of mutations causing familial Hypercholesterolaemia. *Clin Chem* 2002;**48**(11):1913-1918.
84. **Sanger F**, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminationg inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 1977;**74**(12):5463-5467.
85. **Stuppia L**, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci* 2012;**13**:3254-3276.
86. **Soutar AK**, Knight BL, Patel DD. Identification of a point mutation in growth factor repeat C of the low density lipoprotein-receptor gene in a patient with homozygous familial hypersholesterolemia that affects ligand biding and intracellular movement of receptors. *Proc Natl Acad Sci* 1989;**86**:4166-4170
87. **Hobbs HH**, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of LDL receptor gene in familial Hypercholesterolaemia. *Hum Mutat* 1992;**1**(6):445-466.
88. **Talmud P**, Tybjaerg-Hansen A, Bhatnagar D, Mbewu A, Miller JP, Durrington P, Humphries S. Rapid screening for specific mutations in patients with a clinical diagnosis of familial Hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 1991;**89**:137-141.
89. **Pereira E**, Ferreira R, Hermelin B, Thomas G, Bernard C, Bertrand V, Nassif H, Mendez del Castillo D, Bereziat G, Benlian P. Recurrent and novel LDL receptor gene mutations causing heterozygous familial Hypercholesterolaemia in La Habana. *Hum Genet* 1995;**96**(3):319-22.
90. **Ekström U**, Abrahamson M, Sveger T, Sun X-M, Soutar AK, Nilsson-Ehle P. Expression of an LDL receptor allele with two different mutations (E256K and I402T). *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2000;**53**:31-36.
91. **Sun XM**, Patel DD, Knight BL, Soutar AK. Comparison of the genetic defect with LDL-receptor activity in cultured cells from patients with a clinical diagnosis of heterozygous familial Hypercholesterolaemia. The familial Hypercholesterolaemia regression study group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;**17**(11):3092-101.
92. **Fouchier SW**, Defesche JC, Umans-Eckenhansen MW, Kastelein JP. The molecular basis of familial Hypercholesterolaemia in the Netherlands. *Hum Genet* 2001;**109**(6):602-615.

93. **Hobbs HH**, Leidersdorf E, Leffert CC, Cryer DR, Brown MS, Goldstein JL. Evidence for a dominant gene that suppresses Hypercholesterolaemia in a family with defective low density lipoprotein receptors. *J Clin Invest* 1989;**84**(2):656-664.
94. **Garuti R**, Lelli N, Barozzini M, Tiozzo R, Ghisellini M, Simone ML, Li Volti S, Garozzo R, Mollica F, Vergoni W, et al: Two novel partial deletions of LDL receptor gene in Italian patients with familial Hypercholesterolaemia (FH Siracusa and FH Reggio Emilia). *Atherosclerosis* 1996;**121**(1):105-117.
95. **Hobbs HH**, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor locus in familial Hypercholesterolaemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet* 1990;**24**:133-170.
96. **Fouchier SW**, Kastelein JJ, Defesche JC. Update of the molecular basis of familial Hypercholesterolaemia in the Netherlands. *Hum Mutat* 2005;**26**(6):550-556.
97. **Chaves FJ**, Real JT, García-García AB, Civera M, Armengod ME, Ascaso JF, Carmena R. Genetic diagnosis of familial Hypercholesterolaemia in a South European outbreed population: influence of low-density lipoprotein (LDL) receptor gene mutations on treatment response to simvastatin in total, LDL and high-density lipoprotein cholesterol. *J Clin Endocrinol Metabol* 2001;**86**(10):4926-4932.
98. **Langenhoven E**, Warnich L, Thiar R, Rubinsztein DC, van der Westhuyzen DR, Marais AD, Kotze MJ. Two novel point mutations causing receptor-negative familial Hypercholesterolaemia in a South African Indian homozygote. *Atherosclerosis* 1996;**125**(1):111-119.
99. **Liyanage KE**, Hooper AJ, Defesche JC, Burnett JR, van Bockxmeer FM. High-resolution melting analysis for detection of familial ligand-defective apolipoprotein B-100 mutations. *Ann Clin Biochem* 2008;**45**:170-176.
100. **Amsellem S**, Briffaut D, Carrié A, Rabès JP, Girardet JP, Fredenrich A, Moulin P, Krempf M, Reznik Y, Vialettes B, de Gennes JL, Brukert E, Benlian P. Intronic mutations outside of Alu-repeat-rich domains of the LDL receptor gene are a cause of familial Hypercholesterolaemia. *Hum Genet* 2002;**111**(6):501-510.
101. **Lelli N**, Ghisellini M, Calandra S, Gaddi A, Ciarrocchi A, Coviello DA, Bertolini S. Duplication of exons 13, 14 and 15 of the LDL-receptor gene in a patient with heterozygous familial Hypercholesterolaemia. *Hum Genet* 1991;**86**(4):359-362.
102. **Ma YH**, Bétard C, Roy M, Davignon J, Kessling AM. Identification of a second "French Canadian" LDL receptor gene deletion and development of a rapid method to detect both deletions. *Clin Genet* 1989;**36**(4):219-228.
103. **Lind S**, Rystedt E, Eriksson M, Wiklund O, Angelin B, Eggertsen G. Genetic characterization of Swedish patients with familial Hypercholesterolaemia: a heterogeneous pattern of mutations in the LDL receptor gene. *Atherosclerosis* 2002;**163**(2):399-407.
104. **Cotton RGG**, Sriver CR. Proof of "disease causing" mutation. *Hum Mutat* 1998;**12**:1-3.
105. **Ludwig EH**, Blackhart BD, Pierotti VR, Caiati L, Fortier C, Knott T, Scott J, Mahley RW, Levy-Wilson B, McCarthy BJ. DNA sequence of the human Apolipoprotein B gene. *DNA* 1987;**6**(4):363-372
106. **Frostgerård J**, Hamsten A, Gidlund M, Nilsson J. Low density lipoprotein-induced growth of U937 cells: a novel method to determine the receptor binding of low density lipoprotein. *J Lipid Res* 1990;**31**:37-44.
107. **Meng QH**, Pajukanta P, Ilmonen M, Schuster H, Schewe CK, Andersson LC, Tikkanen MJ. Analysis of novel apolipoprotein B mutations using a modified U937 cell line LDL binding assay. *Clin Chim Acta* 1996;**256**:27-36
108. **Varret M**, Rabès JP, Collod-Bérout G, Junien C, Bolleau C, Bérout C. Software and database for the analysis of mutations in the human LDL receptor gene. *Nucleic Acids Res* 1997;**25**(1):172-180.
109. **Davis CG**, Elhammer A, Russell DW, Scheiner WJ, Kornfeld S, Brown MS, Goldstein JL. Deletion of clustered O-linked carbohydrates does not impair function of low density lipoprotein receptor in transfected fibroblasts. *J Biol Chem* 1986;**261**(6):2828-2838.
110. **Kingsley DM**, Krieger M. Receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein: somatic cell mutants define multiple genes required for expression of surface-receptor activity. *Proc Natl Acad Sci* 1984;**81**:5454-5458.
111. **Lin J**, Wang L, Liu S, Xia J, Yong Q, Du L, Pan X, Xue H, Chen B, Jiang Z. Functional analysis of low-density lipoprotein receptor in homozygous familial Hypercholesterolaemia patients with novel 1439 C→T mutation of low-density lipoprotein receptor gene. *Chin Med J* 2008;**121**(9):776-781.
112. **Medeiros AM**, Alves AC, Bourbon M, on behalf of the Portuguese FH group. Milder phenotype of relatives of index patients can misdiagnose Familial Hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis (Supplements) (Component)* 2011;**12**:Issue 1. (Abstract).

113. **Calandra S**, Bertolini S, Pes GM, Deiana L, Tarugi P, Pisciotta L, Li-Volti S, Li-Volti G, Maccarone C. Beta-thalassemia is a modifying factor of the clinical expression of familial Hypercholesterolaemia. *Semin Vasc Med* 2004;**4**(3):271-278.
114. **Alves AC**, Medeiros AM, Soutar AK, Bourbon M. dHPLC and direct sequencing for mutation screening of patient with Familial Hypercholesterolaemia: optimization, validation and experience. *Methods* 2012 (submitted).
115. **Bourbon M**. Characterization of molecular defects in Portuguese patients with familial Hypercholesterolaemia. PhD thesis in the University of London, 2005.
116. **Varady KA**, Lamarche B. Lipoprint adequately estimates LDL size distribution, but not absolute size, versus polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Lipids* 2011;**46**:1163-1167.
117. **Rizzo M**, Berneis K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment. *Q J Med* 2006;**99**:1-14.
118. **Hirano T**, Ito Y, Saegusa H, Yoshino G. A novel and simple method for quantification of small, dense LDL. *J Lipid Res* 2003;**44**:2193-2201.
119. **Herron KL**, Lofgren IE, Sharman M, Volek JS, Fernandez ML. High intake of cholesterol results in less atherogenic low-density lipoprotein particles in men and women independent of response classification. *Metabolism* 2004;**53**(6):823-830.
120. **Choi UC**, Seo HS, Lee EM, Shin SY, Choi UJ, Na JO, Lim HE, Kim JW, Kim EJ, Rha SW, Park SCG, Oh DJ. Statins do not decrease small, dense low-density lipoprotein. *Tex Heart Inst J* 2010;**37**(4):421-428.
121. **Kolovou GD**, Kostakou PM, Anagnostopoulou KK. Familial Hypercholesterolaemia and triglyceride metabolism. *Int J Cardiol* 2011;**147**:349-358.
122. **Ballantyne CM**, Raichlen JS, Cain VA. Statin therapy alters the relationship between apolipoprotein B and low-density lipoprotein cholesterol and non-high-density lipoprotein cholesterol targets in high-risk patients. *J Am Coll Card* 2008;**52**(8).
123. **Vandermeersch A**, Ameye S, Puype D, Petitjean D, Buyzere MD, Langlois MR. Estimation of the low-density lipoprotein (LDL) subclass phenotype using a direct automated assay of small dense LDL-cholesterol without sample pretreatment. *Clin Chim Acta* 2010;**411**:1361-1366.
124. **Dontas AS**, Zerefos NS, Panagiotakos DB, Valis DA. Mediterranean diet and prevention of coronary heart disease in the elderly. *Clin Interv Aging* 2007;**2**(1):109-115.
125. **van Aalst-Cohen ES**, Jansen ACM, Boekholdt SM, Tanck MWT, Fontecha MR, Cheng S, Li J, Defesche JC, Kuivenhoven JA, Kastelein JJP. Genetic determinants of plasma HDL-cholesterol levels in familial Hypercholesterolaemia. *E J Hum Genet* 2005;**13**:1137-1142.
126. **Chapman MJ**, Caslake M. Non-high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor: addressing risk associated with apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Eur Heart J Suppl* 2004;**6**(supplement A):A43-A48.
127. **Bittner V**. Non-HDL cholesterol: measurement, interpretation and significance. *Proc* 2007;**7**(1):8-11.
128. **Packard CJ**, Saito Y. Non-HDL cholesterol as a measure of atherosclerotic risk. *J Atheros Thromb* 2003;**11**(1):6-14.
129. **Orsó E**, Ahrens N, Kilalic D, Schmitz G. Familial Hypercholesterolaemia and lipoprotein(a) hyperlipidemia as independent and combined cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis Suppl* 2009;**10**:74-78.
130. **Alonso R**, Mata N, Castillo S, Fuentes F, Saenz P, Muñoz O, Galiana J, Figueras R, Diaz JL, Gomez-Enterría P, Mauri M, Piedecausa M, Irigoyen L, Aguado R, Mata P. Cardiovascular disease in familial Hypercholesterolaemia: influence of low-density lipoprotein receptor mutation type and classic risk factors. *Atherosclerosis* 2008.
131. **Ginsberg HN**. Review: efficacy and mechanisms of action of statins in the treatment of diabetic dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;**91**(2):383-392.
132. **Civeira F**. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial Hypercholesterolaemia. International panel on management of familial Hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 2004;**173**:55-68.
133. **WHO** – World Health Organization. Familial hypercholesterolaemia: report of a second WHO Consultation. Geneva: WHO, 1998. Disponível online em: http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/WHO_HGN_FH_CONS_99.2.pdf (acedido a: 28.Setembro.2012).
134. **Nherera L**, Marks D, Minhas R, Thorogood M, Humphries SE. Probabilistic cost-effectiveness analysis of cascade screening for familial hypercholesterolaemia using alternative diagnostic and identification strategies. *Heart* 2011;**97**:1175-1181.

ANEXOS

ANEXO I - VALORES SÉRICOS DO PERFIL LIPÍDICO NORMAL, DE RISCO MODERADO E DE RISCO ELEVADO PARA O DESENVOLVIMENTO DAS DCVs, PARA A POPULAÇÃO EM GERAL.

Tabela I.1 - valores séricos de perfil lipídico normal, de risco moderado e de risco elevado, para indivíduos adultos (população em geral)

| Parâmetro Bioquímico | Normal | Risco moderado | Risco Elevado |
|-------------------------|------------------------------------------------|-----------------|---------------|
| Colesterol total | <190 (mg/dL) | 190-240 (mg/dL) | >240 (mg/dL) |
| LDL | <115 (mg/dL) | 115-160 (mg/dL) | >160 (mg/dL) |
| HDL | >40 (mg/dL) (Homens) >46 (mg/dL) (Mulheres) | 35-40 (mg/dL) | <40 (mg/dL) |
| Triglicéridos | <150 (mg/dL) | 150-200 (mg/dL) | > 200 (mg/dL) |

Adaptado de [33]

ANEXO II - CRITÉRIOS DE *SIMON BROOME* PARA DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR.

Tabela II.1 – critérios de Simon Broome para diagnóstico clínico de Hipercolesterolemia Familiar.

| Crianças (idade inferior a 16 anos) | Adultos | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> - Colesterol Total acima de 200 mg/dL e - Xantomas tendinosos no caso índice ou familiar (pais, filhos, avós, irmãos, tios) ou - Evidencia genética de mutação no gene receptor de LDL ou APOB | <ul style="list-style-type: none"> - Colesterol Total acima de 290 mg/dL ou colesterol LDL acima de 190 mg/dL e - Xantomas tendinosos no caso índice ou familiar (pais, filhos, avós, irmãos, tios) ou - Evidencia genética de mutação no gene receptor de LDL ou APOB | Hipercolesterolemia Familiar Confirmada |
| <ul style="list-style-type: none"> - Colesterol total acima de 200 mg/dL ou colesterol LDL acima de 120 mg/dL e - História Familiar de enfarte do miocárdio antes dos 50 anos em avós e tios ou antes dos 60 anos nos pais, irmãos e filhos e/ou história familiar de níveis elevados de colesterol (>290 mg/dL) nos pais, irmãos ou filhos; ou colesterol total acima de 290 mg/dL nos avós e tios. | <ul style="list-style-type: none"> - Colesterol total acima de 290 mg/dL ou colesterol LDL acima de 190 mg/dL e - História Familiar de enfarte do miocárdio antes dos 50 anos em avós e tios ou antes dos 60 anos nos pais, irmãos e filhos e/ou história familiar de níveis elevados de colesterol (>290 mg/dL) nos pais, irmãos ou filhos; ou colesterol total acima de 290 mg/dL nos avós e tios. | Hipercolesterolemia Familiar Possível |

Adaptado de [80-81]

ANEXO III – MODELO DE QUESTIONÁRIO, ADAPTADO DO “SIMON BROOME HEART RESEARCH STUDY”, QUE É PREENCHIDO PELO MÉDICO ASSISTENTE, E UMA DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO QUE É ASSINADO POR CADA INDIVÍDUO QUE PARTICIPA NO ESTUDO.

ANEXO IV - DAYTONA RX: COMPOSIÇÃO DOS REAGENTES UTILIZADOS, ABSORVÂNCIA E INTERVALOS DE REFERÊNCIA PARA SDLDL E APOLIPOPROTEÍNAS EM ESTUDO.

Tabela IV.1 – composição dos reagentes utilizados no daytona, absorvância aplicada e respectivos intervalos de referência.

| Reagentes utilizados | | Absorvância (nm) | Intervalo de Referência (valores normais) (mg/dL) |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ApoE | R1: Tampão de reacção (buffer Tris/HCl 100 mmol/L, pH 8,5) R2: Reagente de anticorpo (anti-apoE) | 340 | 2,7-4,5 |
| ApoA-II | R1: Tampão de reacção (buffer Tris/HCl 100 mmol/L, pH 8,5) R2: Reagente de anticorpo (anti-apoA-II) | 340 | 25,1-34,5 |
| ApoC-II | R1: Tampão de reacção (buffer Tris/HCl 100 mmol/L, pH 8,5) R2: Reagente de anticorpo (anti-apoC-II) | 600 | 1,6-4,2 |
| ApoC-III | R1: Tampão de reacção (buffer Tris/HCl 100 mmol/L, pH 8,5) R2: Reagente de anticorpo (anti-apoC-III) | 340 | 5,5-9,5 |
| sdLDL | R1: Tampão pH 7,0, esfingomielina 2700 U/L, Colesterol esterase (1600 U/L, colesterol oxidase 600 U/L, catalase N-etil-N-(2-Hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilnilina 2,0 mmol/L, Albumina de soro de bovino 1,0% p/v R2: Tampão pH 7,0, peroxidase 5000 U/L, 4-aminoantipirina 4 mmol/L, azida de sódio 0,05% p/v | 600 | Homens entre 21-44 anos e mulheres entre 21-54 anos: 5,1-60,8 Homens entre 45-75 anos e mulheres entre 55-75 anos: 8,9-64,4 |

ANEXO V - SOLUÇÕES STOCK E SOLUÇÕES DE TRABALHO**I - Extração de DNA:**

- **TKM1 (500 mL)**

5 mL Tris/HCl 1M pH=7,5

5 mL KCl 1M

5 mL MgCl₂ 1M

2 mL EDTA 0,5 M

Perfazer com água até 500 mL

- **TKM2 (100 mL)**

1 mL Tris/HCl 1M pH=7,5

1 mL KCl 1M

1 mL MgCl₂ 1M

400 µL EDTA 0,5 M

8 mL NaCl 5M

Perfazer com água até 100 mL

- **TKMX-100 (500 mL)**

5 mL KCl 1M

5 mL MgCl₂ 1M

2 mL EDTA 0,5 M

12.5 mL Triton X-100

Perfazer com água até 500 mL

- **TE (100 mL)**

1 mL Tris/HCl 1M pH=7,5

400 µL EDTA 1 M pH=8,0

Perfazer com água até 100 mL

- **Tris /HCl 1M pH=7,5**

Dissolver 12.114 g em 100 mL de H₂O desmineralizada

Ajustar o pH a 7,5 com HCl antes de perfazer o volume

- **KCl 1M**

Dissolver 7.45 g em 100 mL de H₂O desmineralizada

- **MgCl₂ 1M**

Dissolver 20.33 g em 100 mL de H₂O bidestilada

- **EDTA 0,5 M**

Dissolver 18.6 g em 100 mL de H₂O desmineralizada

- **EDTA 1 M pH=8,0**

Dissolver 37,2 g em 100 mL de H₂O desmineralizada

Ajustar o pH com HCl antes de perfazer o volume

NaCl 5M

Dissolver 29.2 g em 100 mL de H₂O desmineralizada

Todos os reagentes são autoclavados a 110°C durante 15 minutos e conservados à temperatura ambiente.

II - Solução de deposição – Azul Bromofenol

625 µL Glicerol (Sigma)

625 µL Água desionizada

2,5 µL EDTA 0,5 M (Merck)

Azul de Bromofenol q.b.

Adicionaram-se os componentes num tubo *ependorf* e misturaram-se por inversão. A solução foi guardada à temperatura ambiente.

III - Marcador de peso molecular (PUC)

20 µL Marcador (PUC *ladder*) (Fermentas)

40 µL Água desionizada

10 µL Solução de aplicação para gel de agarose

Adicionaram-se os componentes num tubo *ependorf* e misturaram-se por inversão. A solução foi conservada a 4°C.

ANEXO VI - REAGENTES UTILIZADOS NA EXTRACÇÃO DE DNA E RESPECTIVO VOLUME UTILIZADO.**Tabela VI.1** – volume de reagentes utilizados na extracção de DNA por mL de sangue e por 2,5 mL de sangue.

| Reagente | Volume utilizado por mL de sangue | Volume utilizando para 2,5 ml de Sangue ^a |
|------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------|
| TKMx100 | 1 mL | 2,5 mL |
| IGEPAL | 25 µL | 62,5 µL |
| TKM1 | 1 mL | 2,5 mL |
| TKM2 | 160 µL | 400 µL |
| SDS | 10 µL | 25 µL |
| NaCl | 60 µL | 150 µL |
| Etanol 98% | 460 µL | 1150 µL |

^a 2,5 mL de sangue corresponde ao volume utilizado, regra geral, para a extracção de DNA neste trabalho.

ANEXO VII - SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS* (OLIGONUCLEÓTIdeos INICIADORES) UTILIZADOS, TEMPERATURAS DE HIBRIDAÇÃO E TAMANHO DA REGIÃO AMPLIFICADA POR PCR (AMPLIFICAÇÃO POR REACÇÃO DA POLIMERASE).

Tabela VII.1 - sequência dos *primers*, temperatura de *annealing* e tamanho da região amplificada por PCR de cada um dos exões e promotor do gene LDLR

| Gene LDLR | | | | |
|-------------------|----------------------|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| Exão | Primer | Sequência 5'-3' | Temperatura de <i>annealing</i> | Região Amplificada (pb) |
| Promotor e Exão 1 | SPr+1F SPr+1R | F: GGG TTA AAA AGC CGA TGT CA R: GCC ATT ACC CCA CAA GTC TCC | 59°C | 415 |
| Exão 2 | 2F 2R | F: TCC CAT ACC CCA GAG AGT CCA TA R: CAG CCG CCA TCA TCA AAA AG | 58°C | 587 |
| Exão 3 | MB259 MB260 | F: GAT TAC AGG CGT GAG CCA CT R: CTC CCC AGG ACT CAG ATA GG | 59°C | 250 |
| Exão 4 | EX4F EX4R | F: GTA CAG ATG AGG AAA CTG AG R: TTG GCA TGT TGT TGG AAA TCC | 57°C | 677 |
| Exão 5 | EX5F NEW EX5R NEW | F: GCA AAA GGC CCT GCT TCT TT R: GAG GCT CTG AGA AGT CAA GT | 58°C | 342 |
| Exão 6 | EX6F EX6R | F: ATT ACA GGC ACA AAC CAC CGT G R: GCA GAG TGG AGT TCC CAA AAC C | 59°C | 370 |
| Exão 7 | LDL 7F LDL 7R | F: GAG TGA CCA GTC TGC ATC CC R: GAA GCG CAG AGG GGG CCC AG | 63°C | 198 |
| Exão 8 | MB30 MB31 | F: ATC TCC CGA GAG GCT GGG CTG TCT R: CCC GGT CAG GGG ATA TGA GTC TGT | 62°C | 361 |
| Exão 9+10 | EX9+10F EX9+10R | F: GGT CTT TTC CAC CCT CTT TTT C R: TAA CCA GTT CCT GAA GCT CC | 58°C | 695 |
| Exão 11 | EX11F EX11R | F: GCC ACA TTT GGA GTT TGG GGT TC R: AGC AGC TTG GGC TTG TCC CAG A | 60°C | 355 |
| Exão 12 | EX12F EX12R | F: GGT GCT TTT CTG CTA GGT CC R: TTT TCT CGC TTC ATC TTG GCT | 59°C | 347 |
| Exão 13 | EX13F EX13R | F: CTA GTT GTG GAG AGA GGG TGG C R: GCG GAG TCA GGG CAG GAA CGA GA | 60°C | 342 |
| Exão 14 | EX14F EX14R | F: GAA ACC TCC TTG TGG AAA CTC T R: GAA AAG TAT GGT TAT CCC GAC T | 58°C | 388 |
| Exão 15 | EX15F EX15R | F: CCA AGG TCA TTT GAG ACT TTC GT R: GAG AGA AGG TCA GCA AGG GAG TG | 60°C | 386 |
| Exão 16 | EX16F EX16R | F: GTC CTC TGC CTG CTC CAT TTC TT R: ATC CTC CAT CTG ACC CCT TAG C | 60°C | 348 |
| Exão 17 | R17F R17R | F: GAG CTG GGT CTC TGG TCT CG R: GCG CAC AGA AGC ATT CAC CT | 60°C | 352 |
| Exão 18 | EX18F EX18R | F: GAG CGG TGG GAA GTG ACT GAA T R: TGG TGC CAT CTG CTG TTG TGT G | 59°C | 591 |

Tabela VII.2 - sequência dos *primers*, temperatura de *annealing* e tamanho da região amplificada por PCR dos fragmentos dos exões estudados do gene APOB.

| Gene APOB | | | | |
|-----------|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| Exão | Primer | Sequência 5'-3' | Temperatura de <i>annealing</i> | Região Amplificada (pb) |
| Exão 26 | P61 P62 | F: GGA GCA GTT GAC CAC AAG CTT AGC TTG GAA R: CAG GGT GGC TTT GCT TGT ATG TTC TCC GTT | 59°C | 343 |
| Exão 29 | MB63 MB64 | F: CCA AGA TGA GAT CAA CAC AAT C R: AAC TTG ACT TGA GAG TTG GG | 59°C | 334 |

Tabela VII.3- sequência dos *primers*, temperatura de *annealing* e tamanho da região amplificada por PCR do exão 4 do gene APOE

| Gene APOE | | | | |
|-----------|--------|--------------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| Exão | Primer | Sequência 5'-3' | Temperatura de <i>annealing</i> | Região Amplificada (pb) |
| Exão 4 | P2 | F: TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A | 58°C | 244 |
| | P1 | R:ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC | | |

Tabela VII.4 - sequência dos *primers*, temperatura de *annealing* e tamanho da região amplificada dos fragmentos de cDNA amplificados por PCR.

| Gene LDLR | | | | |
|-----------|--------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| Exão | Primer | Sequência 5'-3' | Temperatura de <i>annealing</i> | Região Amplificada (pb) |
| Exão 1-3 | MB22 | F:GGC TGG AAA TTG CGC TGG AC | 63°C | 254 |
| | MB23 | R:CAC CTC CAG AAC TGA GGA ATG C | | |

ANEXO VIII - SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS* UTILIZADOS, TEMPERATURAS DE HIBRIDAÇÃO E TAMANHO DA REGIÃO AMPLIFICADA NA TÉCNICA DHPLC.

Tabela VIII.1 - sequência dos *primers*, temperatura de *annealing* e tamanho da região amplificada do exão 9 por dHPLC.

| Gene LDLR | | | | |
|-----------|--------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| Exão | Primer | Sequência 5'-3' | Temperatura de <i>annealing</i> | Região Amplificada (pb) |
| Exão 9 | MB32 | F:AAG GGG ATG GGG AGG CAC TCT TG | 61°C | 295 |
| | MB33 | R: ACC CCG TGC CAT TAC CCC ACA AGT | | |

ANEXO IX - SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS* UTILIZADOS, TEMPERATURAS DE HIBRIDAÇÃO E TAMANHO DA REGIÃO AMPLIFICADA NA SEQUENCIACÃO AUTOMÁTICA

Tabela IX.1 - sequência dos *primers*, temperatura de ligação e tamanho da região amplificada na sequenciação, para os vários exões do gene LDLR.

| Gene LDLR | | | | |
|-------------------|----------|------------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Exão | Primer | Sequência 5'-3' | Temperatura de annealing | Região Amplificada (pb) |
| Promotor e Exão 1 | MB257 | F: GGG TTA AAA AGC CGA TGT CA | 58°C | 416 |
| Exão 2 | 2F | F: TCC CAT ACC CCA GAG AGT CCA TA | | 587 |
| Exão 3 | MB259 | F: GAT TAC AGG CGT GAG CCA CT | | 250 |
| Exão 4 | R4F | F:GTA CAG ATG AGG AAA CTG AG | | 677 |
| Exão 5 | EX5F NEW | F: GCA AAA GGC CCT GCT TCT TT | | 342 |
| Exão 6 | EX6F | F: ATT ACA GGC ACA AAC CAC CGT G | | 370 |
| Exão 7 | LDL 7F | F: GAG TGA CCA GTC TGC ATC CC | | 198 |
| Exão 8 | MB30 | F: ATC TCC CGA GAG GCT GGG CTG TCT | | 361 |
| Exão 9+10 | EX9+10F | F: GGT CTT TTC CAC CCT CTT TTT C | | 695 |
| Exão 11 | EX11R | R: AGC AGC TTG GGC TTG TCC CAG A | | 355 |
| Exão 12 | EX12F | F: GGT GCT TTT CTG CTA GGT CC | | 347 |
| Exão 13 | EX13F | F: CTA GTT GTG GAG AGA GGG TGG C | | 342 |
| Exão 14 | EX14F | F: GAA ACC TCC TTG TGG AAA CTC T | | 388 |
| Exão 15 | EX15F | F: CCA AGG TCA TTT GAG ACT TTC GT | | 386 |
| Exão 16 | EX16F | F: GTC CTC TGC CTG CTC CAT TTC TT | | 348 |
| Exão 17 | R17F | F: GAG CTG GGT CTC TGG TCT CG | | 352 |
| Exão 18 | EX18 | F: GAG CGG TGG GAA GTG ACT GAA T | | 591 |

Tabela IX.2 - sequência dos *primers*, temperatura de ligação e tamanho da região amplificada na sequenciação, para os fragmentos dos exões estudados do gene APOB.

| Gene APOB | | | | |
|-----------|--------|--------------------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Exão | Primer | Sequência 5'-3' | Temperatura de annealing | Região Amplificada (pb) |
| Exão 26 | P62 | R: CAG GGT GGC TTT GCT TGT ATG TTC TCC GTT | 58°C | 288 |
| Exão 29 | MB63 | F: CCA AGA TGA GAT CAA CAC AAT C | | 334 |

Tabela IX.3 - sequência dos *primers*, temperatura de ligação e tamanho da região amplificada na sequenciação, para o exão 4 estudados do gene APOE.

| Gene APOE | | | | |
|-----------|--------|--------------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Exão | Primer | Sequência 5'-3' | Temperatura de annealing | Região Amplificada (pb) |
| Exão 4 | P2 | F: TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A | 58°C | 244 |

Tabela IX.4 - sequência dos *primers*, temperatura de ligação e tamanho da região amplificada na sequenciação, para os exões 1,2 e 3 do cDNA do gene LDLR.

| Gene LDLR | | | | |
|-----------|--------|----------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Exão | Primer | Sequência 5'-3' | Temperatura de annealing | Região Amplificada (pb) |
| Exões 1-3 | MB22 | F:AAG GGG ATG GGG AGG CAC TCT TG | 58°C | 295 |

ANEXO X - SONDAS UTILIZADAS EM MLPA

Tabela X.1 - sequência e características das sondas utilizadas em MLPA (provenientes do kit) para estudo do gene LDLR

| Exão | Local de ligação | Sequência Parcial 5'-3' (24 nt adjacente ao local de ligação) | Tamanho (nt) | Distância da próxima sonda (kb) | Sonda MLPA (SALSA) |
|--------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------|---------------------------------|--------------------|
| Gene SMARCA4 | NM_001128849.1;4834-4835 | CGTCTTGACAGTC-GGTCTTACCAG | 142 | 29,5 | 02488-L13996 |
| Codão de iniciação | 188-190 (exão 1) | | | | |
| Promotor | 54 nt antes do exão 1 | CTGGAGTGGGAA-TCAGAGCTTCAC | 436 | 0,2 | 06281-L12682 |
| Exão 1 | 150-151 | CAGCAGGTCGTG-ATCCGGGTCGGG | 148 | 10,7 | 02309-L01800 |
| Exão 2 | 300-301 | CCAAGACGGGAA-ATGCATCTCCTA | 160 | 2,4 | 02310-L01801 |
| Exão 3 | 401-402 | GCAAATCCGGGG-ACTTCAGCTGTG | 184 | 2,6 | 02312-L01803 |
| Exão 4 | 578-579 | TCTGTGACTCAG-ACCGGGACTGCT | 212 | 1,3 | 02314-L01805 |
| Exão 5 | 948-949 | TGGCAGCCGGCA-GTGTGACCGGGA | 238 | 0,9 | 02316-L01807 |
| Exão 6 | 1097-1098 | GAGACTGCCGGG-ACTGGTCAGATG | 265 | 3,2 | 02318-L01811 |
| Exão 7 | 1186-1187 | AATGACCTTAAG-ATCGGCTACGAG | 292 | 0,9 | 02320-L01811 |
| Exão 8 | 1310-1311 | TGGAGGGTGGCT-ACAAGTGCCAGT | 319 | 1,8 | 02322-L09533 |
| Exão 9 | 1430-1431 | AGATGACGCTGG-ACCGGAGCGAGT | 346 | 0,4 | 02324-L01815 |
| Exão 10 | 1729-1730 | TTATTCAGGGAG-AACGGCTCCAAG | 391 | 2,4 | 03003-L02442 |
| Exão 11 | 1810-1811 | ACTCCCGCCAAG-ATCAAGAAAGGG | 166 | 0,7 | 02311-L01802 |
| Exão 12 | 18 nt antes do exão 12 | TGACCTCTCCTT-ATCCACTTGTGT | 193 | 3,3 | 02313-L01804 |
| Exão 13 | 2084-2085 | TCAGTGCCAACC-GCCTCACAGGTT | 400 | 0,5 | 03004-L12681 |
| Exão 14 | 100 nt antes do exão 14, <i>reverse</i> | CTCATGAGTCCT-TACAACGACCTT | 220 | 2,7 | 11838-L12635 |
| Exão 15 | 2442-2443 | CACCTCCCGGCT-GCCTGGGGCCAC | 247 | 0,3 | 02317-L01808 |
| Exão 15 | 259 nt antes do exão 15 | CTGGTTCCCAA-GTCAGCCACGCA | 427 | 4,4 | 10781-L11396 |
| Exão 16 | 2530-2531 | AGAGGAAATGAG-AAGAAGCCCAGT | 274 | 1,5 | 02319-L01810 |
| Exão 17 | 2657-2658 | GCATCAACTTTG-ACAACCCGTCT | 301 | ,17 | 02321-L01812 |
| Exão 18 | 2759-2760 | GTCTGGAGGATG-ACGTGCGTGAA | 328 | 38,6 | 02323-L01814 |
| Codão STOP | 2768-2770 (exão 18) | | | | |
| Gene KANK2 | NM_015493.6; 2546-2547 | TGGTGGCCTTGG-ACGCAGGGCAGA | 355 | | 02325-L01816 |

ANEXO XI - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOQUÍMICA DA AMOSTRA DE INDIVÍDUOS (ÍNDICE E FAMILIARES) ESTUDADOS.

Tabela XI.1 – caracterização da amostra: resultado da caracterização molecular, idade de diagnóstico e caracterização clínica dos principais parâmetros bioquímicos estudados

| Família | ID | Mutação | Gene | Idade Diagnóstico | Caracterização Clínica | | | | | | | | Medicação ^c |
|---------|-------|------------------------------------|------|-------------------|---------------------------------------|-------|-------|-----|-------------------------------|-------|-------|-------|------------------------|
| | | | | | Antes tratamento (mg/dL) ^a | | | | Presente (mg/dL) ^b | | | | |
| | | | | | CT | LDL-C | HDL-C | TG | CT | LDL-C | HDL-C | TG | |
| F10 | 99011 | c.2054C>T (p.Pro685Leu) | LDLR | 50 | 541 | 490 | 36 | 174 | 341 | 268 | 43 | 153 | S (Estatinas) |
| | 29229 | - | | 36 | | | | | 199 | 140 | 43 | 90 | N |
| | 11137 | c.2054C>T (p.Pro685Leu) | LDLR | 71 | | | | | 219 | 166 | 45 | 75 | S (Estatinas) |
| | 11138 | - | | 35 | 282 | | | 447 | 250 | 200 | 36 | 234 | N |
| | 11140 | c.2054C>T (p.Pro685Leu) | LDLR | 43 | | | | | 257 | 216 | 43 | 118 | S (Estatinas) |
| | 11141 | c.2054C>T (p.Pro685Leu) | LDLR | 14 | | | | | 200 | 150 | 38 | 126 | N |
| | 11142 | c.2054C>T (p.Pro685Leu) | LDLR | 42 | | | | | 187 | 145 | 38 | 68 | S (Estatinas) |
| | 11143 | c.2054C>T (p.Pro685Leu) | LDLR | 18 | | | | | 308 | 260 | 34 | 179 | N |
| | 11144 | - | | 11 | | | | | 211 | 153 | 51 | 130 | N |
| | 11175 | - | | 45 | | | | | 227 | 172 | 33 | 141 | N |
| F11 | 99012 | c.1027G>A (p.Gly343Ser) | LDLR | 15 | 293 | 209 | 78 | 65 | 256 | 167 | 75 | 69 | N (Dieta) |
| | 21020 | c.1027G>A (p.Gly343Ser) | LDLR | 51 | | | | | 286,1 | 213,9 | 44,8 | 136,3 | N |
| | 21021 | - | | 52 | | | | | 324 | 242 | 54 | 141 | N |
| | 21022 | - | | 27 | | | | | 163 | 110 | 38 | 75 | N |
| | 21034 | - | | 25 | | | | | 233 | 153 | 49 | 155 | N |
| | 11145 | - | | 56 | 204 | | 86 | 49 | 187 | 121 | 67 | 58 | N |
| F73 | 21023 | c.369_393del25 (p.Ser123SerfsX176) | LDLR | 14 | 354 | 286 | 46 | 104 | 232 | 174 | 30 | 139 | S (Estatinas) |
| | 21024 | c.369_393del25 (p.Ser123SerfsX176) | LDLR | 40 | | | | | 442 | 328 | 30 | 426 | N |
| | 21038 | - | | 43 | | | | | 212 | 138 | 62 | 59 | N |
| | 11301 | - | | 26 | | | | | 151 | 90 | 39 | 113 | N |
| F79 | 21037 | c.1060+1G>A | LDLR | 47 | | | | | 275 | 211 | 40 | 118 | S (Estatinas) |
| | 24032 | c.1060+1G>A | LDLR | 12 | | | | | 363 | 285 | 53 | 124 | N |
| | 24033 | - | | 67 | | | | | 272 | 166 | 91 | 75 | N |
| | 24034 | c.1060+1G>A | LDLR | 77 | | | | | 255 | 188 | 41 | 126 | N |
| | 24035 | - | | 43 | | | | | 242 | 163 | 58 | 107 | N |
| | 11027 | - | | 82 | | | | | 182 | 77 | 81 | 87 | S (Estatinas) |

^a Caracterização bioquímica antes de tratamento: valores indicados pelo médico responsável no anexo correspondente a cada indivíduo.

^b Caracterização bioquímica no presente: efectuada no INSA às amostras recebidas para o estudo; necessário ter atenção coluna da medicação.

^c Medicação (legenda): S – em medicação; N – sem medicação.

Tabela XI.1 – caracterização da amostra: resultado da caracterização molecular, idade de diagnóstico e caracterização clínica dos principais parâmetros bioquímicos estudados (continuação).

| Família | ID | Mutação | Gene | Idade Diagnóstico | Caracterização Clínica | | | | | | | | Medicação ^c | |
|---------|-------|-------------------------------------|------|-------------------|---------------------------------------|-------|-------|-----|-------------------------------|-------|-------|-----|---------------------------------------|--------------|
| | | | | | Antes tratamento (mg/dL) ^a | | | | Presente (mg/dL) ^b | | | | | |
| | | | | | CT | LDL-C | HDL-C | TG | CT | LDL-C | HDL-C | TG | | |
| F86 | 22001 | c.670G>A (p.Asp224Asn) | LDLR | 50 | 300 | | | | | 254 | 182 | 63 | 46 | S (Fibratos) |
| | 20084 | c.670G>A (p.Asp224Asn) | LDLR | 36 | | | | | | 297 | 224 | 48 | 125 | S |
| | 22040 | c.670G>A (p.Asp224Asn) | LDLR | 14 | | | | | | 315 | 248 | 57 | 48 | N (Dieta) |
| | 23028 | c.670G>A (p.Asp224Asn) | LDLR | 16 | | | | | | 241 | 156 | 70 | 77 | N |
| | 23029 | c.670G>A (p.Asp224Asn) | LDLR | 37 | | | | | | 239 | 151 | 75 | 66 | N |
| | 11213 | c.670G>A (p.Asp224Asn) | LDLR | 18 | | | | | | 307 | 233 | 50 | 107 | N |
| | 11214 | c.670G>A (p.Asp224Asn) | LDLR | 19 | | | | | | 287 | 209 | 35 | 238 | N |
| F113 | 25001 | c.10580G>A (p.Arg3527Gln) | ApoB | 27 | 328 | 253 | 50 | 124 | 283 | 220 | 45 | 88 | S (Estatinas) | |
| | 25002 | c.10580G>A (p.Arg3527Gln) | ApoB | 68 | | | | | 360 | 257 | 80 | 114 | N | |
| | 12012 | - | | 32 | | | | | 208 | 138 | 33 | 211 | N | |
| F147 | 26043 | c.829G>A (p.Glu277Lys) ^Φ | LDLR | 42 | 346 | 195 | 68 | 141 | 158 | 66 | 57 | 175 | N | |
| | 27043 | - | | 74 | | | | | 170 | 99 | 53 | 91 | S (Estatinas) | |
| | 27044 | c.829G>A (p.Glu277Lys) ^Φ | LDLR | 33 | 186 | 55 | 113 | 92 | 182 | 66 | 100 | 80 | N | |
| | 27045 | c.829G>A (p.Glu277Lys) ^Φ | LDLR | 76 | 141 | 93 | 46 | | 160 | 94 | 53 | 63 | N | |
| | | c.631C>G (p.His211Asp) | | | | | | | | | | | | |
| F156 | 26061 | c.1178delA (p.Lys372ArgfsX20) | LDLR | 29 | 561 | 515 | | | 317 | 250 | 39 | 97 | S (Estatinas; Ezetimiba; LDL aferese) | |
| | | c.1816G>T (p.Ala585Ser) | | | | | | | | | | | | |
| | 11319 | c.1816G>T (p.Ala585Ser) | LDLR | 55 | 230 | | | | 256 | 178 | 54 | 56 | N | |
| | 11320 | c.631C>G (p.His211Asp) | | | | | | | | | | | | |
| | 11320 | c.1178delA (p.Lys372ArgfsX20) | LDLR | 65 | 480 | | | | 333 | 243 | 42 | 231 | S (Estatinas) | |
| F172 | 26099 | c.1633G>T (p.Gly545Trp) | LDLR | 6 | 306 | 170 | 121 | 76 | 279 | 186 | 83 | 52 | N | |
| | 26100 | c.1633G>T (p.Gly545Trp) | LDLR | 39 | 294 | | | | 285 | 187 | 81 | 84 | S (Fibratos) | |
| | 26101 | c.1633G>T (p.Gly545Trp) | LDLR | 36 | 300 | | | | 200 | 108 | 60 | 161 | S (Estatinas) | |
| | 11261 | c.1633G>T (p.Gly545Trp) | LDLR | 11 | 339 | 277 | 42 | 100 | 211 | 155 | 41 | 71 | S (Estatinas) | |
| | 11262 | c.1633G>T (p.Gly545Trp) | LDLR | 4 | 282 | 216 | 38 | 138 | 227 | 161 | 51 | 87 | S (Estatinas) | |
| | 11263 | c.1633G>T (p.Gly545Trp) | LDLR | 38 | 272 | 214 | 62 | 128 | 255 | 195 | 40 | 93 | S (Estatinas) | |
| | 11264 | - | - | 29 | 226 | 145 | 53 | 138 | 226 | 134 | 69 | 121 | S (Estatinas) | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| F189 | 26130 | c.1322T>C (p.Ile441Thr) | LDLR | 73 | | | | | 266 | 193 | 53 | 100 | S (Estatinas) | |
| | 26131 | c.1322T>C (p.Ile441Thr) | LDLR | 53 | 443 | 314 | 58 | 123 | 299 | 225 | 61 | 65 | S (Estatinas) | |
| | 26132 | - | - | 27 | | | | | 205 | 89 | 105 | 55 | S (Ezetimiba) | |
| | 26133 | c.1322T>C (p.Ile441Thr) | LDLR | 18 | 333 | 247 | 56 | 83 | 187 | 118 | 54 | 74 | N | |

^a Caracterização bioquímica antes de tratamento: valores indicados pelo médico responsável no anexo correspondente a cada indivíduo.^b Caracterização bioquímica no presente: efectuada no INSA às amostras recebidas para o estudo; necessário ter atenção coluna da medicação.^c Medicação (legenda): S – em medicação; N – sem medicação.

Φ – alteração não patogénica

Tabela XI.1 – caracterização da amostra: resultado da caracterização molecular, idade de diagnóstico e caracterização clínica dos principais parâmetros bioquímicos estudados (continuação).

| | | | | | Caracterização Clínica | | | | | | | | |
|---------|-------|----------------------------------------------------------------|------|-------------------|---------------------------------------|-------|-------|------|-------------------------------|-------|-------|-----|--------------------------|
| Família | ID | Mutação | Gene | Idade Diagnóstico | Antes tratamento (mg/dL) ^a | | | | Presente (mg/dL) ^b | | | | Medicação ^c |
| | | | | | CT | LDL-C | HDL-C | TG | CT | LDL-C | HDL-C | TG | |
| F238 | 27168 | c.530C>T (p.Ser177Leu) c.1279A>C (p.Arg427Arg) ^Δ | LDLR | 35 | >300 | | | | 251 | 171 | 70 | 49 | S (Estatinas) |
| | 28112 | c.530C>T (p.Ser177Leu) | LDLR | 13 | 327 | 249 | 60 | 95 | 173 | 98 | 52 | 59 | S (Estatinas) |
| | 28113 | c.1279A>C (p.Arg427Arg) ^Δ | LDLR | 9 | | | | | 165 | 83 | 67 | 42 | N |
| | 28123 | c.530C>T (p.Ser177Leu) | LDLR | 42 | 400 | | | | 179 | 86 | 80 | 35 | S (Estatinas; Ezetimiba) |
| | 28125 | - | | 42 | 280 | | | | 164 | 70 | 70 | 81 | S (Estatinas) |
| | 29006 | c.530C>T (p.Ser177Leu) | LDLR | 35 | >400 | | | | 220 | 167 | 34 | 132 | S |
| | 29189 | - | | 25 | 173 | 127 | | | 173 | 97 | 71 | 60 | N |
| | 29199 | - | | 21 | | | | | 154 | 97 | 47 | 78 | N |
| | 12001 | c.530C>T (p.Ser177Leu) | LDLR | 9 | 265 | 207 | 40 | 88 | 248 | 196 | 43 | 61 | N |
| | 12002 | c.530C>T (p.Ser177Leu) | LDLR | 4 | 298 | 240 | 39 | 93 | 312 | 254 | 45 | 60 | N |
| F262 | 28002 | Pr_Ex2del + Ex8_12del | LDLR | 16 | 294 | 233 | 48 | 47 | 306 | 219 | 41 | 59 | N (Dieta) |
| | 28004 | Pr_Ex2del + Ex8_12del | LDLR | 46 | 300 | | | | 340 | 284 | 36 | 98 | S (Estatinas) |
| | 28010 | Pr_Ex2del + Ex8_12del | LDLR | 12 | 271 | 209 | 52 | 50 | 263 | 197 | 56 | 51 | N (Dieta) |
| | 28012 | - | | 18 | | | | | 134 | 72 | 49 | 64 | N |
| | 12072 | Pr_Ex2del + Ex8_12del | LDLR | 54 | | | | | 299 | 226 | 47 | 185 | S |
| | 12073 | - | | 49 | | | | | 209 | 131 | 65 | 90 | S |
| F286 | 28063 | Pr_Ex2del + Ex8_12del | LDLR | 15 | 316 | 228 | 62 | 127 | 233 | 173 | 49 | 57 | N |
| | 28064 | - | | 41 | | | | | 194 | 107 | 52 | 173 | N |
| | 28065 | Pr_Ex2del + Ex8_12del | LDLR | 39 | | | | | 230 | 163 | 52 | 77 | N |
| F289 | 28069 | Pr_Ex2del + Ex8_12del | LDLR | 9 | 306 | 52,3 | | 80,9 | 306 | 199 | 45 | 42 | N |
| | 28070 | - | | 37 | | | | | 195 | 88 | 70 | 80 | N |
| | 28071 | Pr_Ex2del + Ex8_12del | LDLR | 38 | 300 | | | | 266 | 88 | 43 | 94 | N |
| | 11347 | Pr_Ex2del + Ex8_12del | LDLR | 73 | | | | | 276 | 210 | 51 | 93 | N |
| | 11348 | Pr_Ex2del + Ex8_12del | LDLR | 71 | | | | | 233 | 160 | 44 | 140 | S (Estatinas) |

^a Caracterização bioquímica antes de tratamento: valores indicados pelo médico responsável no anexo correspondente a cada indivíduo.^b Caracterização bioquímica no presente: efectuada no INSA às amostras recebidas para o estudo; necessário ter atenção coluna da medicação.^c Medicação (legenda): S – em medicação; N – sem medicação.^Δ – alteração não descrita;

Tabela XI.1 – caracterização da amostra: resultado da caracterização molecular, idade de diagnóstico e caracterização clínica dos principais parâmetros bioquímicos estudados (continuação).

| Caracterização Molecular, Idade de Diagnóstico e Caracterização Clínica dos Principais Parâmetros Bioquímicos Estudados | | | | | Caracterização Clínica | | | | | | | | Medicação ^c |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------------------------|------|-------------------|---------------------------------------|-------|-------|-----|-------------------------------|-------|-------|-----|--------------------------|
| Família | ID | Mutação | Gene | Idade Diagnóstico | Antes tratamento (mg/dL) ^a | | | | Presente (mg/dL) ^b | | | | |
| | | | | | CT | LDL-C | HDL-C | TG | CT | LDL-C | HDL-C | TG | |
| F298 | 28095 | c.1633G>T (p.Gly524Trp) | LDLR | 15 | 244 | 161 | 29 | 35 | 197 | 129 | 38 | 100 | S (Resinas) |
| | 28096 | - | | 12 | 173 | 114 | 46 | 66 | 167 | 99 | 48 | 76 | N |
| | 28097 | - | | 43 | 229 | | 49 | 190 | 235 | 160 | 39 | 133 | N |
| | 28098 | c.1633G>T (p.Gly524Trp) | LDLR | 43 | 259 | | 57 | 115 | 257 | 178 | 48 | 76 | N |
| | 28099 | c.1633G>T (p.Gly524Trp) | LDLR | 68 | | | | | 172 | 104 | 49 | 58 | N |
| | 12090 | c.1633G>T (p.Gly524Trp) | LDLR | 41 | | | | | 365 | 283 | 58 | 131 | N |
| | 12091 | - | | 43 | | | | | 156 | 86 | 47 | 175 | N |
| | 12092 | c.1633G>T (p.Gly524Trp) | LDLR | 37 | | | | | 256 | 186 | 52 | 112 | N |
| | 12093 | - | | 45 | | | | | 227 | 165 | 42 | 118 | N |
| F350 | 29019 | c.1291G>A (p.Ala410Thr) | LDLR | 20 | 304 | 238 | 44 | 110 | 291 | 226 | 45 | 166 | S (Estatinas) |
| | 29021 | c.1291G>A (p.Ala410Thr) | LDLR | 10 | | | | | 291 | 233 | 49 | 72 | N (Dieta) |
| | 29020 | c.1291G>A (p.Ala410Thr) | LDLR | 45 | | | | | 242 | 166 | 50 | 188 | S (Estatinas) |
| | 11321 | c.1291G>A (p.Ala410Thr) | LDLR | 70 | | | | | 189 | 103 | 65 | 89 | N |
| | 11322 | c.1291G>A (p.Ala410Thr) | LDLR | 33 | 387 | | 45 | 106 | 427 | 308 | 56 | 227 | N |
| | 11323 | c.1291G>A (p.Ala410Thr) | LDLR | 52 | | | | | 264 | 187 | 49 | 116 | S |
| F386 | 29094 | c.530C>T (p.Ser177Leu) | LDLR | 3 | 348 | | 59 | | 334 | 251 | 52 | 99 | N |
| | 29095 | - | LDLR | 31 | | | | | 145 | 81 | 54 | 47 | N |
| | 29096 | c.530C>T (p.Ser177Leu) | LDLR | 25 | | | | | 276 | 197 | 58 | 75 | N |
| | 11331 | c.530C>T (p.Ser177Leu) | LDLR | 55 | | | | | 217 | 145 | 50 | 99 | S (Estatinas; Ezetimiba) |
| F390 | 29105 | c.-13A>G ^Φ | LDLR | 57 | 356 | 272 | 46 | 192 | 237 | 172 | 49 | 110 | S (Estatinas) |
| | 29106 | - | LDLR | 54 | | | | | 254 | 163 | 50 | 183 | S (Estatinas) |
| | 29107 | c.-13A>G ^Φ | LDLR | 58 | | | | | 204 | 127 | 59 | 111 | S (Estatinas) |
| | 29150 | - | LDLR | 28 | | | | | 225 | 147 | 73 | 37 | N |
| | 29151 | c.-13A>G ^Φ | LDLR | 31 | | | | | 237 | 169 | 59 | 82 | N |
| F392 | 29109 | c.-135 C>G | LDLR | 9 | 285 | | 36 | 89 | 223 | 152 | 58 | 39 | N (Dieta) |
| | 29110 | c.-135 C>G | LDLR | 41 | | | | | 199 | 133 | 51 | 70 | S (Estatinas) |
| | 29111 | c.-135 C>G | LDLR | 50 | | | | | 258 | 193 | 45 | 67 | S (Estatinas) |
| | 29112 | - | | 47 | | | | | 185 | 111 | 64 | 58 | S (Estatinas) |
| | 29113 | c.-135 C>G | LDLR | 20 | | | | | 274 | 191 | 62 | 78 | S (Estatinas) |
| | 29114 | - | | 21 | | | | | 176 | 109 | 51 | 58 | S (Estatinas) |
| | 11332 | - | | 10 | | | | | 181 | 102 | 65 | 42 | N |
| | 11333 | - | | 23 | | | | | 212 | 103 | 91 | 90 | N |
| | 11334 | - | | 27 | | | | | 168 | 82 | 73 | 49 | N |

^a Caracterização bioquímica antes de tratamento: valores indicados pelo médico responsável no anexo correspondente a cada indivíduo.^b Caracterização bioquímica no presente: efectuada no INSA às amostras recebidas para o estudo; necessário ter atenção coluna da medicação.^c Medicação (legenda): S – em medicação; N – sem medicação.

Φ – alteração não patogénica

Tabela XI.1 – caracterização da amostra: resultado da caracterização molecular, idade de diagnóstico e caracterização clínica dos principais parâmetros bioquímicos estudados (continuação).

| | | | | | Caracterização Clínica | | | | | | | | |
|---------|-------|------------------------------------|------|-------------------|---------------------------------------|-------|-------|-----|-------------------------------|-------|-------|-----|--------------------------|
| Família | ID | Mutação | Gene | Idade Diagnóstico | Antes tratamento (mg/dL) ^a | | | | Presente (mg/dL) ^b | | | | Medicação ^c |
| | | | | | CT | LDL-C | HDL-C | TG | CT | LDL-C | HDL-C | TG | |
| F399 | 29127 | c.1291G>A (p.Ala410Thr) | LDLR | 34 | 292 | | 50 | 211 | 212 | 93 | 85 | 189 | S (Estatinas) |
| | 11203 | c.1291G>A (p.Ala410Thr) | LDLR | 44 | | | | | 222 | 158 | 41 | 161 | S (Estatinas; Ezetimiba) |
| F407 | 29142 | c.1935_1936insA (p.Asn645LysfsX24) | LDLR | 56 | 400 | | | | | | | | S |
| | 29143 | c.1935_1936insA (p.Asn645LysfsX24) | LDLR | 13 | | | | | 222 | 167 | 48 | 70 | S (Estatinas) |
| | 11231 | c.1935_1936insA (p.Asn645LysfsX24) | LDLR | 7 | | | | | 178 | 90 | 72 | 99 | N |
| | 11232 | - | | 38 | | | | | 305 | 200 | 59 | 281 | S (Estatinas) |
| F466 | 29275 | c.1633G>T (p.Gly545Trp) | LDLR | 15 | 275 | 215 | 54 | 108 | 203 | 142 | 40 | 139 | S (Estatinas) |
| | 29276 | - | | 43 | | | | | 279 | 190 | 48 | 297 | N |
| | 29277 | c.1633G>T (p.Gly545Trp) | LDLR | 48 | | | | | 230 | 159 | 39 | 218 | S (Estatinas; Ezetimiba) |
| | 11154 | c.1633G>T (p.Gly545Trp) | LDLR | 73 | | | | | 345 | 257 | 219 | 27 | 154 |
| F513 | 10098 | c.13158delA (p.Glu4387AsnfsX7) | APOB | 50 | 400 | 198 | 47 | 265 | 166 | 96 | 46 | 175 | S (Estatinas) |
| | 12043 | c.13158delA (p.Glu4387AsnfsX7) | APOB | 60 | | | | | 225 | 155 | 51 | 107 | N |
| F530 | 10128 | c.1876G>A (p.Glu626Lys) | LDLR | 9 | | | | | 243 | 170 | 42 | 217 | N |
| | 10129 | c.1876G>A (p.Glu626Lys) | LDLR | 32 | | | | | 183 | 109 | 49 | 137 | N |
| | 10130 | - | | 34 | | | | | 222 | 166 | 27 | 161 | S (Estatinas; Ezetimiba) |
| | 10131 | - | | 11 | | | | | 141 | 81 | 43 | 93 | N |
| F535 | 10137 | c.1A>C (p.Met1Leu) | LDLR | 3 | 301 | 187 | 38 | 382 | 281 | 226 | 47 | 93 | N |
| | 10138 | c.1A>C (p.Met1Leu) | LDLR | 38 | 470 | | | | 491 | 392 | 77 | 110 | N |
| | 10139 | c.1A>C (p.Met1Leu) | LDLR | 3 | 294 | 204 | 39 | 255 | 284 | 220 | 51 | 95 | S (Estatinas) |
| F539 | 10146 | c.1291G>A (p.Ala410Thr) | LDLR | 11 | 416 | 334 | 40 | 211 | 275 | 214 | 48 | 155 | S (Estatinas) |
| | 10147 | c.1291G>A (p.Ala410Thr) | LDLR | 34 | | | | | 344 | 257 | 65 | 187 | S (Estatinas) |
| | 10148 | - | | 37 | | | | | 295 | 228 | 51 | 147 | S (Estatinas) |
| | 10149 | c.1291G>A (p.Ala410Thr) | LDLR | 6 | | | | | 368 | 307 | 40 | 109 | N |
| | 10150 | - | | 71 | | | | | 139 | 70 | 46 | 169 | S (Estatinas) |
| | 10151 | c.1291G>A (p.Ala410Thr) | LDLR | 73 | | | | | 274 | 199 | 57 | 97 | S (Estatinas) |
| F579 | 11061 | c.1176C>A (p.Cys392X) | LDLR | 51 | 346 | 238 | 29 | 145 | 295 | 188 | 28 | 374 | S (Estatinas) |
| | 11062 | c.1176C>A (p.Cys392X) | LDLR | 46 | 334 | 263 | 40 | 119 | 205 | 148 | 36 | 73 | S (Estatinas) |
| | 11063 | c.1176C>A (p.Cys392X) | LDLR | 19 | 318 | | 49 | 54 | 148 | 87 | 45 | 84 | S (Estatinas) |
| | 11084 | - | | 44 | 208 | | | | 203 | 117 | 38 | 208 | N |
| | 11085 | - | | 50 | | | | | 159 | 92 | 50 | 51 | S (Estatinas) |
| | 12004 | c.1176C>A (p.Cys392X) | LDLR | 23 | 221 | 181 | 33 | 63 | 202 | 145 | 32 | 123 | N |
| | 12005 | - | | 20 | 229 | 138 | 52 | 240 | 188 | 96 | 48 | 308 | N |
| | 12006 | c.1176C>A (p.Cys392X) | LDLR | 50 | 413 | 274 | 36 | 112 | 266 | 207 | 31 | 138 | S (Estatinas) |

^a Caracterização bioquímica antes de tratamento: valores indicados pelo médico responsável no anexo correspondente a cada indivíduo.^b Caracterização bioquímica no presente: efectuada no INSA às amostras recebidas para o estudo; necessário ter atenção coluna da medicação.^c Medicação (legenda): S – em medicação; N – sem medicação.

Tabela XI.1 – caracterização da amostra: resultado da caracterização molecular, idade de diagnóstico e caracterização clínica dos principais parâmetros bioquímicos estudados (continuação).

| Caracterização Clínica | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|-------|--------------------------------------|------|-------------------|---------------------------------------|-------|-------|-----|-------------------------------|-------|-------|-----|--------------------------|
| Família | ID | Mutação | Gene | Idade Diagnóstico | Antes tratamento (mg/dL) ^a | | | | Presente (mg/dL) ^b | | | | Medicação ^c |
| | | | | | CT | LDL-C | HDL-C | TG | CT | LDL-C | HDL-C | TG | |
| F586 | 11093 | c.10679A>G (p.Tyr3560Cys) | APOB | 42 | 476 | 342 | 93 | 54 | 414 | 274 | 102 | 60 | S (Estatinas) |
| | 12028 | c.10679A>G (p.Tyr3560Cys) | APOB | 33 | 360 | 281 | 65 | 72 | 262 | 169 | 67 | 82 | S |
| | 12057 | c.10679A>G (p.Tyr3560Cys) | APOB | 14 | 221 | 161 | 45 | 76 | 244 | 176 | 52 | 68 | N |
| F600 | 11147 | c.-135C>G | LDLR | 13 | 260 | 191 | 46 | 93 | 274 | 223 | 45 | 118 | N |
| | 11148 | Normal | LDLR | 41 | | | | | 202 | 124 | 67 | 114 | N |
| | 11149 | c.-135C>G | LDLR | 43 | | | | | 221 | 149 | 63 | 103 | S (Estatinas) |
| | 11150 | Normal | LDLR | 7 | 179 | 102 | 68 | 56 | 168 | 114 | 50 | 45 | N |
| F601 | 11155 | c.1816G>T (p.Ala606Ser) | LDLR | 7 | 229 | 159 | | | 179 | 128 | 53 | 61 | N |
| F601 | 11156 | c.1816G>T (p.Ala606Ser) | LDLR | | 255 | | 35 | 146 | 256 | 183 | 53 | 117 | N |
| F611 | 11184 | c.58G>A (p.Gly20Arg) | LDLR | 13 | 235 | 151 | 69,8 | 71 | 220 | 159 | 57 | 85 | N |
| | 11185 | Normal | LDLR | 39 | | | | | 267 | 193 | 57 | 112 | N |
| F619 | 11215 | c.2291T>C (p.Ile764Thr) ^Δ | LDLR | 12 | 365 | 243 | 106 | 82 | 195 | 109 | 84 | 65 | N |
| | 11216 | c.2291T>C (p.Ile764Thr) ^Δ | LDLR | 40 | | | | | 278 | 205 | 62 | 117 | N |
| | 11218 | Normal | LDLR | 34 | | | | | 175 | 97 | 60 | 119 | S (Estatinas) |
| | 11221 | c.2291T>C (p.Ile764Thr) ^Δ | LDLR | 70 | | | | | 230 | 152 | 56 | 143 | N |
| | 11222 | Normal | LDLR | 45 | | | | | 229 | 149 | 44 | 233 | N |
| | 11223 | Normal | LDLR | 71 | | | | | 135 | 93 | 28 | 118 | N |
| F621 | 11227 | Ex13_15Dup | LDLR | 42 | 400 | | | | 445 | 373 | 50 | 127 | N |
| | 12007 | Ex13_15Dup | LDLR | 15 | 300 | | | | 270 | 215 | 44 | 57 | S (Estatinas) |
| | 12008 | Ex13_15Dup | LDLR | 49 | >400 | | | | 576 | 481 | 52 | 118 | S (Estatinas) |
| | 12009 | Ex13_15Dup | LDLR | 28 | 280 | | | | 212 | 145 | 60 | 74 | S (Estatinas) |
| F627 | 11247 | c.1291G>A (p.Ala431Thr) | LDLR | 33 | 317 | 238 | 64 | 77 | 241 | 154 | 71 | 97 | S (Estatinas) |
| | 11248 | - | | 57 | | | | | 156 | 80 | 60 | 93 | S (Estatinas; Ezetimiba) |
| | 11249 | - | | 36 | | | | | 188 | 109 | 65 | 95 | N |
| F629 | 11258 | ΔPr_ex2 + ex8_12del | LDLR | 4 | 337 | 279 | 50 | | 333 | 260 | 57 | 52 | N |
| | 11259 | ΔPr_ex2 + ex8_12del | LDLR | 28 | | | | | 219 | 147 | 38 | 77 | S (Estatinas) |
| | 11260 | - | | 26 | 160 | | | | 203 | 121 | 54 | 190 | N |
| F644 | 11311 | c.1291G>A (p.Ala431Thr) | LDLR | - | 273 | 208 | 53 | 75 | 236 | 178 | 38 | 55 | N (Dieta) |
| | 11312 | c.1291G>A (p.Ala431Thr) | LDLR | - | 400 | | | | 269 | 190 | 40 | 152 | N |

^a Caracterização bioquímica antes de tratamento: valores indicados pelo médico responsável no anexo correspondente a cada indivíduo.^b Caracterização bioquímica no presente: efectuada no INSA às amostras recebidas para o estudo; necessário ter atenção coluna da medicação.^c Medicação (legenda): S – em medicação; N – sem medicação.

Δ – alteração não descrita;

Tabela XI.1 – caracterização da amostra: resultado da caracterização molecular, idade de diagnóstico e caracterização clínica dos principais parâmetros bioquímicos estudados (continuação).

| Família | ID | Mutação | Gene | Idade Diagnóstico | Caracterização Clínica | | | | | | | | Medicação ^c |
|---------|-------|---------------------------------------|------|-------------------|---------------------------------------|-------|-------|-----|-------------------------------|-------|-------|-----|--------------------------|
| | | | | | Antes tratamento (mg/dL) ^a | | | | Presente (mg/dL) ^b | | | | |
| | | | | | CT | LDL-C | HDL-C | TG | CT | LDL-C | HDL-C | TG | |
| F644 | 11311 | c.1291G>A (p.Ala431Thr) | LDLR | - | 273 | 208 | 53 | 75 | 236 | 178 | 38 | 55 | N (Dieta) |
| | 11312 | c.1291G>A (p.Ala431Thr) | LDLR | - | 400 | | | | 269 | 190 | 40 | 152 | N |
| F646 | 11316 | c.-135C>G | LDLR | 14 | 241 | 201 | 40 | 65 | 199 | 133 | 41 | 89 | S (Estatinas) |
| | 11317 | c.-135C>G | LDLR | 42 | | | | | 206 | 137 | 38 | 113 | S (Estatinas) |
| | 11318 | - | | 43 | | | | | 203 | 118 | 61 | 81 | N |
| F649 | 11326 | c.619_639del21 (p.Gly207_Ser213del) | LDLR | | 325 | 260 | 60 | 44 | 303 | 229 | 48 | 54 | N |
| | 11327 | c.619_639del21 (p.Gly207_Ser213del) | LDLR | 42 | 329 | | 74 | | 276 | 188 | 65 | 97 | S (Estatinas) |
| | 11328 | - | | | | | | | 224 | 145 | 52 | 100 | N |
| F660 | 11349 | c.1775G>A (p.Gly592Glu) | LDLR | 16 | 241 | 191 | 33 | 53 | 251 | 196 | 44 | 47 | N (Dieta) |
| | 11350 | c.1775G>A (p.Gly592Glu) | LDLR | 8 | | | | | 241 | 173 | 63 | 25 | N |
| | 11351 | c.1775G>A (p.Gly592Glu) | LDLR | 40 | 370 | | | | 181 | 135 | 35 | 63 | N |
| F662 | 12010 | Δex2_3del | LDLR | 47 | 352 | | | | 357 | 287 | 43 | 106 | S (Estatinas) |
| | 12011 | Δex2_3del | LDLR | 9 | 229 | 143 | 74 | 61 | 179 | 115 | 52 | 68 | N |
| F663 | 12013 | c.1291G>A (p.Ala410Thr) | LDLR | 38 | 352 | | | | 357 | 287 | 43 | 106 | S (Estatinas) |
| | 12014 | - | | 8 | 229 | 143 | 74 | 61 | 179 | 115 | 52 | 68 | N |
| F665 | 12021 | c.90C>T p.Asn30Asn* | LDLR | 11 | 248 | 174 | 76 | 52 | 228 | 141 | 70 | 48 | N (Dieta) |
| | 12022 | - | | 28 | | | | | 159 | 95 | 61 | 47 | N |
| F667 | 12026 | c.818-2A>G | LDLR | 14 | 243 | 195 | 37 | 59 | 167 | 119 | 32 | 35 | N |
| | 12027 | c.818-2A>G | LDLR | 49 | 392 | | | | 171 | 104 | 47 | 57 | S (Estatinas; Ezetimiba) |
| F670 | 12037 | c.1802 A>T (p.Asp601Val) ^Δ | LDLR | 16 | 331 | | | | 323 | 232 | 62 | 112 | N |
| | 12038 | - | | 42 | | | | | 205 | 117 | 44 | 259 | N |
| | 12039 | c.1802 A>T (p.Asp601Val) | LDLR | 42 | | | | | 282 | 205 | 53 | 129 | S (Estatinas; Ezetimiba) |
| F678 | 12058 | c.1775G>A (p.Gly591Glu) | LDLR | 49 | 450 | | | | 202 | 139 | 41 | 118 | S (Estatinas; Ezetimiba) |
| | 12070 | c.1775G>A (p.Gly591Glu) | LDLR | 12 | 385 | 254 | 66 | 327 | 232 | 168 | 46 | 116 | N |
| | 12071 | - | | 10 | 298 | 202 | 58 | 192 | 224 | 165 | 53 | 74 | N |

^a Caracterização bioquímica antes de tratamento: valores indicados pelo médico responsável no anexo correspondente a cada indivíduo.^b Caracterização bioquímica no presente: efectuada no INSA às amostras recebidas para o estudo; necessário ter atenção coluna da medicação.^c Medicação (legenda): S – em medicação; N – sem medicação.

* - polimorfismo; Δ – alteração não descrita

ANEXO XII – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA AMOSTRA DE INDIVÍDUOS ESTUDADOS POR TIPO DE MUTAÇÃO.

Tabela XII.1 – caracterização bioquímica do grupo pediátrico por tipo de mutação.

| Grupo pediátrico | | | | | | | | | |
|------------------------------|-------------------------|----|--------------------------------------|----|----------------------------|---|--------------------|---|-------|
| Parâmetro Bioquímico (mg/dL) | Mutação <i>Missense</i> | n | Mutação <i>Nonsense</i> ^a | n | Mutação de <i>Splicing</i> | n | Mutações gene APOB | n | p* |
| CT | 288,74±54,434 | 23 | 292,85±43,508 | 13 | 278,40±50,476 | 5 | 221,00 | 1 | 0,572 |
| c-LDL | 214,30±50,840 | 23 | 223,17±56,444 | 12 | 218,00±44,855 | 5 | 161,00 | 1 | 0,715 |
| c-HDL | 53,32±20,136 | 22 | 50,82±10,216 | 11 | 42,40±7,092 | 4 | 45,00 | 1 | 0,602 |
| Triglicéridos | 104,91±68,604 | 22 | 123,20±111,078 | 10 | 86,00±25,846 | 5 | 76,00 | 1 | 0,816 |
| ApoB | 120,09±30,502 | 23 | 124,35±26,209 | 13 | 111,20±31,729 | 5 | 126,00 | 1 | 0,859 |
| ApoA-I | 133,69±17,986 | 23 | 130,85±22,199 | 13 | 132,60±27,700 | 5 | 125,00 | 1 | 0,967 |
| Lp(a) | 52,56±54,612 | 23 | 26,32±21,211 | 13 | 51,44±49,618 | 5 | 65,00 | 1 | 0,399 |
| ApoA-II | 23,35±8,086 | 17 | 26,06±4,025 | 8 | 25,83±6,753 | 3 | 16,80 | 1 | 0,569 |
| ApoC-II | 3,16±1,960 | 16 | 4,36±1,570 | 8 | 3,637±1,714 | 3 | 1,260 | 1 | 0,292 |
| ApoC-III | 6,60±2,415 | 16 | 8,09±1,745 | 8 | 7,19±3,856 | 3 | 3,97 | 1 | 0,318 |
| sdLDL | 37,87±13,983 | 17 | 47,15±16,522 | 8 | 34,48±13,861 | 3 | 16,24 | 1 | 0,185 |
| ApoE | 3,17±0,819 | 15 | 4,09±1,401 | 8 | 3,36±0,923 | 3 | 2,92 | 1 | 0,250 |
| Idade | 10,50±4,172 | 22 | 10,00±4,862 | 12 | 12,40±2,074 | 5 | 14,00 | 1 | 0,620 |

*Análise estatística: teste estatístico One-way Anova; estatisticamente significativo: p<0,05

^a O grupo de mutações *nonsense* inclui: mutações que originam um codão STOP prematuro, grandes rearranjos do gene LDLR e mutações que originam alterações na grelha de leitura (mutações frameshift).

Tabela XII.2 – caracterização bioquímica do grupo dos adultos por tipo de mutação

| Grupo dos adultos | | | | | | | | | |
|------------------------------|-------------------------|----|--------------------------------------|----|----------------------------|---|--------------------|---|--------------|
| Parâmetro Bioquímico (mg/dL) | Mutação <i>Missense</i> | n | Mutação <i>Nonsense</i> ^a | n | Mutação de <i>Splicing</i> | n | Mutações gene APOB | n | p* |
| CT | 316,59±86,046 | 34 | 356,41±94,351 | 17 | 323,50±89,874 | 2 | 381,00±65,105 | 4 | 0,671 |
| c-LDL | 217,32±85,378 | 22 | 286,55±90,777 | 11 | 188,00 | 1 | 283,25±41,072 | 4 | 0,117 |
| c-HDL | 51,65±10,267 | 23 | 46,33±15,956 | 12 | 41,00 | 1 | 72,00±18,601 | 4 | 0,013 |
| Triglicéridos | 120,78±53,436 | 23 | 130,36±101,794 | 11 | 126,00 | 1 | 91,00±33,407 | 4 | 0,814 |
| ApoB | 128,15±35,816 | 46 | 147,95±56,697 | 20 | 113,25±23,505 | 8 | 154,50±26,715 | 4 | 0,110 |
| ApoA-I | 148,44±34,066 | 46 | 134,70±36,525 | 20 | 141,25±29,451 | 8 | 169,25±40,302 | 4 | 0,261 |
| Lp(a) | 52,53±46,971 | 46 | 42,81±32,888 | 20 | 59,95±51,771 | 8 | 110,75±104,012 | 4 | 0,087 |
| ApoA-II | 27,89±5,927 | 33 | 28,46±5,884 | 16 | 28,46±4,980 | 7 | 23,80±2,404 | 2 | 0,748 |
| ApoC-II | 4,52±2,018 | 31 | 4,66±2,662 | 16 | 2,51±1,871 | 7 | 6,77±3,111 | 2 | 0,068 |
| ApoC-III | 10,07±3,482 | 31 | 9,39±3,864 | 16 | 8,12±2,961 | 7 | 7,97±2,864 | 2 | 0,529 |
| sdLDL | 49,77±21,601 | 33 | 61,24±38,044 | 15 | 34,41±12,358 | 7 | 44,91±22,267 | 2 | 0,141 |
| ApoE | 3,47±1,507 | 33 | 3,55±1,371 | 16 | 2,77±0,880 | 7 | 2,635±0,884 | 2 | 0,293 |
| Idade | 43,41±15,376 | 44 | 43,71±13,554 | 21 | 46,50±16,501 | 8 | 42,50±18,083 | 4 | 0,523 |

*Análise estatística: teste estatístico One-way Anova; estatisticamente significativo: p<0,05

^a O grupo de mutações *nonsense* inclui: mutações que originam um codão STOP prematuro, grandes rearranjos do gene LDLR e mutações que originam alterações na grelha de leitura (mutações frameshift).

Tabela XII.3 – caracterização bioquímica do grupo pediátrico comparando os tipos de mutação *Missense* e *Nonsense*.

| Grupo pediátrico | | | | | |
|------------------------------|-------------------------|----|--------------------------------------|----|-------|
| Parâmetro Bioquímico (mg/dL) | Mutação <i>Missense</i> | n | Mutação <i>Nonsense</i> ^a | n | p * |
| CT | 288,74±54,434 | 23 | 292,85±43,508 | 13 | 0,817 |
| c-LDL | 214,30±50,840 | 23 | 223,17±56,444 | 12 | 0,640 |
| c-HDL | 53,32±20,136 | 22 | 50,82±10,216 | 11 | 0,702 |
| Triglicéridos | 104,91±68,604 | 22 | 123,20±111,078 | 10 | 0,571 |
| ApoB | 120,09±30,502 | 23 | 124,35±26,209 | 13 | 0,678 |
| ApoA-I | 133,69±17,986 | 23 | 130,85±22,199 | 13 | 0,673 |
| Lp(a) | 52,56±54,612 | 23 | 26,32±21,211 | 13 | 0,107 |
| ApoA-II | 23,35±8,086 | 17 | 26,06±4,025 | 8 | 0,380 |
| ApoC-II | 3,16±1,960 | 16 | 4,36±1,570 | 8 | 0,138 |
| ApoC-III | 6,60±2,415 | 16 | 8,09±1,745 | 8 | 0,135 |
| sdLDL | 37,87±13,983 | 17 | 47,15±16,522 | 8 | 0,157 |
| ApoE | 3,17±0,819 | 15 | 4,09±1,401 | 8 | 0,059 |
| Idade | 10,50±4,172 | 22 | 10,00±4,862 | 12 | 0,755 |

*Análise estatística: teste estatístico paramétrico (T-test); estatisticamente significativo: p<0,05

^a O grupo de mutações *nonsense* inclui: mutações que originam um codão STOP prematuro, grandes rearranjos do gene LDLR e mutações que originam alterações na grelha de leitura (mutações frameshift).

Tabela XII.4 – caracterização bioquímica do grupo dos adultos comparando os tipos de mutação *Missense* e *Nonsense*.

| Grupo dos adultos | | | | | |
|------------------------------|-------------------------|----|--------------------------------------|----|--------------|
| Parâmetro Bioquímico (mg/dL) | Mutação <i>Missense</i> | n | Mutação <i>Nonsense</i> ^a | n | p * |
| CT | 316,59±86,046 | 34 | 356,41±94,351 | 17 | 0,138 |
| c-LDL | 217,32±85,378 | 22 | 286,55±90,777 | 11 | 0,039 |
| c-HDL | 51,65±10,267 | 23 | 46,33±15,956 | 12 | 0,239 |
| Triglicéridos | 120,78±53,436 | 23 | 130,36±101,794 | 11 | 0,719 |
| ApoB | 128,15±35,816 | 46 | 147,95±56,697 | 20 | 0,157 |
| ApoA-I | 148,44±34,066 | 46 | 134,70±36,525 | 20 | 0,091 |
| Lp(a) | 52,53±46,971 | 46 | 42,81±32,888 | 20 | 0,402 |
| ApoA-II | 27,89±5,927 | 33 | 28,46±5,884 | 16 | 0,734 |
| ApoC-II | 4,52±2,018 | 31 | 4,66±2,662 | 16 | 0,834 |
| ApoC-III | 10,07±3,482 | 31 | 9,39±3,864 | 16 | 0,548 |
| sdLDL | 49,77±21,601 | 33 | 61,24±38,044 | 15 | 0,100 |
| ApoE | 3,47±1,507 | 33 | 3,55±1,371 | 16 | 0,859 |
| Idade | 43,41±15,376 | 44 | 43,71±13,554 | 21 | 0,938 |

*Análise estatística: teste estatístico paramétrico (T-test); estatisticamente significativo: p<0,05

^a O grupo de mutações *nonsense* inclui: mutações que originam um codão STOP prematuro, grandes rearranjos do gene LDLR e mutações que originam alterações na grelha de leitura (mutações frameshift).