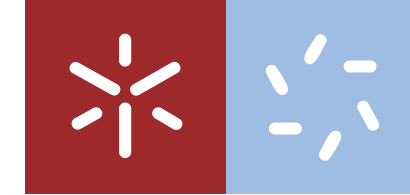




Caracterização Bioquímica e Molecular da Hipercolesterolemia Familiar na Região Norte e Centro de Portugal

Ana Isabel da Costa Freitas

Universidade do Minho
Escola de Ciências





Universidade do Minho
Escola de Ciências

Ana Isabel da Costa Freitas

Caracterização Bioquímica e Molecular
da Hipercolesterolemia Familiar na
Região Norte e Centro de Portugal

Tese de Mestrado
Genética Molecular

Trabalho efectuado sob a orientação da
Doutora Mafalda Bourbon

Co-Orientadora:
Professora Doutora Maria João Sousa

Agradecimentos

Quero em primeiro lugar, expressar a minha gratidão à Doutora Mafalda Bourbon por ter-me aceite e acolhido no seu grupo de trabalho. Agradeço ainda à Doutora Maria João Sousa pela co-orientação e envolvimento neste projecto.

A todas as minhas colegas de grupo (GIC) sem excepção, por me auxiliarem na integração no novo grupo de trabalho/laboratório. À Catarina Alves e Ana Medeiros pelas produtivas opiniões durante a escrita desta tese mas em particular, à Vânia Francisco por estar sempre presente e à Alexandra Gomes pelos bons momentos de companhia, principalmente à hora do almoço. Aos restantes colegas do departamento agradeço pelo companheirismo e pelas variadas discussões científicas.

Aos meus amigos, que apesar da distância estiveram sempre presentes, apoiando-me e não deixando que desanimasse mesmo nos momentos mais problemáticos e de maior desalento. Ao Luís pelo seu apoio, compreensão e tolerância ao longo destes anos...

Porque os últimos serão sempre os primeiros, um agradecimento sincero aos meus Pais e Irmão, pois foram eles que proporcionaram a oportunidade de eu ir mais longe. A eles agradeço também, o apoio nesta nova etapa da minha vida e principalmente por confiarem em mim e nas minhas decisões.

Resumo

A Hipercolesterolemia Familiar (FH) é uma patologia de origem genética, autossômica dominante e ainda que seja uma das patologias genéticas mais comuns na Europa é frequentemente sub-diagnosticada. O fenótipo da FH é caracterizado essencialmente, pelo aumento dos níveis de colesterol total (CT) e dos níveis de colesterol das lipoproteínas de baixa densidade no plasma (c-LDL) assim como pelo desenvolvimento da doença coronária prematura e aterosclerose. Esta patologia é mais frequentemente causada por mutações no gene do receptor das lipoproteínas de baixa densidade (*LDLR*) todavia, mutações no gene da Apolipoproteína B (*APOB*) e no gene Pró-proteína Convertase Subtilisina/Kexina tipo 9 (*PCSK9*) estão igualmente descritas como causa de FH.

A caracterização bioquímica e molecular da FH em indivíduos da região norte e centro de Portugal foi a finalidade deste trabalho. O estudo molecular baseou-se na análise do gene *LDLR* e *APOB* através da amplificação por PCR e sequenciação directa.

Foram referenciados ao Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar (EPHF), 34 indivíduos naturais da região norte ou centro do País, todavia 7 (20,6%) não apresentavam critérios de diagnóstico clínico de FH. Dos 27 casos-índice estudados, 17 (63%) são crianças (≤ 16 anos). Os valores de CT e c-LDL apresentados pelo grupo pediátrico foram de $249,4 \pm 25,6$ mg/dL e $173,8 \pm 28,0$ mg/dL, respectivamente. Na população adulta estes valores foram de $308,0 \pm 21,9$ mg/dL e $218,5 \pm 15,6$ mg/dL. A causa genética de hipercolesterolemia foi determinada em 29,6% dos indivíduos, tendo sido identificadas 7 alterações no gene *LDLR* e apenas 1 no gene *APOB*. Das alterações encontradas, 3 ainda não se encontram descritas.

Este trabalho evidência a importância do diagnóstico precoce e da utilidade deste na prevenção cardiovascular, viabilizando a introdução de medidas terapêuticas mais precoces e/ou agressivas tanto nos casos-índice como nos familiares identificadas geneticamente com FH.

Palavras-chave: Doenças Cardiovasculares, Hipercolesterolemia Familiar, Lipoproteínas, Colesterol, Lipoproteínas de baixa densidade, Receptor das LDL, Mutações Genéticas e Diagnóstico Precoce.

Title: “Biochemistry and Molecular Characterization of Familial Hypercholesterolemia in the North and Central region of Portugal.”

Abstract

Familial Hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant genetic disorder and one of the most common genetic disorders in Europe and often under-diagnosed. The FH phenotype is characterized mainly by increased levels of total cholesterol (TC) and cholesterol in low-density lipoproteins (c-LDL) as well as the development of premature coronary heart disease and atherosclerosis. This condition is often caused by mutations in the Low-Density Lipoproteins Receptor (*LDLR*) gene however mutations in the Apolipoprotein B (*ApoB*) gene and Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (*PCSK9*) gene are also described as disease causing.

The biochemical and molecular characterization of FH in patients from northern and central regions of Portugal was the purpose of this work. The study was based on molecular analysis of the *LDLR* gene and *APOB* gene by PCR amplification and direct sequencing.

Were referred to the Portuguese Familial Hypercholesterolemia Study (EPHF), 34 individuals born in north or central region of Portugal, however 7 (20.6%) had no criteria for clinical diagnosis of FH. 17 (63%) of 27 index cases studied, were children (≤ 16 years). The values of TC and c-LDL in the pediatric group were 249.4 ± 25.6 mg /dL and 173.8 ± 28.0 mg /dL, respectively. In the adult population these values were 308.0 ± 21.9 mg /dL and 218.5 ± 15.6 mg /dL. The genetic cause of hypercholesterolemia was determined in 29.6% of individuals. 7 genetic alterations were identified in the *LDLR* gene and only 1 in the *APOB* gene. Of the founded mutations, 3 are not yet described.

This study highlights the importance of early diagnosis and cardiovascular prevention, enabling the introduction of therapeutic measures earlier and/or aggressive in both index cases and relatives, identified genetically with FH.

Keywords: Cardiovascular Diseases, Familial Hypercholesterolemia, Lipoproteins, Cholesterol, Low-Density Lipoprotein, LDL Receptor, Genetic Mutations and Early Diagnosis

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract	v
Lista de Tabelas	viii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Abreviaturas.....	x
1. Introdução ao Tema	2
1.1 Doença Cardiovascular, Aterosclerose e Factores de Risco	2
1.2 Metabolismo lipoproteico	5
1.2.1 Lípidos e Colesterol	5
1.2.2 Lipoproteínas e Apolipoproteínas	5
1.3 Hipercolesterolemia Familiar.....	13
1.3.1 Perspectiva Geral sobre as Dislipidemias	13
1.3.2 Caracterização Clínica da FH.....	15
1.3.3 Caracterização Molecular e Causas Genéticas da FH.....	17
1.3.4 Terapêuticas Aplicadas	21
2. Objectivos.....	25
3. Material e Métodos.....	26
3.1 Recrutamento de Indivíduos	26
3.2 Determinação dos Parâmetros Bioquímicos	27
3.3 Extracção de DNA Genómico.....	27
3.4 Estudo Molecular	28
3.4.1 Amplificação do DNA por PCR.....	28

3.4.2	Purificação e Sequenciação Automática dos Produtos de PCR	29
3.4.3	Análise de <i>Single Nucleotide Polimorfisms</i> (SNPs).....	30
3.4.4	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> (MLPA)	31
3.4.5	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP).....	32
3.5	Análise Estatística	32
4.	Apresentação dos Resultados e Discussão.....	33
4.1	Análise das Características Clínicas e Bioquímicas da População em Estudo	33
4.2	Diagnóstico Molecular da População em Estudo.....	36
4.3	Análise dos Genótipos da APOE	50
4.4	Diagnóstico Molecular Versus Caracterização Bioquímica	51
5.	Conclusão	54
6.	Bibliografia	57
	Anexos.....	58

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Características das Lipoproteínas Presentes no Plasma.....	6
Tabela 2 – Tabela Resumo das Hipercolesterolemia Monogénicas.	15
Tabela 3 – Quadro Resumo do Efeito da Farmacoterapia no Perfil Lipídico.....	22
Tabela 4 – Critérios de FH adaptados de “ <i>Simon Broome Heart Research Trust</i> ”.....	26
Tabela 5 – Distribuição dos Casos-índice pelos dois Grupos Estudados: Pediátrico e Adultos.	33
Tabela 6 – Apresentação das Características Clínicas dos Casos-Índice Estudados.....	34
Tabela 7 – Apresentação das Alterações Identificadas nos Casos-Índice Estudados.....	36
Tabela 8 – Distribuição dos genótipos da APOE em ambos os Grupos Estudados.	50
Tabela 9 – Comparação dos Parâmetros Bioquímicos nos Indivíduos do Grupo Pediátrico, Com e Sem Mutação.	52
Tabela 10 – Comparação dos Parâmetros Bioquímicos nos Indivíduos do Grupo de Adultos, Com e Sem Mutação.	53

Lista de Figuras

Figura 1 – Evolução da aterosclerose: processo de formação da placa aterosclerótica.	3
Figura 2 – Esquema representativo da estrutura da LDL.....	7
Figura 3 – Esquema representativo da via do receptor das LDL. Adaptado de Wasan <i>et al.</i> (2008) [22].....	11
Figura 4 – Esquema representativo do gene do receptor das LDL (<i>LDLR</i>).....	18
Figura 5 – Variantes da PCSK9 associadas com a concentração de colesterol LDL no plasma.....	21
Figura 6 – Apresentação do caso-índice 10100.	37
Figura 7 – Apresentação do caso-índice 10128.	39
Figura 8 – Apresentação do caso-índice 10106.	40
Figura 9 – Apresentação do caso-índice 29257.	41
Figura 10 – Separação electroforética dos fragmentos de DNA obtidos por digestão enzimática, num gel de agarose de 3%.....	43
Figura 11 – Apresentação do caso-índice 29292.	44
Figura 12 – Apresentação do caso-índice 29279.	46
Figura 13 – Apresentação do caso-índice 10083.	47
Figura 14 – Apresentação do caso-índice 10028.	49

Lista de Abreviaturas

aa – Aminoácido

ACAT – *Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

Apo – Apolipoproteína

ARH (*Autosomal Recessive Hypercholesterolemia*) – Hipercolesterolemia Autossômica Recessiva

c-LDL – Colesterol LDL

c-HDL – Colesterol HDL

CT – Colesterol Total

DCV – Doença Cardiovascular

EGF (*Epidermal Growth Factor*) – Factor de Crescimento da Epiderme

EPHF – Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

FCHL (*Familial Combined Hyperlipidemia*) – Hiperlipidemia Familiar Combinada

FDB (*Familial Defective apoB100*) – Deficiência Familiar em apolipoproteína B

FH (*Familial Hypercholesterolemia*) – Hipercolesterolemia Familiar

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade

HMG-CoA (*3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A*) – 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A redutase

HTG – Hipertrigliceridemia

IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*) – Lipoproteína de Densidade Intermédia

kDa – kilo Dalton

MLPA – *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

LCAT – Lecitina:Colesterol Aciltransferase

LDL (*Low Density Lipoprotein*) – Lipoproteína de Baixa Densidade

LDLR – Receptor das LDL

LDLRAP1 (*Low Density Lipoprotein Receptor Adaptor Protein 1*) – Adaptador Proteico 1 do Receptor das Lipoproteína de Baixa Densidade

Lp(a) – Lipoproteína (a)

LPL (*Lipoprotein Lipase*) – Lípase Lipoprotéica

mRNA – RNA mensageiro

OMS – Organização Mundial de Saúde

pb – Pares de Base

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) – Reacção em Cadeia da Enzima Polimerase

PCSK9 – *Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9*

p/v – Peso/Volume

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RNA – Ácido Ribonucleico

SNPs – *Single Nucleotide Polimorfisms*

TG – Triglicéridos

VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) – Lipoproteína de Muita Baixa Densidade

1. Introdução ao Tema

1.1 Doença Cardiovascular, Aterosclerose e Factores de Risco

Durante o século XX as doenças cardiovasculares (DCV) adquiriram uma maior importância representando nos dias de hoje, a principal causa de mortalidade e morbilidade no mundo. Estima-se que, só em 2004, estas doenças tenham provocado a morte a cerca de 17.1 milhões de pessoas, representando 29% do número total de óbitos no mundo, sendo já considerada uma pandemia [1].

A Organização Mundial de Saúde (OMS) prevê que em 2030, estas doenças provoquem cerca de 23.6 milhões de mortes, tornando-se a principal causa de mortalidade no mundo. É previsto ainda que seja na região oriental do Mediterrâneo e no sul da Ásia que o número de mortes por DCV mais cresça [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>].

Em Portugal e segundo estatísticas do Ministério da Saúde, as DCV são actualmente responsáveis por cerca de 40% dos óbitos representando a principal causa de morte e incapacidade na população [<http://www.minsaude.pt/portal/>]. Estes dados revelam a severidade destas doenças devendo ser usados para sensibilizar não só a população em geral mas também as entidades competentes, de modo a que seja possível intensificar a luta contra estas doenças e implementar medidas de prevenção eficazes. Tendo em conta esta realidade, em 2007 foram actualizadas as recomendações europeias para a prevenção das doenças cardiovasculares – SCORE (*Systematic Coronary Risk Evaluation*) as quais foram baseadas em 12 estudos longitudinais europeus, com o pressuposto de determinar quais as regiões europeias com maior ou menor risco de DCV [1].

As doenças cardiovasculares são descritas de modo geral, como um conjunto de doenças que afectam todo o aparelho cardiovascular – coração e vasos sanguíneos. A doença arterial coronária e a doença cerebrovascular são alguns dos exemplos de DCV, as quais são definidas como doenças multifactoriais resultantes da combinação de diversos factores de risco nomeadamente na associação com outras doenças como hipertensão arterial, diabetes *mellitus*, obesidade e dislipidemias (essencialmente hipercolesterolemia) [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>] [2].

A aterosclerose ou o processo aterosclerótico está na base dos acidentes vasculares cerebrais (AVC) e da doença arterial coronária (enfarte de miocárdio e angina) – duas das mais graves formas de DCV, resultando da combinação de processos como a inflamação (stress oxidativo, por exemplo) e o metabolismo lipídico [2].

A placa aterosclerótica (Figura 1) consiste no depósito de colesterol, resíduos celulares, células musculares lisas e outras substâncias no endotélio de artérias de médio e grande porte. À medida que a placa aumenta, produz espessamentos no interior das artérias levando ao estreitamento destas e consequentemente à obstrução do livre fluxo da corrente sanguínea. Todavia, os danos mais graves ocorrem quando as artérias se tornam frágeis e rompem. Ao romperem são libertados coágulos de sangue (trombo) que se dispersam por todo o corpo através da corrente sanguínea, podendo bloquear qualquer outro vaso sanguíneo (embolia). Estes coágulos ao bloquearem um vaso sanguíneo que irriga o coração ou o cérebro provocam respectivamente, um ataque cardíaco ou um AVC [2].

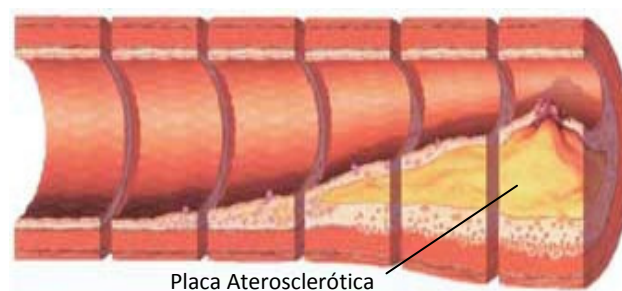


Figura 1 – Evolução da aterosclerose: processo de formação da placa aterosclerótica.
Adaptada de <http://www.abo.org.br/imagens/revista/87/Box-1-Aterosclerose.jpg>:

Mais especificamente, a formação da placa aterosclerótica acontece quando níveis elevados de colesterol e de triglicéridos no sangue, elevada pressão arterial e o fumo do tabaco provocam a lesão no endotélio – camada mais interna da artéria. A lesão por oxidação activa o sistema imunitário nomeadamente a mobilização de monócitos que depois se diferenciam em macrófagos. Estes ao fagocitarem as LDL oxidadas acabam por ficar imobilizados na parede da artéria transformando-se em “células esponjosas” (*foam cells*). Posteriormente ocorre o depósito de fibrinogénio, plaquetas e cálcio que irá provocar o aumento da placa (ateroma) e consequentemente o estreitamento da artéria [2].

A aterosclerose é uma doença que se desenvolve de forma lenta, silenciosa e progressiva podendo iniciar-se ainda durante a infância. Contudo e regra geral, não causa qualquer sintomatologia até por volta dos 50-70 anos de idade embora possa atingir jovens adultos entre os 30-40 anos. A idade e a história familiar encontram-se entre as condições que aumentam o risco de um indivíduo vir a desenvolver DCV. Contudo, existe um outro conjunto de factores de risco individuais nomeadamente ligados a estilo vida inadequado (por exemplo: tabagismo, sedentarismo, *stress* excessivo, maus hábitos alimentares e obesidade) sobre os quais podemos influir e modificar prevenindo as DCV [<http://www.minsaude.pt/portal/>].

De facto, a maior parte das DCV resulta destes factores de risco modificáveis e o controlo destes factores revela ser uma arma eficaz na redução das complicações fatais e não fatais, das doenças cardiovasculares. De entre todos os factores de risco, um dos mais marcantes encontra-se relacionado com o metabolismo das lipoproteínas e as possíveis alterações ocorridas neste.

O estudo das interacções entre os factores ambientais nomeadamente a dieta, e os factores genéticos nas DCV – Nutrigenómica, é uma área emergente que visa auxiliar na previsão do risco cardiovascular de um determinado indivíduo. Esta previsão irá ajudar na prevenção destas doenças assim como possibilitar tratamento mais adequado, melhorando a qualidade de vida do doente [3].

Segundo as últimas estimativas da OMS, prevê-se que cerca de 250 milhões de pessoas em todo o mundo encontram-se em risco de morrer prematuramente. Este risco aumenta em indivíduos portadores de alterações em um ou mais genes, reguladores do metabolismo lipoproteico [4]. Neste sentido, o entendimento do metabolismo lipoproteico e das vias metabólicas associadas, é essencial para o estudo das hiperlipidemias assim como para o entendimento da relação destas com as doenças cardiovasculares uma vez que a relação entre as hiperlipidemias e as várias manifestações clínicas da doença aterosclerótica está demonstrada.

1.2 Metabolismo Lipoproteíco

1.2.1 Lípidos e Colesterol

Os lípidos desempenham funções biológicas de extrema importância nos organismos vivos quer ao nível funcional e estrutural (membranas celulares) quer a nível biológico (precursor de hormonas). Funcionam igualmente como reserva energética [5]. Constituem um grupo bastante heterogéneo e são caracterizados por possuírem na sua estrutura molecular, ácidos gordos com pelo menos 8 átomos de carbono. São estas cadeias de hidrocarbonetos que conferem aos lípidos a sua característica mais saliente – reduzida ou nula solubilidade em água.

Nos indivíduos sem alterações genéticas no metabolismo lipoproteíco, o colesterol é obtido por meio de síntese celular (colesterol endógeno ~70%) e através da dieta (colesterol exógeno ~ 30%). A síntese celular ocorre no fígado enquanto o colesterol proveniente da dieta é absorvido pelo intestino, transportado para o fígado onde é metabolizado e daí para os tecidos adjacentes onde é usado para o normal funcionamento das células. Quando em excesso é armazenado nos tecidos adiposos.

No que respeita às propriedades físico-químicas, trata-se de uma molécula rígida (álcool sólido), de elevado peso molecular e hidrofóbica que confere integridade estrutural à membrana plasmática dos eucariotas. É ainda um precursor de hormonas esteróides (progesterona, testosterona, estradiol e cortisol), ácidos biliares e vitamina D.

O colesterol e os seus ésteres, os triglicéridos (TG) – uma das formas de armazenamento energético mais importante do organismo, e os fosfolípidos (estrutura básica das membranas celulares) são os principais lípidos presentes no organismo humano. Sendo estas moléculas insolúveis em água e consequentemente insolúveis no sangue, necessitam de ser transportadas sob a forma de complexos lipoproteícos – lipoproteínas [5].

1.2.2 Lipoproteínas e Apolipoproteínas

Estruturalmente, as lipoproteínas caracterizam-se por serem complexos esféricos em que o seu interior é constituído por lípidos apolares (TG e ésteres de colesterol) e à superfície apresentam uma monocamada de lípidos polares (maioritariamente

fosfolípidos), algum colesterol livre e apolipoproteínas [5]. Tendo em conta a variação em tamanho, a densidade e a concentração dos diversos componentes lipídicos e proteicos, é possível organizar as lipoproteínas em seis classes centrais (Tabela 1).

As quilomicras e as lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) encontram-se proporcionalmente associadas aos valores de TG enquanto as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), aos valores de colesterol. A LDL é a lipoproteína mais abundante no sangue e possui uma única molécula de apoB100. Assim como a LDL, a lipoproteína (a) (Lp(a)) também possui uma única molécula de apoB100 e composição lipídica semelhante encontrando-se estruturalmente relacionada com a LDL [5].

A Lp(a) é sintetizada no fígado, por uma via metabólica distinta da síntese de VLDL sendo a sua concentração no plasma totalmente independente dos factores moldáveis como o exercício físico ou dieta. Neste sentido, o elevado nível de Lp(a) no plasma é tido como factor de risco genético para as doenças coronárias [6]. Tem como função a hidrólise dos TG presentes nas quilomicras e nas VLDL porém muitos dos aspectos intrínsecos do seu metabolismo são ainda desconhecidos.

Tabela 1 – Características das Lipoproteínas Presentes no Plasma.

Variável	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
Peso 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	9:1	90:10	85:15	80:20	50:50	75:25 ou 64:36
Principais lípidos transportados	Triglicéridos exógenos	Triglicéridos endógenos	Triglicéridos endógenos e ésteres de colesterol	Ésteres de colesterol	Fosfolípidos	Ésteres de colesterol e fosfolípidos
Principais apolipoproteínas	A1 B-48 C1 C2 C3	B100 C1 C2 C3 E	B100 E	B100	A1 A2	B100
Fontes	Intestino	Fígado	Catabolismo das VLDL e quilomicras	Catabolismo das VLDL	Catabolismo das VLDL e quilomicras; fígado e intestino	Fígado

Legenda: VLDL – lipoproteínas de muita baixa densidade; IDL – Lipoproteínas de densidade intermédia; LDL – Lipoproteínas de baixa densidade; HDL – Lipoproteínas de alta densidade; Lp(a) – Lipoproteína (a). Adaptado de Rifai *et al.* (1999) [5].

As apolipoproteínas (apo) são proteínas especificamente posicionadas na superfície das lipoproteínas, de tamanho variável (50 a 4500 aminoácidos) mas com a estrutura altamente conservada [7]. Até ao momento, várias apolipoproteínas foram isoladas e caracterizadas [8] e cada lipoproteína contém uma ou mais destas proteínas que têm como função principal proporcionar estabilidade estrutural. É de salientar que sem a(s) respectiva(s) apo(s), as lipoproteínas não são capazes de serem sintetizadas pelo fígado ou secretadas no intestino.

Para além do papel activo no metabolismo lipoproteico, as apolipoproteínas actuam igualmente como co-factores de enzimas e como ligandos em processos mediados por um receptor, sendo possível diferenciá-las de acordo com o seu peso molecular e função específica [9]. As apolipoproteínas podem ser integrais como por exemplo a apoB, ou periféricas (apoA, apoC e apoE) que de forma antagónica às integrais, são partilhadas entre as diferentes lipoproteínas plasmáticas.

Apolipoproteína A apresenta baixo peso molecular e duas isoformas (A1 e A2) sendo que a apoA1 é a principal proteína das lipoproteínas de alta densidade (HDL). A apoA1 é sintetizada no fígado e no intestino e age como co-factor para a lecitina colesterol:aciltransferase (LCAT, *lecithin-cholesterol acyltransferase*), responsável pela esterificação do colesterol livre nas partículas de HDL. Encontra-se envolvida no transporte reverso do colesterol uma vez que é um ligando da cassete *ATP-binding* (ABCA1, *ATP-binding cassette protein 1*) – transportador que promove o efluxo de colesterol livre e fosfolípidos das células [5].

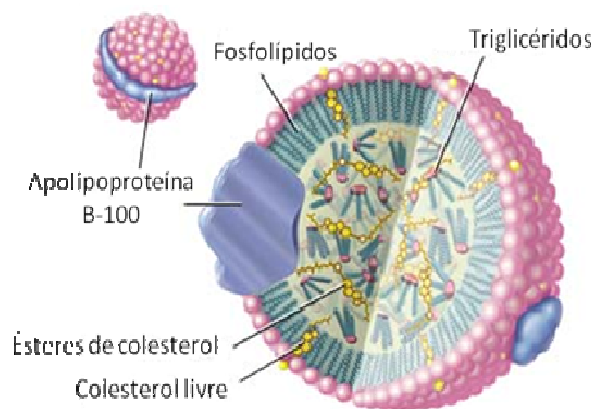


Figura 2 – Esquema representativo da estrutura da LDL.

Adaptado de <http://www.britannica.com/EBchecked/topic-art/114106/92254/Cutaway-view-of-a-low-density-lipoprotein-complex-The-LDL>.

A apolipoproteína B possui duas isoformas – apoB48 e a apoB100 (Figura 2), diferenciadas pelo peso molecular e tamanho, respectivamente 2180 e 4563 aminoácidos (aa). A apoB100 é sintetizada no fígado e encontra-se presente nas VLDL, lipoproteínas de densidade intermédia (IDL) e LDL, sendo essencial para a ligação das partículas de LDL aos receptores celulares, permitindo a entrada de LDL nas células, nomeadamente no hepatócitos. A apoB48 é sintetizada no intestino e encontra-se apenas nas quilomicras.

As 3 isoformas da apolipoproteína C (C1, C2 e C3) actuam na regulação do metabolismo dos TG e influenciam em relação inversa dos níveis de TG e HDL. Enquanto a apoC1 activa a LCAT, a apoC2 é responsável pela activação da lipoproteína lipase (LPL) promovendo assim, a captação celular dos triglicéridos, das quilomicras e das VLDL [5].

A apolipoproteína E apesar de pequena – 299 aa de tamanho e 34 kDa de peso molecular, é tida como uma proteína multifuncional. Desempenha uma importante função no metabolismo do colesterol uma vez que ligada ao receptor das LDL medeia a eliminação de algumas lipoproteínas circulantes no sangue, nomeadamente quilomicras e VLDL, determinando o destino metabólico destas [7, 10]. Encontra-se presente nas quilomicras, quilomicras remanescentes, VLDL, IDL e de forma minoritária nas HDL.

O gene *APOE* localizado no cromossoma 19q13.2 e apresenta três alelos distintos – $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$, os quais codificam isoformas de proteínas plasmáticas correspondentes – E2, E3 e E4. As três isoformas são originadas por dois polimorfismos na posição 112 e 158 da sequência proteica, os quais originam seis genótipos diferentes (E2/E2, E3/E3, E4/E4, E3/E2, E4/E2 e E4/E3). A isoforma E3 apresenta o aminoácido cisteína (Cys) na posição 112 e arginina (Arg) na posição 158. Contrariamente, a isoforma E2 possui o aminoácido cisteína em ambas as posições enquanto a isoforma E4, duas argininas em ambas as posições [11].

Apesar de os alelos apresentarem frequências variáveis entre as populações, os genótipos associados a isoforma E3 são os mais comuns, representando geralmente frequências superiores a 60% [7]. O alelo $\epsilon 2$ encontra-se relacionado com níveis plasmáticos de LDL mais baixos enquanto o alelo $\epsilon 4$ com níveis mais altos [12-14].

Um estudo realizado em 2007 por Bennet *et al* [15] demonstrou que indivíduos com o genótipo E2/E2 possuem níveis de colesterol LDL (c-LDL) inferiores em cerca de 30% quando comparados aos indivíduos com o genótipo E4/E4. A associação do genótipo E2/E2 com os níveis de c-HDL e TG não foi significativa todavia foi

observada uma redução em 20%, do risco de doença coronária. À parte destes dados, o mecanismo pelo qual a isoforma E2 possa conferir algum possível efeito cardioprotector, não se encontra completamente esclarecido [16].

Os vários polimorfismos existentes ao gene *APOE* encontram-se ainda associados a outras doenças como a diabetes *mellitus* [17] e Alzheimer [18].

1.2.3 Vias do Metabolismo Lipoproteico

Um dos mais importantes papéis fisiológicos das lipoproteínas está no transporte de TG e colesterol para obtenção de energia metabólica. Este transporte é feito através de duas vias mais ou menos semelhantes: a via exógena (compreende a absorção e o transporte das gorduras provenientes da dieta) e a via endógena (síntese de colesterol via hepatócitos).

O metabolismo das diferentes lipoproteínas é regulado e direccionado pela respectiva fracção proteica logo bastante mais complexo e por isso, frequentemente repartido em quatro vias principais a fim de melhorar a compreensão das mesmas. As duas vias acima mencionadas, fazem parte deste conjunto de quatro vias metabólicas das lipoproteínas sendo a terceira, a via do receptor das LDL (Figura 3) enquanto a quarta via encontra-se relacionada com a condução do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado – transporte reverso do colesterol.

a) Via exógena

O processamento das gorduras (TG e colesterol) provenientes da dieta é feito no lúmen intestinal, sendo posteriormente absorvidos e empacotados nas células epiteliais intestinais em grandes partículas – quilomicras nascentes, ricas em TG e pobres em colesterol. Estas partículas são por exocitose, transportadas para o espaço extracelular e daí para a corrente sistémica onde de imediato adquirem das HDL circulantes a apoE e as apoC1, apoC2 e apoC3.

A apoC2 presente na superfície das quilomicras vai activar a enzima LPL, a qual vai iniciar o processo de hidrólise dos TG em ácidos gordos livres. Estes ácidos gordos livres são depois captados pelas células musculares e por ligação à albumina plasmática, convertidos em energia ou armazenados nos tecidos periféricos (de novo, sob a forma de TG) ou ainda reutilizados pelo fígado para a síntese de novas lipoproteínas. Durante

a hidrólise, as quilomicras nascentes vão gradualmente perdendo a afinidade com as apoC, resultando deste processo as quilomicras remanescentes mais pobres em triglicéridos mas mais ricas em colesterol [19].

Essencialmente por interacção com a apoB48, estas quilomicras remanescentes (estruturalmente mais pequenas e possuindo à superfície a apoE e apoB48) são por endocitose, retiradas da circulação sanguínea principalmente através de receptores localizados á superfícies dos hepatócitos sendo o seu conteúdo posteriormente, hidrolisados nos lisossomas [5].

Entretanto, o colesterol libertado vai sendo incorporado em lipoproteínas sintetizadas de novo ou armazenado em forma de ésteres de colesterol podendo ainda, ser utilizado na formação de ácidos biliares. Regula também, a actividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) – enzima limitante da biossíntese de colesterol [20].

b) Via endógena

Num processo semelhante ao descrito para as quilomicras, os TG presentes nas VLDL entram na circulação sanguínea onde são hidrolisados pela LPL passando a designarem-se de VLDL nascentes. À superfície as VLDL nascentes têm apoB100, apoE e várias formas de apoC (nomeadamente apoC2), todas elas importantes para a modulação do seu metabolismo.

Durante o processo de hidrólise, a apoC2 é novamente transferida para a HDL e as VLDL nascentes são progressivamente convertidas em partículas cada vez mais pequenas e mais ricas em colesterol – VLDL remanescentes, enquanto as restantes são convertidas em partículas mais densas e pequenas denominadas de IDL. Tanto as VLDL remanescentes como as IDL são retiradas de circulação através do receptor hepático das LDL – que possui grande afinidade para partículas com a apoE. As que não são capadas pelo receptor são novamente lipolisadas pela LPL e convertidas em LDL [5, 20].

c) Via do receptor das LDL

O receptor das LDL (LDLR) é uma glicoproteína de superfície ao qual se ligam 2 ligandos – a apoB100 e a apoE, sendo através deste receptor que as LDL são removidas da corrente sanguínea. Este receptor possui maior afinidade para a apoE do que para a apoB, sendo esta a razão pela qual as LDL permanecem mais tempo no plasma comparativamente com outras lipoproteínas [5].

Quando a partícula de LDL se liga ao receptor, esta é incorporada em vesículas de clatrina por invaginação da membrana celular. Durante a internalização há a dissociação da membrana da clatrina e a formação de endossomas dentro da célula. Devido à diminuição do pH no endossoma a LDL dissocia-se do receptor. O receptor é então reciclado, retomando o seu normal funcionamento na superfície celular [5, 21]. Entretanto, a LDL migra para um lisossoma e a apoB100 é degradada em pequenos péptidos e aminoácidos. Os ésteres de colesterol presentes no interior da LDL são transformados em colesterol livre ficando este disponível para ser utilizado por exemplo, na síntese de membranas celulares.

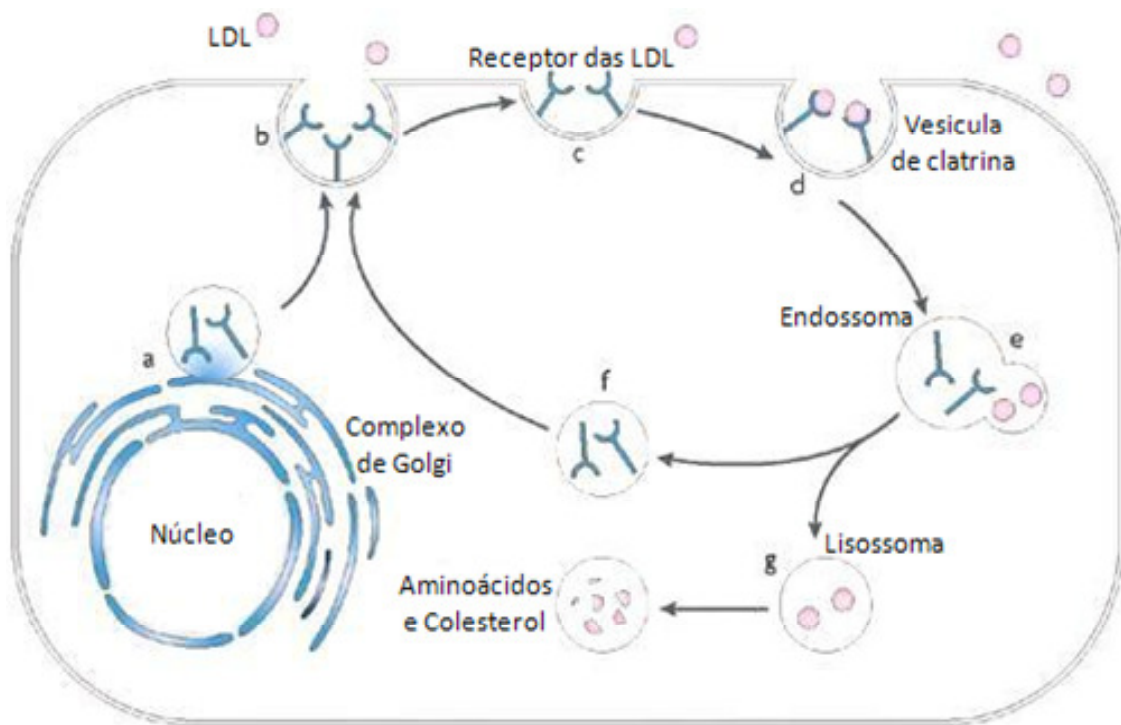


Figura 3 – Esquema representativo da via do receptor das LDL. Adaptado de Wasan *et al.* (2008) [22].

a | Nascentes LDLRs são sintetizadas e empacotadas em vesículas no complexo de Golgi. **b** | As vesículas são transportadas para a membrana plasmática, fundindo-se com esta. **c** | Os receptores na membrana plasmática agora funcionais, são agrupados dentro de vesículas revestidas por clatrina. **d** | Ocorre a ligação das partículas de LDL ao receptor através de interações entre o domínio do ligando e a apoB100 presente na partícula de LDL. **e** | Por endocitose a vesícula de clatrina internaliza o complexo LDLR. A fusão com lisossomas faz diminuir o pH desta, causando a dissociação da partícula de LDL do receptor. **f** | Receptores intactos são transportados de volta para a membrana plasmática para reutilização. **g** | Os ésteres de colesterol são hidrolisados em colesterol e a apoB-100 em pequenos péptidos e aminoácidos.

Existe uma outra parte de LDL que não é removida pelos receptores de LDL sendo todavia, captada para os tecidos extra hepáticos por um processo de *scavenger*

consumado pelos macrófagos. Os macrófagos reconhecem as LDL oxidadas, retiram-nas da circulação sanguínea e transformam-nas em *foam cells* – considerada a causa primária da aterosclerose.

O balanço de colesterol no organismo – que compreende a sua síntese e absorção, a sua utilização como substrato biológico e a sua excreção biliar, é mantido e regulado pela própria célula. Assim, quando aumenta a absorção de colesterol proveniente da dieta há inibição da síntese de colesterol no fígado por inibição da enzima HMG-CoA redutase [19]. Pode-se então afirmar que, o metabolismo do colesterol ocorre segundo um mecanismo compensatório.

d) Via do transporte reverso de colesterol

Esta via, em que o principal interveniente é o HDL, permite que o colesterol não metabolizado por uma das anteriores vias passe para o fígado a fim de ser excretado como ácidos biliares presentes na bÍlis.

As HDL são um conjunto heterogéneo de lipoproteínas constituídas essencialmente pela apoA1 e fosfolípidos, que podem ser segregadas pelo fígado ou sintetizadas directamente pelo intestino (sempre sob a forma de HDL nascentes). Possuem um papel extremamente valioso na captação de “restos” redundantes do catabolismo das lipoproteínas ricas em triglicéridos (quilomicras e VLDL). Na presença da apoA1, o colesterol livre – transferido para a HDL, é esterificado pela LCAT. É de referir que o tamanho da partícula de HDL é proporcional à quantidade de ésteres de colesterol acumulados e à actividade da LCAT ou seja, a acção da enzima LCAT permite a acumulação de ésteres de colesterol e o consequente aumento de tamanho.

A transferência dos ésteres de colesterol para o fígado dá-se particularmente por um dos três possíveis mecanismos: (1) os ésteres de colesterol são retirados da HDL através de receptores hepáticos, regressando a partícula de HDL à circulação, (2) através da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CEPT) os ésteres de colesterol são captados por lipoproteínas contendo apoB100 e posteriormente removidos via receptores das LDL ou (3) por receptores hepáticos remanescentes através do reconhecimento e ligação à apoE presente nas HDL [5]

Os níveis de HDL são inversamente correlacionados com a incidência de doença cardiovascular, porém defeitos genéticos no metabolismo da HDL ou intervenções terapêuticas que alteram o metabolismo da HDL podem levar ao desenvolvimento de aterosclerose. Assim, ao reduzir a acumulação de colesterol na parede das artérias, via o

transporte reverso de colesterol pode impedir desenvolvimento da aterosclerose. A suplementação com HDL ou apoA1 pode reverter este processo aterosclerótico, acelerando o efluxo do colesterol [23].

1.3 Hipercolesterolemia Familiar

1.3.1 Perspectiva Geral sobre as Dislipidemias

As dislipidemias encontram-se relacionadas com distúrbios decorrentes em qualquer fase do metabolismo lipoproteico provocando alterações nos níveis plasmáticos das lipoproteínas. Este grupo de doenças constitui, um importante problema de saúde pública, uma vez que se prevê que cerca de 5% da população mundial apresente uma qualquer alteração metabólica [24].

Tradicionalmente, as dislipidemias são fragmentadas em apenas dois grandes grupos: as dislipidemias primárias – apresentam uma origem genética, e as secundárias – de cariz não genético (ambiental), em que vários estados clínicos podem evoluir para hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia ou ambas.

As designadas de secundárias encontram-se normalmente associadas a diabetes *mellitus*, o hipotireoidismo e doenças do foro renal e hepático no entanto, factores como a obesidade, menopausa, dieta rica em ácidos gordos, sedentarismo, tabagismo e alcoolismo encontram-se também associados. O tratamento das dislipidemias secundárias consiste em controlar primeiramente a doença de base e em casos singulares, recorrer ao tratamento farmacológico com hipolipimantes.

As dislipidemias primárias são frequentemente agrupadas em hipo e hiperlipidemias, sendo estas últimas mais preocupantes do ponto de vista clínico. Contudo e apesar de ser referenciada a hipolipidemia, a Sociedade Europeia de Aterosclerose [25] seguida pela congénere Portuguesa e baseada nos estudos efectuados por Goldstein *et al.* (1973), considera apenas três fenótipos de dislipidemias: Hipercolesterolemia, Hipertrigliceridemia (HTG) e Hiperlipidemia familiar combinada (FCHL – *Familial Combined Hyperlipidemia*) [26].

Tal como a maioria das dislipidemias, também a hipercolesterolemia pode ser de origem monogénica ou poligénica – a qual corresponde em média, a 85% das

hipercolesterolemias [27]. A hipercolesterolemia de origem monogénica é uma patologia autossómica que pode apresentar uma transmissão dominante ou recessiva.

Dentro da transmissão autossómica dominante podemos diferenciar a Hipercolesterolemia familiar (FH – *Familial Hypercholesterolemia*), a Deficiência Familiar em apolipoproteína B (FDB – *Familial Defective apolipoprotein B*) e ainda a Hipercolesterolemia Autossómica Dominante 3 (FH3). Em relação à transmissão autossómica recessiva existe apenas um tipo designado de Hipercolesterolemia Autossómica Recessiva (ARH – *Autosomal Recessive Hypercholesterolemia*). No entanto e devido a similaridade de fenótipos, as hipercolesterolemias de transmissão dominante são identificadas apenas por FH.

A distinção das patologias monogénicas é conseguida com sucesso quando baseada nos diferentes genótipos. Assim, a hipercolesterolemia advém de anomalias associadas aos genes: *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* (*Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9*) e *LDLRAP1* (*Low Density Lipoprotein Receptor Adaptor Protein 1*), respectivamente [28].

A Hipercolesterolemia Familiar é então, uma é uma patologia genética, autossómica dominante, existindo clinicamente sobe a forma heterozigóticos e homozigótica – forma mais severa da doença. Assim, um indivíduo com apenas um dos alelos mutado é considerado heterozigótico e homozigótico quando ambos os alelos provenientes do Pai e da Mãe se encontram mutados. Os alelos herdados pelos indivíduos homozigóticos podem conter duas mutações idênticas designando-se assim de homozigótico verdadeiro ou duas mutações distintas designando-se assim de heterozigótico composto.

Os indivíduos com FH homozigótica apresentam valores extremamente elevados de colesterol total – cerca 2 vezes superiores (normalmente acima de 600 mg/dL) aos apresentados por FH heterozigóticos, e normalmente DCV na primeira década de vida [29, 30]. Apesar de ser a forma mais severa da doença é todavia a menos comum quando comparada à forma heterozigótica. Apesar de comum esta patologia é frequentemente sub-diagnosticada em quase todos os países [31].

A frequência destas patologias monogénicas é variável uma vez que depende do enquadramento geográfico da população em análise e do gene mutado (Tabela 2).

Mutações no gene *LDLR* são a causa mais frequente de FH. Neste sentido, o diagnóstico genético para o receptor das LDL é considerado como o mais eficaz sendo essencialmente vantajoso para distinguir entre uma hipercolesterolemia monogénica,

poligénica ou de origem ambiental. Contudo, o diagnóstico da hipercolesterolemia nomeadamente FH, deve ter em conta multi-critérios como clínicos, bioquímicos e a história familiar.

Tabela 2 – Tabela Resumo das Hipercolesterolemia Monogénicas.

Gene Alterado	Transmissão	Prevalência	Alteração provocada
LDLR	<u>Autossómica Dominante</u>		↓ Eliminação LDL (MP) ↑ Produção LDL (MS)
	Heterozigótica	1:500	
	Homozigótica	1:1×10 ⁶	
APOB	Heterozigótica	1:200-1:1000	↓ Eliminação LDL
	Homozigótica	1:4×10 ⁶	
PCSK9	Heterozigótica	<1:2500	↓ Eliminação LDL ↑ Produção LDL
	<u>Autossómica Recessiva</u>		
LDLRAP1		<1:5×10 ⁶	↓ Excreção de colesterol (MP) ↓ Eliminação LDL (MS)

Legenda: ↓ – Diminuição; ↑ – Aumento; MP – Mecanismo primário; MS – Mecanismo secundário.
Adaptado de Rader *et al.*(2003) [32].

Por se tratar de um grave problema de saúde pública, a FH preenche os critérios dos programas de rastreio da OMS a qual, incentiva todos os países a desenvolverem sistemas de rastreio [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>]. Em concordância, este estudo poderá assim melhor fundamentar as recomendações da OMS e chamar a atenção dos principais órgãos nacionais de saúde para a importância da identificação precoce destes indivíduos, permitindo atenuar substancialmente o risco cardiovascular ao receberem aconselhamento e terapêutica adequada.

1.3.2 Caracterização Clínica da FH

A Hipercolesterolemia Familiar (OMIM – *Online Mendelian Inheritance in Man*, no. 143890) é uma das patologias mais frequentes e severas dos países desenvolvidos sendo a principal causa monogénica de hipercolesterolemia hereditária e a primeira doença

genética do metabolismo lipoproteico a ser molecularmente identificada e caracterizada [20].

Indivíduos com esta patologia genética apresentam um risco elevado de DCV, consequência dos níveis elevados de colesterol desde a nascença. Apesar de existirem poucos casos identificados no nosso País, prevê-se que existam cerca de 20 000 indivíduos afectados com FH em Portugal [33].

No que concerne à definição dos critérios clínicos, observa-se um desacordo a nível internacional, acabando cada País por adoptar critérios distintos para o diagnóstico da FH, uma vez que também são usados critérios diferentes na selecção e recrutamento de indivíduos a rastrear. Usualmente, clínicos e investigadores baseiam-se em apenas 3 sistemas distintos (1 Americano e 2 Europeus) para efectuar o diagnóstico clínico da FH. Nos Estados Unidos da América por exemplo, usa-se sistema o MED-PEP (*make early diagnosis, prevent death on mediocal pedigrees*) [34], sendo que na Holanda por exemplo, utiliza-se o sistema Holandês para diagnóstico da FH (*Dutch familial hypercholesterolaemia diagnostic system*) baseado numa análise mais elementar, em que o doente é classificado como “confirmado”, “provável” ou “possível” [35]. No Reino Unido são utilizados os critérios baseados no registo de Simon Broome (*Simon Broome Heart Research Trust*), em que apenas existem 2 resultados viáveis: “confirmado” e “possível” [36, 37]. Estes últimos foram os critérios adoptados em Portugal [33].

O fenótipo clínico da FH é baseado em sinais físicos, em testes genéticos e na história familiar. O prognóstico clínico da FH heterozigóticos não está apenas relacionado com a magnitude do aumento do c-LDL mas também com a presença de outros riscos coronários. Habitualmente, estes indivíduos têm valores de CT acima dos 300 mg/dL e valores de TG dentro da normalidade, apresentando ainda depósitos de colesterol nos tecidos extra vasculares, facilmente identificados (xantomas, usualmente xantomas tendinosos, xantelasma e arco coreano). A presença de xantelasma e arco coreano não são contudo, bons indicadores clínicos uma vez que também podem aparecer em pessoas idosas. Todavia o fenótipo clínico da FH é bastante variável uma vez que persiste a influência dos factores ambientais mas também porque as diversas mutações encontradas sobretudo no gene *LDLR* originam diferentes níveis de actividade do receptor [38].

Assim como a FH, a FDB é também caracterizada através de valores elevados de c-LDL (apesar de menos elevados) no plasma e valores normais de TG. Aterosclerose

prematura e o aparecimento de xantomas tendinosos encontram-se também associados a esta patologia. O aparecimento de DCV é mais lento em FDB homozigóticos, quando comparados com FH homozigóticos porém em indivíduos com FDB, a DCV prematura é mais frequente [39]. A sintomatologia da FH3 é igualmente idêntica à da FH e FDB, porém manifesta-se de forma mais severa.

1.3.3 Caracterização Molecular e Causas Genéticas da FH

A FH foi inicialmente descrita por Müller (1938) – um investigador Norueguês, que a identificou como sendo um único defeito genético de transmissão autossômica dominante [40]. Contudo foram os desenvolvimentos efectuados por Brown e Goldstein, dois Prémios Nobel de Medicina (galardoados em 1985) que permitiram comprovar que a causa da FH é um defeito hereditário no gene que quando alterado, provoca uma redução no número de receptores das LDL funcionais.

Pouco tempo depois da caracterização do gene *LDLR* – causa genética mais prevalente representando entre 50 a 80% dos casos, verificou-se que defeitos no gene *APOB* (em menor número) e mais recentemente mutações no gene *PCSK9* evidenciavam o mesmo fenótipo clínico, caracterizando também a base molecular da FH [41-44].

a) LDLR – Do gene à proteína

O gene que codifica o receptor das LDL encontra-se localizado no cromossoma 19p13.1-p13.3 e quando traduzido produz uma glicoproteína de superfície celular com o mesmo nome – *LDLR*, (P01130) com 860 aminoácidos e um peso molecular de pouco mais de 95 kDa cuja função é remover o c-LDL do plasma, transportando-o para o fígado [45]. O gene *LDLR* é dividido em 18 exões que codificam para os diferentes domínios da proteína, separados por 17 intrões (Figura 4).

Estruturalmente, a proteína LDLR é composta por 5 domínios funcionalmente distintos e que podem funcionar de forma independente. No extremo N-terminal do receptor de LDL existe uma sequência hidrofóbica constituída por 21 aa – péptido sinal, que é clivada imediatamente após tradução. Como não aparece no receptor maduro, este é composto por apenas 839 aa [46].

O primeiro domínio (I) do receptor de LDL consiste no N-terminal constituído por 292aa que contém sete sequências repetitivas com 40 aa de comprimento. Cada uma das sete sequências repetitivas contém seis resíduos de cisteína [47].

O segundo domínio (II) possui 35% de homologia com o gene precursor do factor de crescimento epidérmico (EGF). É composto por cerca de 400 aa e possui três “factores de crescimento” – *repeat* A, B e C. Os *repeat* A e B estão estreitamente ligados, enquanto o *repeat* C é separado por um *beta-propeller motif*. O domínio EGF tem sido implicado na libertação dos ligandos ligados ao receptor [48].

O terceiro domínio (III) do receptor de LDL consiste numa sequência de 58 aa composta por 18 aa de serina ou treonina – cadeias ricas em açúcares glicosilados. Este domínio é codificado dentro de um único exão (exão 15), todavia parece ter uma função pouco relevante [46, 48].

O quarto domínio (IV) é composto por uma cauda de 22 aa hidrofóbicos que atravessam a membrana plasmática da célula.

O quinto domínio (V) designado de domínio citoplasmático é fortemente conservado entre espécies. No interior da célula situa-se o domínio C-terminal de 50 aa, que auxiliam na internalização do receptor [47].

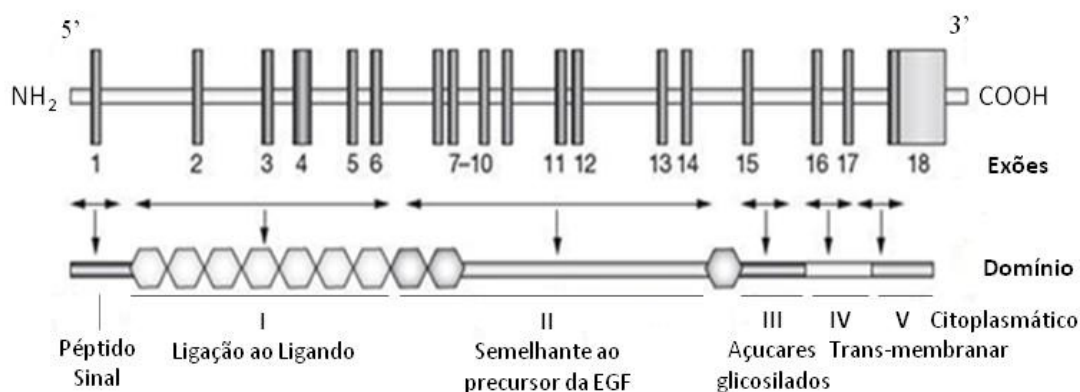


Figura 4 – Esquema representativo do gene do receptor das LDL (*LDLR*).
Adaptado de Soutar e Naoumova (2007) [38].

Logo depois do gene *LDLR* ter sido identificado, começaram a ser descritas as primeiras mutações neste gene [46, 49], sendo que muitas dessas mutações interrompem o movimento do receptor entre organelos (de classe 3 quando o receptor das LDL não é transportado para o complexo de golgi; de classe 4 quando existe falha na internalização

do receptor ou ainda de classe 5 quando as LDL não são eliminadas) [50]. A primeira classe de mutações possíveis no gene corresponde a uma falha na síntese do receptor, enquanto a segunda corresponde a uma incorrecta ligação deste receptor às LDL. A maioria das mutações identificadas pertence à 2ª e 3ª classe [51].

De acordo com última actualização da base de dados mantida pela *University College London* em parceria com a *British Heart Foundation*, são conhecidas 1 122 mutações alélicas únicas no receptor das LDL. Estas mutações variam consoante os indivíduos, os países e as populações onde se encontram inseridos estes indivíduos [<http://www.ucl.ac.uk/ldlr/>] [52] A maioria das mutações são únicas isto é, sem precedentes dificultando o diagnóstico todavia, conhecem-se casos de mutações que predominam numa determinada população como as encontradas na população Africana, Finlandesa ou Franco-Canadiana – designadas de “efeito fundador” [53].

Em Portugal assim como na maior parte dos países, as mutações encontram-se dispersas pelos 18 exões e região do promotor do gene *LDLR*. A maioria das mutações identificadas são mutações pontuais [52] enquanto os grandes rearranjos como deleções ou duplicações correspondem no caso Português, a apenas 6% [54].

b) APOB – Do gene à proteína

O gene *APOB* encontra-se localizado no cromossoma 2p23-p24 e codifica a grande proteína (P04114) – apoB100 com um total de 4536 aa e cerca de 550 kDa de peso molecular, e para uma mais pequena – apoB48 de apenas 2152 aa e um peso molecular de aproximadamente 265 kDa [55].

A apoB100 é o único ligando das LDL através do qual esta partícula se liga ao receptor das LDL [56]. A proteína está organizada em 29 exões e 28 intrões, sendo os exões 26 e 29 excepcionalmente grandes – 7572 e 1906 pb respectivamente. Apresenta cinco domínios estruturais sendo o primeiro domínio (N-terminal com 1000 aa) vital para a formação de VLDL uma vez que interage com a proteína microssomal de transferência de triglicéridos (MTP – *Microsomal Triglyceride Transfer protein*). O quarto domínio responsável pela interacção da apoB com os receptores de LDL [57] e pela manutenção da integridade desta partícula e VLDL [55]. A proteína tem uma estrutura alongada que engloba a totalidade das partículas

Várias mutações, entre elas a p.R3531C, p.R3527Y e a p.R3527Q, têm sido descritas no gene *APOB* [39, 58]. A mutação *missense* p.R3527Q é a mais comum na

Europa [59] sendo a p.R3527Y a menos frequente, todavia a mais comum na população Chinesa [60].

As mutações funcionais no gene *APOB*, apesar de em pequeno número, fazem desta patologia a segunda causa mais frequente de hipercolesterolemia familiar. Num estudo realizado em Espanha descreveu-se a existência de mutações no gene *APOB* em 13 casos, 11 dos quais na zona da Galiza [61]. Em Portugal foram já descritos 3 casos de indivíduos com a mutação p.R3527Q e 1 caso com a mutação p.Y3560C [54].

c) PCSK9 – Do gene à proteína

Apesar de já em 1999 haver indícios de um novo gene causador de um fenótipo em tudo semelhante a FH [62] só em 2003 é que esse novo gene – *PCSK9* (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) foi associado ao fenótipo da FH [58].

O gene *PCSK9* é constituído por 12 exões, localiza-se no cromossoma 1p32-p34. É traduzido numa proteína com o mesmo nome, com 692 aa e aproximadamente 74 kDa de peso molecular, sendo aparentemente a responsável por uma forma mais severa de hipercolesterolemia, se bem que rara [63]. Em condições normais esta protease-serina diminui a actividade do receptor das LDL por degradação do receptor das LDL dos hepatócitos, afectando os níveis de colesterol plasmático.

As mutações conhecidas [<http://www.ucl.ac.uk/ldlr/>] levam ao aumento de função do gene (frequentemente designadas de “*gain-of-function*”) ou à diminuição de função do gene (“*loss-of-function*”) as quais se encontram associadas a níveis elevados ou diminutos de c-LDL, respectivamente. Actualmente pouco se sabe acerca destas alterações genéticas (Figura 5) contudo uma mutação *missense* – a p.D374Y, foi identificada na Noruega e em Inglaterra [64]. Esta mutação origina diferentes valores de c-LDL nos indivíduos afectados, variando entre elevações medianas e severas [58]. Em Portugal foi encontrada em 2 casos-índice não aparentados e de regiões diferentes (norte e sul) com fenótipo agressivo, uma alteração semelhante à acima descrita (p.D374H) [54]. As alterações *nonssense* conhecidas até à data, foram identificadas em Afro-americanos numa frequência de 1:50. Estas mutações originam a diminuição dos valores de LDL em cerca de 28% e consequentemente diminuem em 88% a frequência de DVC [65]. O mecanismo pelo qual o gene *PCSK9* interactiva prevalece não completamente esclarecido [66] porém, parece envolver tanto a via intracelular como extracelular [67]

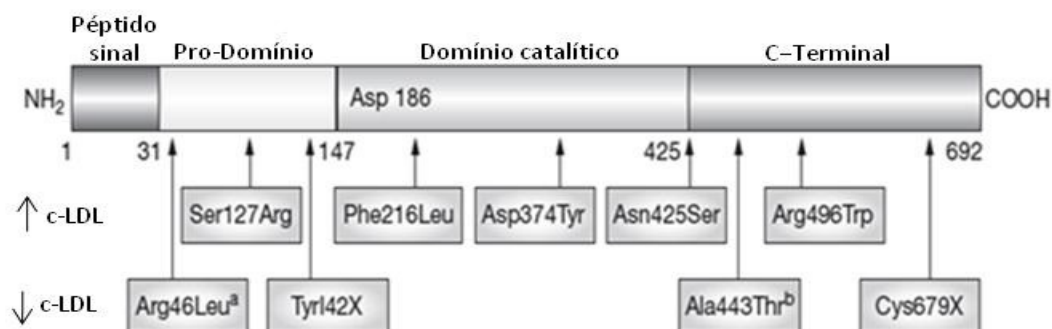


Figura 5 – Variantes da PCSK9 associadas com a concentração de colesterol LDL no plasma.

Este diagrama mostra as diferentes variantes associadas à patologia. **a** | Apenas associada à raça caucasiana; **b** | Associada apenas a afro-americanos homozigóticos. Adaptado de Soutar e Naoumova (2007) [38].

1.3.4 Terapêuticas Aplicadas

A maioria das *guidelines* nacionais e internacionais para a prevenção das doenças cardiovasculares recomenda, como prevenção primária, modificação dos estilos de vida (cessação dos hábitos tabágicos, a prática regular da actividade física, a perda de peso) e a opção por uma dieta saudável. Todavia a associação de fármacos com capacidade de reduzir os níveis de lípidos (nomeadamente CT e c-LDL) na corrente sanguínea é quase que inevitável, nomeadamente para indivíduos de alto risco em especial para os que já sofreram algum evento cardiovascular ou que têm hipercolesterolemia marcada [68].

Os vários medicamentos hipolipemiantes disponíveis (Tabela 3) comercialmente possuem diferentes mecanismos de acção podendo desta forma, a redução de c-LDL ser alcançada através (1) da inibição do colesterol endógeno, (2) inibição da absorção intestinal ou ainda (3) através do aumento da síntese e/ou eliminação de ácidos biliares através da biliar.

O tratamento inicial deve ser sempre em monoterapia, mas caso o fim terapêutico não seja alcançado frequentemente recorre-se a associações entre os diferentes fármacos. Todavia, estas associações exigem uma maior atenção em relação aos possíveis efeitos adversos provocados nomeadamente no tecido muscular e hepático.

Tabela 3 – Quadro Resumo do Efeito da Farmacoterapia no Perfil Lipídico.

Fármaco	c-LDL (%)	c-HDL (%)	TG (%)
Estatinas*	↓ 18-55	↑ 5-15	↓ 7-30
Fibratos	↓ 5-20	↑ 10-20	↓ 20-50
Acido Nicotínico	↓ 5-25	↑ 15-35	↓ 20-50
Resinas	↓ 15-30	↑ 3-5	Sem alteração
Ezetimiba**	↓ 18	↑ 1	↓ 8

Legenda: *Com excepção da Rosuvastatina; **Em monoterapia; ↓ Diminuição; ↑ Aumento. Adaptado de Rato (2010) [69].

As estatinas (Rosuvastatina, Atorvastatina, Sinvastatina, Pravastatina, entre outras) são consideradas fármacos de primeira linha sendo especialmente recomendadas se a principal alteração lipídica for a elevação do c-LDL [68]. Estas substâncias que actuam primariamente no fígado, provocam a diminuição a síntese de colesterol hepático por inibição da enzima HMG-CoA redutase que consequentemente estimula o aumento da actividade dos receptores de LDL potenciando a remoção do c-LDL da corrente sanguínea. As estatinas têm potência, eficácia, perfil farmacológico e farmacocinético diverso e consequentemente, uma relação dose-eficácia distinta assim, a decisão sobre por qual estatina usar e qual a dose a aplicar depende do nível basal de c-LDL e na percentagem de redução do LDL que se pretende atingir. Há que ter também em atenção o custo do medicamentos uma vez este é um factor limitante no seguimento da terapêutica por parte do doente [69].

Esta classe de fármacos vem sendo empregue com grande sucesso desde o seu surgimento e já demonstrou efeitos benéficos na redução da morbilidade e mortalidade cardiovascular, sendo normalmente bem toleradas contudo, são conhecidos alguns efeitos colaterais como dores musculares, desconforto gastrointestinal, náuseas e insónias [70].

Nos adultos, as estatinas permitem uma redução do c-LDL e CT em cerca de 18-55% e 15-30%, respectivamente [68]. Porém, o principal problema da aplicação de uma terapêutica farmacológica prende-se, quando os indivíduos são crianças ou adolescentes. Os estudos desenvolvidos por Rodenburg e colaboradores [71] demonstraram a eficácia e segurança do uso de estatinas em crianças dos 8 aos 17 anos. Neste estudo observou-se a redução entre 25 a 30% de c-LDL assim como a redução significativa da espessura íntima média da carótida. Este estudo demonstrou ainda e

pela primeira vez, que o início precoce da terapia com estatina em crianças com FH pode ser benéfico na prevenção da aterosclerose.

Vários outros ensaios clínicos realizados em crianças [72-75] demonstraram que os efeitos adversos são ínfimos e não superiores aos verificados em adultos porém ainda não se sabe quais os efeitos adversos em indivíduos que tomem estes medicamentos durante 40 ou 50 anos daí que alguns especialistas mantêm a preocupação relativamente ao uso destes em crianças.

Os fibratos (bezafibrato e fenofibrato, por exemplo) são derivados do ácido fíbrico e usados há mais de 30 anos. Exercem sua acção principal sobre os triglicéridos sobretudo porque diminuem a concentração das VLDL, e uma acção secundária sobre o C-HDL, aumentando em cerca 15 a 35%. O ácido nicotínico ou niacina é outro dos medicamentos lipomaniante usados no tratamento das dislipidemias que permite reduzir os valores de CT (20%), TG (10-50%) e LDL (5-25%). Aumenta os níveis plasmáticos de HDL (15-35%) e diminui as LDL mais pequenas e densas (sdLDL) [69]. Os fibratos e o ácido nicotínico são especialmente eficazes em hiperlipidemia mista podendo ser usados em combinação com fármacos de primeira linha.

As resinas são utilizadas há décadas por serem particularmente eficazes na redução do c-LDL. O uso é essencialmente indicado para crianças e mulheres em idade fértil, uma vez que não possuem efeito sistémico logo não são absorvidas, o que representa por si só uma grande vantagem. Os sequestrantes biliares actuam ao nível dos ácidos biliares promovendo o aumento da síntese de colesterol, promovendo a sua eliminação pelas fezes e diminuindo o c-LDL em 15 a 20% [9]. Todavia as resinas são mal toleradas e tendem a interferir com a absorção de vitaminas e outros medicamentos o que limita seu uso em muitos casos [76, 77].

Recentemente foi lançado no mercado uma nova resina – Colesevelam, cuja formulação apresenta melhor tolerabilidade gastrointestinal e que tem alcançado bons resultados quando associado às estatinas [77]. O Colesevelam foi projetado especificamente para ter maior capacidade de ligação aos ácidos biliares e diminuir os efeitos colaterais apresentados pelas outras resinas.

Em adultos, o Colesevelam provocou uma redução do c-LDL em cerca de 15% quando aplicado em monoterapia [78] e em cerca de 48% quando combinado com uma estatina [79-81]. Um primeiro estudo publicado em 2009 e que incidiu sobre crianças (10 aos 17 anos de idade) heterozigóticos para a FH, permitiu avaliar a eficácia hipolipemiante e a segurança do Colesevelam quando utilizado sozinho ou em

combinação com uma estatina. Este estudo demonstrou que o Colesevelam permitiu reduzir o c-LDL (entre 6,3 e 12,5%, dependendo da dosagem), CT (7,4%) e apoB (8,3%) e aumentar apesar de ligeiramente, o C-HDL (6,1%) e apoA1 (6,9%) [82].

Principalmente devido ao seu bom perfil de segurança apresentado, as novas resinas como o Colesevelam, permanecem como alternativa às estatinas, especialmente quando se trata de crianças, adolescentes ou jovens mulheres.

Outros fármacos, como o recente Ezetimiba – actua na inibição da absorção do colesterol sendo melhor tolerado que os sequestradores de ácidos biliares, têm sido usados com igual sucesso contudo a eficácia só é máxima quando utilizados em terapêutica combinada com uma estatina, por exemplo [83]. No caso particular da Ezetimiba, quando combinado com uma estatina permite uma redução adicional de cerca de 20% nos níveis de c-LDL e pequenos aumentos de c-HDL [68].

Apesar da diversidade de fármacos existentes no mercado, frequentemente os indivíduos FH homozigóticos e heterozigóticos compostos necessitam de recorrer a outras terapias como a LDL aférese. Esta terapia assemelha-se a diálise permitindo produzir rápidas reduções nos níveis de c-LDL de circulação sanguínea. É usada essencialmente em indivíduos com hipercolesterolemia grave que são intolerantes ou não respondem à terapêutica instituída.

Indivíduos com FH devem procurar fazer alterações no seu estilo de vida essencialmente intervenções benéficas na sua alimentação, desenvolver a prática de exercício físico e cessar hábitos tabágicos, deste modo e com ajuda de terapêutica adequada terão uma vida mais longa e saudável.

2. Objectivos

O Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar (EPFH) começou em 1999 no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) sob a coordenação da Doutora Mafalda Bourbon e desde 2006 que conta com o apoio científico e financeiro da Sociedade Portuguesa de Cardiologia (SPC).

Este estudo epidemiológico tem como objectivo central a determinação da causa genética em indivíduos com diagnóstico clínico de FH e a realização de estudos familiares aquando a identificação de uma mutação num dos 3 genes descritos como causa de doença. O EPFH tem ainda como finalidade a identificação correcta e precoce, dos indivíduos com FH assim como, direcciona-los para aconselhamento e tratamento adequado.

Este trabalho em específico teve como principais propósitos, a:

1. Caracterização bioquímica dos indivíduos oriundos das regiões norte e centro do País com diagnóstico clínico de FH;
2. Caracterização molecular destes mesmos indivíduos, através da pesquisa de mutações nos 18 exões do gene *LDLR* e em 2 exões do gene *APOB*;
3. Análise entre os genótipos da ApoE e as características bioquímicas apresentadas pelo grupo de indivíduos em estudo;
4. Comparação das características bioquímicas em indivíduos com e sem mutações nos genes estudados.

3. Material e Métodos

3.1 Recrutamento de Indivíduos

Os indivíduos envolvidos no presente estudo possuem naturalidade da zona norte ou centro do País, tendo sido referenciados pelos respectivos médicos assistentes.

A inclusão de indivíduos com o diagnóstico clínico de FH neste estudo teve como base os critérios adaptados de *Simon Broome Heart Research Trust* (Tabela 4) e adotados pelo Grupo de Investigação Cardiovascular (GIC) inserido na Unidade de I&D do Departamento para a Promoção da Saúde e Doenças Crônicas (DPSDC) do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) [33, 36].

Tabela 4 – Critérios de FH adaptados de “*Simon Broome Heart Research Trust*”.

Hipercolesterolemia Familiar <u>confirmada</u> é definida como:	Hipercolesterolemia Familiar <u>possível</u> é definida como:
<p>(a) Caso-índice: <u>Criança</u> até aos 10 anos com colesterol total acima de 200 mg/dL ou colesterol LDL acima de 120 mg/dL; Dos 10 aos 16 com colesterol total acima de 260 mg/dL ou colesterol LDL acima de 155 mg/dL;</p> <p>Caso-índice: <u>Adulto</u> com colesterol total acima de 290 mg/dL ou colesterol LDL acima de 190mg/dL;</p> <p style="text-align: center;">&</p> <p>(b) Xantomas tendinosos no caso-índice ou familiar (pais, filhos, avós, irmãos, tios)</p> <p>ou</p> <p>(c) Evidência genética de mutação no gene receptor de LDL ou ApoB ou PCSK9.</p>	<p>(a) Caso-índice: <u>Criança</u> menor de 16 anos com colesterol total acima de 200 mg/dL ou colesterol LDL acima de 120 mg/dL; Dos 10 aos 16 com colesterol total acima de 260 mg/dL ou colesterol LDL acima de 155 mg/dL;</p> <p>Caso-índice: <u>Adulto</u> com colesterol total acima de 290 mg/dL ou colesterol LDL acima de 190mg/dL;</p> <p style="text-align: center;">&</p> <p>(d) 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/ou tios.</p>

Para determinação dos parâmetros bioquímicos e obtenção de DNA foram colhidas respectivamente, amostras de sangue venoso em tudo seco para obtenção de

soro (7,5 mL por adulto e 4 mL por criança e/ou familiar) e em tubo EDTA (cerca de 8 mL de sangue por adulto e 6 mL por criança e/ou familiar). As amostras são posteriormente enviadas por correio para o INSA juntamente com um questionário clínico preenchido pelo médico assistente e uma declaração de consentimento informado e esclarecido assinada pelo respectivo doente e médico (Anexos A).

Aquando da chegada ao laboratório, é atribuído um número de identificação (ID) a cada amostra sendo posteriormente processada e registada numa base de dados confidencial, toda a informação referente a cada doente. Esta base de dados encontra-se legalizada pela Comissão de Protecção de Dados (CNPD).

3.2 Determinação dos Parâmetros Bioquímicos

A caracterização bioquímica é efectuada para cada doente em soro fresco e consiste na determinação do perfil lipídico nomeadamente, para os valores de colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicéridos, apolipoproteína A1, apolipoproteína B e lipoproteína (a).

Estas determinações bioquímicas foram efectuadas na Unidade Laboratorial Integrada do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (DPSDC–INSA) utilizando-se para tal, o auto-analisador Cobas Integra 400 plus (Roche) de acordo com as instruções do fabricante, por um método enzimático e colorimétrico.

3.3 Extracção de DNA Genómico

Para cada um dos casos índice e familiares, foi efectuada a extracção de DNA a partir de leucócitos presentes na(s) amostra(s) de sangue periférico colhido em tubo(s) EDTA. A extracção foi realizada mediante o uso do Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp.), de acordo com as instruções do fabricante.

Sucintamente, começou-se por provocar a lise das células sanguíneas e dos núcleos com as respectivas soluções (*Cell* e *Nuclei Lysis Solution*). Posteriormente

procedeu-se à precipitação de proteínas celulares através da adição de *Protein Precipitation Solution* e à agitação no vortex durante 20 seg. Após centrifugação verificou-se a formação de um *pellet* contendo detritos celulares e proteínas, sendo o sobrenadante transferido para um tubo de *falcon* limpo. Ao sobrenadante adicionou-se isopropanol (Merck) com o objectivo de precipitar o DNA. Lentamente agitou-se por inversão, esta mistura até serem visíveis as fibrilhas de DNA. Estas fibrilhas foram posteriormente transferidas para um *ependorf* e sujeitas a duas lavagens com etanol a 70% a fim de se proceder à remoção de todos os sais.

Depois de extraído, o DNA foi re-hidratado em 200 µl de água estéril bidestilada e colocado num agitador (Thermomixer compact, Eppendorf) durante 12 horas a 400 - 450 rpm. Por fim guardou-se o DNA a 4 °C. Após uma semana, procedeu-se à quantificação e validação da pureza do DNA extraído através do espectrofotómetro de UV-Vis (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Para validação da qualidade do DNA obtido aplicou-se as amostras num gel 0,8% de agarose (1x tampão TBE, Invitrogen). Por fim, procedeu-se à preparação de uma aliquota de DNA com concentração final de 100 ng/µL. Esta aliquota – solução de trabalho, foi conservada a 4°C sendo a restante amostra, mantida a -20 °C (solução stock).

3.4 Estudo Molecular

3.4.1 Amplificação do DNA por PCR

O estudo molecular para a FH – 1ª fase, consiste na pesquisa de mutações na região do promotor e nos 18 exões que constituem o gene *LDLR* e na amplificação de parte do exão 26 e 29 do gene *APOB* onde se encontram as mutações mais comuns. A pesquisa de mutações nos 12 exões do gene *PCSK9* – 3ª fase, não foi efectuada a tempo desta análise. Procedeu-se ainda á amplificação por PCR, do exão 4 do gene *APOE*.

Os fragmentos de ambos os genes foram amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) seguidos de sequenciação directa/automática. A sequência dos oligonucleótidos iniciadores ou *primers* utilizados assim como, as temperaturas de hibridação para cada um deles e o tamanho da região amplificada encontra-se em anexo (Anexo B). A amplificação de cada um dos fragmentos da *APOB* e *LDLR* foi preparada

numa mistura de reacção com 25 µl de volume final. Cada reacção de PCR contém 0,2 mM de cada um dos dNTPs (dATP, dGTP, dTTP e dCTP, 100 mM, Bioline), tampão NH₄ (10x, Bioline), 1,5 mM de MgCl₂ (50 mM, Bioline), 20 pmol de cada *primer* (100 pmol, Invitrogen) e 1,25 units/µl de *BIOTaq polymerase* (Bioline). A cada tubo de reacção adicionou-se 1 µl de DNA na concentração de 100 ng (Anexo B). A reacção ocorreu num termociclador (T3000, Biometra) com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C durante 3min seguida de um conjunto de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 45 seg, hibridação a 57 °C – 63 °C (dependendo do exão amplificado) durante 30 seg e extensão a 72 °C com a duração de 1 min. A extensão final ocorreu durante 30 min, à temperatura de 72 °C.

A amplificação do exão 4 do gene *APOE* foi preparada de acordo com o CG-RICH PCR System Kit (Roche Applied Science). As condições de reacção foram as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C durante 5min seguida de um conjunto de 38 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 30 seg, hibridação a 58 °C durante 40 seg e extensão a 72 °C com a duração de 45 seg. A extensão final a 72 °C ocorreu durante 5 seg (Anexo C).

Os produtos dos fragmentos amplificados de ambos os genes foram analisados por electroforese num gel de agarose 1,5% (p/v) (Invitrogen) e visualizados num transiluminador (Safe Imager® blue light transilluminator, Invitrogen). O tamanho de cada fragmento foi determinado através do uso do marcador com 1 Kb de peso molecular (Invitrogen).

3.4.2 Purificação e Sequenciação Automática dos Produtos de PCR

Para se obter sequências com melhor qualidade, os *primers* e dNTPs excedentes foram eliminados através de uma reacção designada de purificação. Esta reacção ocorreu por digestão enzimática através da combinação de duas enzimas hidrolíticas – Exonuclease I e da *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP). A combinação destas enzimas resulta num produto comercialmente disponível de nome ExoSAP-IT® (Amersham Pharmacia Biotech). A purificação do produto de PCR foi efectuada de acordo com as recomendações do fabricante. A reacção de purificação ocorreu num termociclador (T3000, Biometra) e consistiu num processo de incubação a 37 °C que decorreu durante 15 min e posteriormente num processo de inactivação das respectivas enzimas a 80 °C

com a mesma duração. Esta reacção foi efectuada de modo igual para os fragmentos dos 3 genes (*LDLR*, *APOB* e *APOE*) amplificados por PCR.

A fase seguinte consistiu na sequenciação automática destes fragmentos. Sucintamente, este tipo de sequenciação baseia-se no método desenvolvido por Sanger *et al.* [84] que recorre a nucleótidos terminadores da cadeia. Estes terminadores são di-desoxinucleótidos tri-fosfatados marcados com um fluorocromo na extremidade 3' (ddNTPs).—A reacção de sequenciação foi preparada de acordo as instruções do fabricante – Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems), com os produtos purificados correspondente aos genes *LDLR* e *APOB*. Por cada microlitro de produto de PCR purificado foram utilizados 2 µl de Terminator ready reaction mix. A reacção ocorreu num termociclador (T3000, Biometra) com as seguintes condições: desnaturação inicial a 96 °C durante 30 seg seguida de 25 ciclos de desnaturação a 96 °C durante 10 seg, hibridação a 50 °C durante 5seg e extensão a 60 °C com a duração de 4 min.

O produto de cada reacção foi posteriormente entregue à Unidade Laboratorial de Utilização Comum (ULUC-INSA), sendo a sequenciação realizada no aparelho – ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram analisadas com o programa Standen Package® (versão 1.5 para Windows).

3.4.3 Análise de *Single Nucleotide Polimorfisms* (SNPs)

Para a determinação do genótipo do gene *APOE* procedeu-se à determinação dos diferentes SNPs através do uso do SNaPshot® Multiplex Kit (Applied Biosystems). Esta metodologia baseia-se na extensão do fragmento, já amplificado por PCR, que contém a zona polimórfica utilizando para tal um conjunto de *primers* que apenas diferem numa única base (Anexo C). Por cada reacção adicionou-se 2,5 µl de *SNaPshot Multiplex ready reaction mix*, 1 µl de cada *primer* (72 e 210) à concentração de 0,2 pmol e 1,5 µl de produto de PCR purificado. A reacção ocorreu num termociclador (T3000, Biometra) com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 10 seg seguido de 60 °C com a duração de 30 seg. Após terminar esta reacção adicionou-se a cada tubo de reacção 1 µl da enzima SAP para tratamentos pós-extensão que compreende uma incubação a 37 °C durante 60 min e posterior inactivação a 80 °C durante 15 min.

O produto final foi entregue à Unidade Laboratorial de Utilização Comum (ULUC-INSA), para ser analisado (ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser, Applied Biosystems).

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

MLPA® (MRC Holland) é um método de quantificação de cópias de uma dada sequência de DNA genómico. Consiste numa variação da reacção PCR que permite amplificar múltiplos alvos e detectar a existência de grandes deleções e/ou duplicações.

O MLPA® Salsa P062-C1 LDLR Kit contém um total de 37 sondas, 19 das quais para o gene *LDLR* – 1 para o promotor correspondendo as restantes 18 sondas a cada um dos exões, e 2 sondas que irão emparelhar antes e depois do gene *LDLR*. As restantes 16 sondas irão emparelhar noutros genes/cromossomas, funcionando como controlos (Anexo D). Adicionalmente, existem 5 fragmentos controlo que originam pequenos produtos os quais são posteriormente usados para aferir sobre a qualidade do DNA e reacção de ligação. Cada sonda MLPA consiste num par de oligonucleótidos (sondas de hibridação) que reconhecem sequências-alvo adjacentes no DNA. Cada um dos oligonucleótidos contém uma das sequências reconhecidas pelo *primer* de PCR.

Todos os indivíduos com diagnóstico clínico de FH e sem qualquer mutação pontual ou pequena inserção e/ou deleção, foram analisados por MLPA (MRC Holland) seguindo as instruções do fabricante – 2ª fase do EPFH.

A reacção de MLPA ocorreu num termociclador (T3000, Biometra) e foi dividida em cinco etapas principais: 1) a desnaturação do DNA e hibridação das sondas, 2) reacção de ligação, 3) reacção de PCR; 4) separação dos produtos de amplificação por electroforese capilar e 5) análise dos dados recolhidos. Sucintamente, durante a primeira etapa, o DNA é desnaturado e incubado durante cerca de 16 horas com uma mistura de sondas, as quais hibridam imediatamente com a sequência-alvo. A reacção de ligação – 2ª etapa, resulta da hibridação das sondas, ocorrendo posteriormente a amplificação por PCR de cada sonda com um tamanho único (entre 130 a 480 bp). Os marcadores fluorescentes são separados por electroforese sendo o produto de amplificação das sondas comparados com os fragmentos controlo para determinar o número de cópias das sequências-alvo.

O produto final foi entregue à Unidade Laboratorial de Utilização Comum (ULUC-INSA), para ser separado por electroforese capilar (ABI PRISM™ 310 Genetic

Analyser, Applied Biosystems). A altura dos picos da sequência-alvo foi normalizada usando controlos internos e avaliada quanto a perda (rácio de 0,5) ou ganho de exão (rácio de 1,5).

3.4.5 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

A metodologia RFLP permite a identificação de indivíduos com base em padrões únicos de enzimas de restrição (endonucleases) de corte em regiões específicas do DNA. Utiliza como princípio as digestões com endonucleases de restrição para identificar polimorfismos na sequência de DNA em genes ou regiões de interesse [85]. Estes polimorfismos são caracterizados por eliminarem o local de restrição. Portanto, consoante o nucleótido existente, a enzima terá ou não a sua sequência de reconhecimento presente. Desta forma, o polimorfismo pode ser detectado por comparação dos padrões da digestão enzimática [86].

O produto resultante da amplificação do exão 10 foi digerido com a enzima – HpyCH4IV (5'–A↓CGT–3' e 3'–TGC↑A–5'), seleccionada através da base de dados *online* reBASE tools (New England BioLabs) [<http://www.neb.com/nebecomm/>]. A mistura de reacção consistiu na adição de 2 µl de 10x NEbuffer 1 (New England BioLabs), 0,2 µl de enzima HpyCH4IV (New England BioLabs) e água bidestilada perfazendo um volume final de 10 µl. Posteriormente, procedeu-se à incubação a 37 °C num termociclador (T3000, Biometra), durante 10 horas seguida por uma inactivação de 20 min a 80 °C. A separação dos fragmentos obtidos após digestão enzimática realizou-se mediante electroforese num gel de Agarose/NuSieve GTG a 3% (p/v) (Invitrogen/Cambrex Bio Science Rockland – 3:1).

3.5 Análise Estatística

Para a análise estatística recorreu-se ao uso do programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, versão 17.0 para Windows). A análise baseou-se na aplicação do teste não paramétrico Mann-Whitney (para 2 amostras independentes), sendo considerado estatisticamente significativo o valor de p inferior a 0,05.

4. Apresentação dos Resultados e Discussão

4.1 Análise das Características Clínicas e Bioquímicas da População em Estudo

De Outubro de 2009 a Maio de 2010, o Grupo de Investigação Cardiovascular (GIC-INSA) recebeu um total de 78 indivíduos (casos-índice) com diagnóstico clínico de FH. Dos 78 indivíduos referenciados ao EPFH, apenas foram considerados para este trabalho os 34 indivíduos naturais da região norte ou centro do País. Destes 34 indivíduos apenas 27 (34,6%) apresentavam critérios clínicos de FH tendo em conta os critérios definidos para este trabalho (ver Tabela 4 no ponto 3.1). Por este motivo, a análise estatística e os resultados apresentados referem-se apenas aos indivíduos com critérios.

Assim e para este trabalho, foi analisado um conjunto de 27 indivíduos sendo 21 naturais da região norte e os restantes 6 indivíduos, naturais da região centro do País (Tabela 6 e Anexo F). Este grupo de indivíduos foi posteriormente sub-dividido em 2 grupos consoante a idade – Grupo Pediátrico (≤ 16 anos) e Grupo dos Adultos (> 17 anos) (Tabela 5). O grupo dos adultos é constituído por 10 indivíduos com idades entre os 33 e 62 anos, enquanto o grupo pediátrico é constituído por 17 indivíduos com idades compreendidas entre os 4 e os 16 anos.

Tabela 5 – Distribuição dos Casos-índice pelos dois Grupos Estudados: Pediátrico e Adultos. Caracterização Clínica e Factores de Risco.

	Grupo Pediátrico	n	Grupo de Adultos	n
Idade (anos)	9,5 \pm 4,0	17	45,8 \pm 9,0	10
IMC* (Kg/m ²)	18,9 \pm 4,1	17	26,8 \pm 6,3	9
Sexo Feminino (%)	64,7	11	50,0	5
Sexo Masculino (%)	35,3	6	50,0	5
Consumo de álcool (%)	0,0	17	22,2	9
Fumadores (%)	0,0	17	44,4	9
Hipertensão (%)	0,0	17	0,0	9
Diabetes (%)	0,0	17	22,2	9
Tiróide (%)	0,0	17	0,0	9
Xantomas tendinosos (%)	0,0	17	0,0	9
DCV (%)	0,0	17	33,3	9
Com Medicação (%)	18,8	16	100,0	9
Exercício Físico (%)	76,5	17	50,0	9

*Índice de Massa Corporal

Tabela 6 – Apresentação das Características Clínicas dos Casos-Índice Estudados.

ID	Idade (anos)	Sexo	IMC	DCV	Antes de Tratamento				Presente							Medicação
					CT (mg/dL)	LDL (mg/dL)	HDL (mg/dL)	TG (mg/dL)	CT (mg/dL)	LDL (mg/dL)	HDL (mg/dL)	TG (mg/dL)	ApoA1 (mg/dL)	ApoB (mg/dL)	Lp(a) (mg/dL)	
Grupo Pediátrico																
29253	9	F	18,79	N	248	181	58	52	202	135	61	72	174	79	42	N (dieta)
29257	16	M	20,38	N	294	230	47	85	255	193	39	65	123	115	81	N (dieta)
29261	5	F	13,70	N	233	161	60	64	224	146	54	75	147	108	58	N
29292	12	M	20,36	N	245	181	54	**	*	*	*	*	*	*	*	N
10033	16	M	25,66	N	221	171	31	106	197	135	45	116	144	84	8	N (dieta)
10066	10	F	15,80	N	237	146	70	62	193	110	75	44	205	64	8	S (resina)
10100	9	F	18,80	N	261	**	**	**	220	156	55	36	136	95	8	S (estatina)
10106	16	M	22,50	N	292	212	36	96	269	219	40	92	120	122	10	N (dieta)
10108	8	F	14,20	N	221	156	49	78	214	152	50	100	150	96	11	N (dieta)
10110	9	F	23,14	N	252	156	63	164	263	196	55	153	172	111	15	N (dieta)
10114	14	F	25,71	N	269	190	61	92	227	144	69	65	174	183	80	S (estatina)
10119	6	F	23,20	N	246	160	41	227	184	133	42	54	111	83	16	N (dieta)
10121	4	F	11,90	N	268	**	**	79	236	179	51	57	125	115	122	N (dieta)
10123	7	M	17,30	N	224	**	66	**	169	98	70	32	176	54	8	N (dieta)
10124	4	M	16,01	N	208	**	65	**	205	134	66	69	166	71	165	N (dieta)
10126	8	F	17,16	N	237	125	75	52	242	157	80	61	200	82	8	N (dieta)
10128	9	F	16,00	N	284	191	54	123	220	159	48	114	150	99	8	N
Grupo de Adultos																
29271	58	M	39,10	S (EAM, 39; CABG, 57)	350	**	**	**	156	88	44	106	146	73	107	S (estatina+ezetimiba)
29279	47	F	18,99	N	600	**	**	**	331	266	47	90	172	147	69	S (estatina)
10015	62	F	25,10	N	306	220	66	98	209	125	74	68	183	76	171	S (estatina)
10020	45	F	21,09	S (Ang)	309	216	67	138	184	118	57	62	162	84	8	S (estatina)
10022	37	M	**	**	**	**	**	**	279	215	33	189	137	143	54	**
10028	40	M	34,55	N	319	238	37	220	226	174	31	124	137	128	32	S (estatina)
10039	40	M	25,40	N	290	**	**	**	180	106	56	140	180	66	30	S (estatina)
10070	48	F	26,37	N	284	200	60	118	182	118	49	93	156	68	95	S (estatina)
10083	33	M	27,41	N	**	**	**	**	494	429	43	192	146	231	44	S (estatina+ezetimiba)
10097	48	F	23,42	S (EAM, Angiop; 46)	298	**	**	**	176	104	52	100	160	71	228	S (estatina+ezetimiba)

Legenda: ID – Identificação do caso-índice; N – Não; S – Sim; F – Feminino; M – Masculino; IMC – Índice de Massa Corporal; DCV – Doença CardioVascular; EAM – Enfarte de Miocárdio; CABG – Cirurgia de Revascularização do Miocárdio; Ang – Angina de Peito; Angiop – Angioplastia. *Não foi possível obter os valores bioquímicos deste indivíduo por falta da amostra de soro; ** Sem Informação por parte do Médico Assistente.

A média de idades no grupo de adultos foi de $45,8 \pm 9$ anos enquanto no grupo pediátrico rondou os $9,5 \pm 4$ anos de idade. Dos indivíduos estudados 59,3% pertencem ao sexo feminino. Metade da população adulta pratica exercício físico porém muito aquém do grupo pediátrico, em que 76,5% pratica pelo menos uma vez por semana exercício físico. Esta elevada percentagem reflecte o fomento das medidas de prevenção da doença e promoção da saúde implementadas nas escolas, através de programas oficiais de educação física, programas desportivos escolares e iniciativas desportivas [<http://www.minsaude.pt/portal/>]. Estas medidas assumem especial relevo devido ao papel primordial que estas instituições desempenham no processo de aquisição de estilos de vida saudáveis e na prevenção de doenças como a obesidade. Cerca de metade (44,4%) dos indivíduos adultos com diagnóstico clínico de FH são fumadores activos e 22,2% consome bebidas alcoólicas (Tabela 5).

Verificou-se a inexistência de xantomas tendinosos quer na população infantil quer na população adulta. Problemas de tiróide e hipertensão também não foram observados todavia 22,2% e 33,3% da população adulta apresentou diabetes e DCV, respectivamente. Em 2 dos 10 adultos com diagnóstico clínico de FH verificou-se a ocorrência de DCV prematura, considerando a média de idades de $42,5 \pm 4,9$ anos. O aparecimento de DCV prematura é característico de indivíduos com FH e a presença de DCV na família um factor preditivo do risco cardiovascular desse indivíduo [<http://www.minsaude.pt/portal/>]. Dos 10 indivíduos pertencentes ao grupo de adultos, 9 já se encontravam em tratamento farmacológico quando encaminhados para estudo enquanto, apenas 18,8% das crianças estão medicadas. Na população adulta salienta-se a incidência de um valor médio elevado ($26,8 \text{ Kg/m}^2$) de IMC valor este, que se encontra no intervalo de valores de referência para excesso de peso ($\geq 25 \text{ Kg/m}^2$) [<http://www.minsaude.pt/portal/>]. Este valor poderá indicar a ausência de uma alimentação equilibrada e/ou sedentarismo podendo desta forma explicar valores mais elevados de CT e TG (Tabela 5).

A média dos valores de CT, LDL, HDL e TG (antes de tratamento) das crianças até aos 10 anos de idade foi de $243,3 \pm 21,3 \text{ mg/dL}$, $159,5 \pm 20,2 \text{ mg/dL}$, $60,1 \pm 10,1 \text{ mg/dL}$ e $100,1 \pm 60,2 \text{ mg/dL}$, respectivamente. As crianças com idades compreendidas entre os 11 e os 16 anos apresentam valores de CT, LDL, HDL e TG de $264,2 \pm 31,3 \text{ mg/dL}$, $196,7 \pm 24,0 \text{ mg/dL}$, $45,8 \pm 12,4 \text{ mg/dL}$ e $94,1 \pm 8,7 \text{ mg/dL}$, respectivamente. Ao analisar o conjunto do grupo pediátrico, com uma média de idades de $9,5 \pm 4$ anos, também se verificam valores de CT ($249,4 \pm 25,6 \text{ mg/dL}$) e LDL ($173,8 \pm 28 \text{ mg/dL}$) acima dos

recomendados pela Sociedade Europeia de Cardiologia [1]. Para a população adulta, a média destes valores foi de $308 \pm 21,9$ mg/dL, $218,5 \pm 15,6$ mg/dL, $57,6 \pm 14,1$ mg/dL e $143,5 \pm 53,6$ mg/dL, respectivamente.

4.2 Diagnóstico Molecular da População em Estudo

No total dos 27 indivíduos recebidos para estudo determinou-se a causa genética da hipercolesterolemia em 8 dos casos-índice ou seja, 29,6% dos indivíduos apresentaram causa genética para a sua hipercolesterolemia.

Nos restantes 19 casos-índice, não foi encontrada qualquer alteração nos 2 genes estudados (*LDLR* e *APOB*) consequentemente, também nenhum grande rearranjo (delecção ou duplicação) no gene *LDLR* foi detectado por MLPA. Nestes indivíduos, os níveis elevados de CT podem resultar de alterações noutros genes ainda não identificados mas que possam de algum modo estar envolvidos no metabolismo lipídico ou apresentarem hipercolesterolemia de origem ambiental.

No total das 8 alterações encontradas (Tabela 7), 7 foram identificadas no gene *LDLR* e apenas 1 no gene *APOB*. Das 7 alterações encontradas no gene do receptor das LDL, 3 foram identificadas na população adulta enquanto as restantes 4 alterações e adicionalmente a alteração encontrada no gene *APOB* foram identificadas no grupo pediátrico.

Tabela 7 – Apresentação das Alterações Identificadas nos Casos-Índice Estudados.

Gene	Exão	c.DNA (HGVS)	Proteína (HGVS)	Domínio Funcional	Efeito a nível proteico			Referências
					PolyPhen	SIFT	SNPs3D	
<i>APOB</i>	26	c.10708G>A	p.R3527Q	Local de ligação	Prejudicial	Não tolerada	Deletéria	[39]
<i>LDLR</i>	4	c.369_370delTC	p.S123fsX6	Ligação ao ligando	n.a.	n.a.	n.a.	[87]
<i>LDLR</i>	4	c.619_639del21	p.G207_S213del	Ligação ao ligando	n.a.	n.a.	n.a.	[88]
<i>LDLR</i>	10	c.1417A>G	p.I473V	Precursor da EGF	Benigna	Tolerada	Não deletéria	Não descrita
<i>LDLR</i>	12	c.1830_1839delCTTGCCGT	p.L611_V613del	Precursor da EGF	n.a.	n.a.	n.a.	Não descrita
<i>LDLR</i>	13	c.1876G>A	p.E626K	Precursor da EGF	Benigna	Não tolerada	Não deletéria	[41]
<i>LDLR</i>	14	c.2077_2078delAA	p.K692VfsX23	Precursor da EGF	n.a.	n.a.	n.a.	[41]
<i>LDLR</i>	17	c.2397_2411del15	p.L799_L804del	Transmembranar	n.a.	n.a.	n.a.	Não descrita

Legenda: HGVS – Human Genetics Variation Society; n.a. – Não aplicável.

a) Alterações identificadas no Grupo Pediátrico

A única mutação encontrada no gene *APOB* (p.R3527Q) foi identificada no caso-índice 10100 (III:2) (Figura 6). Esta mutação já descrita [39] é a mutação causadora de FDB mais comum na Europa especialmente no centro europeu. Quando comparada com as mutações encontradas no gene *LDLR*, não origina um fenótipo tão agressivo uma vez que afecta o ligando do receptor (apoB) diminuindo em apenas 36% a afinidade da ligação ao receptor [89] e consequentemente a remoção das lipoproteínas plasmáticas.

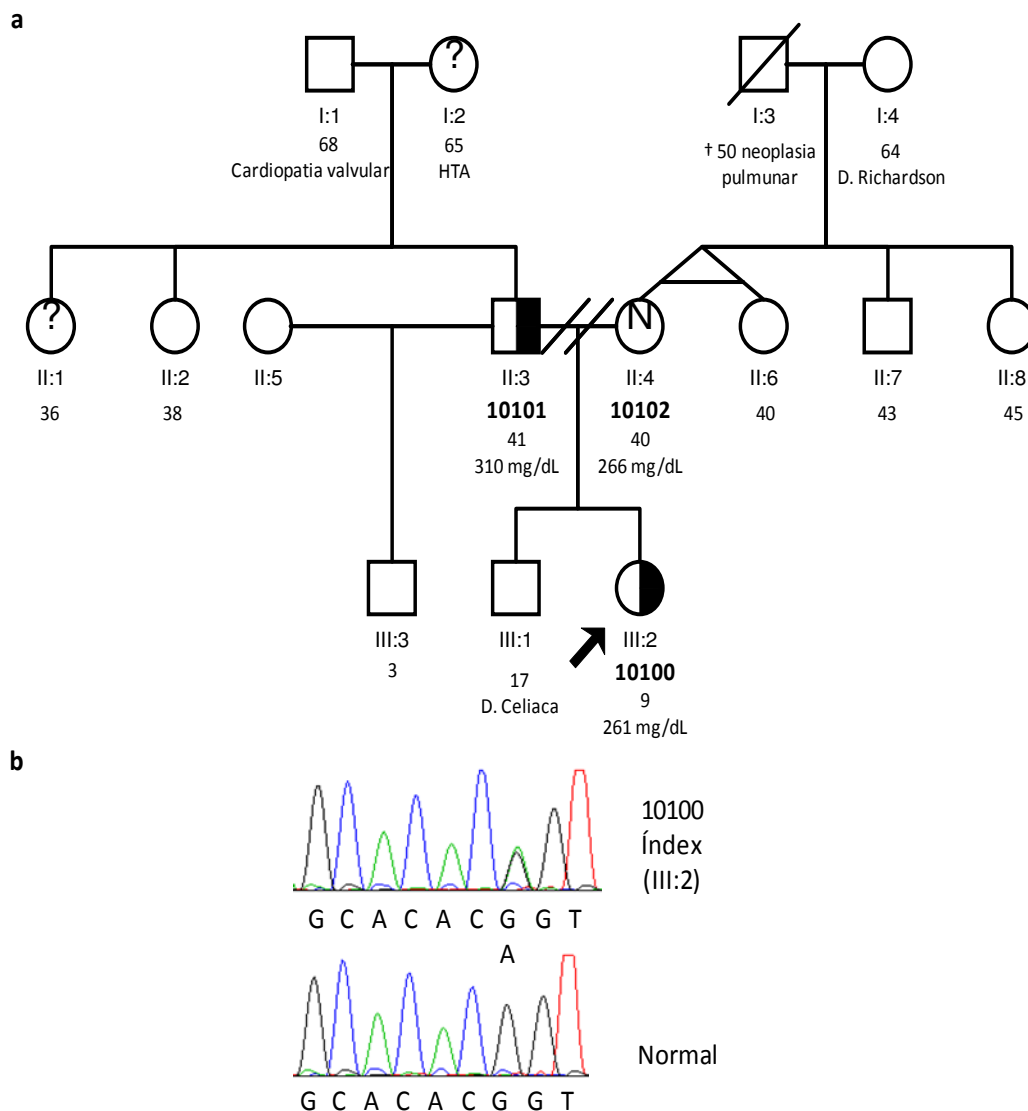


Figura 6 – Apresentação do caso-índice 10100.

a | Árvore genealógica da família. A seta indica o caso-índice. Por baixo do símbolo encontra-se o ID, a idade do índice (em anos) e os valores de colesterol antes de tratamento. O símbolo metade preto identifica o indivíduo heterozigótico para a mutação *missense* (p.R3527Q) e os símbolos com um N no interior identificam os indivíduos normolipidémicos. A letra D. é a abreviatura usada para a palavra doença **b** | Electroferograma de parte da sequência do exão 26 do gene da *APOB*, onde se poderá observar a mutação identificada no índice em comparação com uma sequência normal.

Esta mutação é conhecida por ter uma ampla distribuição geográfica na Europa apresentando desiguais distribuições. Actualmente, a percentagem de mutações no gene *APOB* identificadas em Portugal é de 2% [54] muito semelhante à encontrada noutros países da Europa mediterrânea, nomeadamente em Itália [90]. Todavia em países do centro da Europa como a Bélgica e Suíça, a frequência desta mutação é bastante mais elevada (8% e 12%, respectivamente) o que aponta para a existência de um nicho nesta zona da Europa, com descendência nos povos celtas (Helvetii) do período mesolítico [59, 91, 92]. A existência de barreiras como os Alpes e os Pirenéus é apontada por alguns investigadores como uma das possíveis explicações para a baixa frequência desta mutação nas populações do mediterrâneo [59]. Contudo em Espanha, há indícios da existência de nichos nas regiões de Valência e Galiza [61, 93]. Devido a proximidade com a Galiza, era de esperar que a região norte de Portugal apresentasse maior ocorrência desta mutação porém foi na região de Lisboa (1 caso-índice de Lisboa e outro de Setúbal) e na região centro (2 casos-índice de Leiria) que foram identificados os 4 casos-índice descritos em famílias do EPFH até ao momento [54]. Através do estudo familiar foi possível identificar um dos familiares do caso-índice (II:3 – Pai do índice) com a mesma mutação (p.R3527Q).

No gene *LDLR* foi encontrada uma mutação *missense* (p.E626K) no exão 13. Esta mutação identificada no caso-índice 10128 (II:2) e previamente descrita [41], provoca uma alteração de aminoácido significativa no domínio semelhante ao precursor da EGF – domínio importante no posicionamento da proteína durante a ligação ao ligando e na dissociação do receptor em meio ácido. A análise *in silico* (Tabela 6) não revela concordância relativamente ao efeito que esta mutação possa ter na proteína. Esta discordância também reflecte a diferença de valores de CT e LDL apresentados pelo caso-índice quando referenciado ao estudo (284 e 191 mg/dL, respectivamente) e presentemente (220 e 159 mg/dL, respectivamente), tendo em conta que este não se encontra nem medicado nem em dieta. O estudo familiar (Figura 7) revelou que a mutação não co-segrega na família A mutação foi identificada no familiar do sexo feminino (I:2 – Mãe do índice) quando se previa que o caso-índice herdasse a mutação do Pai (I:1) uma vez que este apresenta valores de hipercolesterolemia (CT=179 mg/dL em terapia combinada – estatina e ezetimiba) em contraste com a Mãe (I:2).

Uma vez que não foram realizados estudos funcionais nada se pode aferir acerca da patogenicidade desta mutação e quanto à causa de doença nesta família. Contudo e

com o objectivo de verificar os resultados obtidos iremos interceder junto do médico assistente a fim de solicitar novas amostras de sangue.

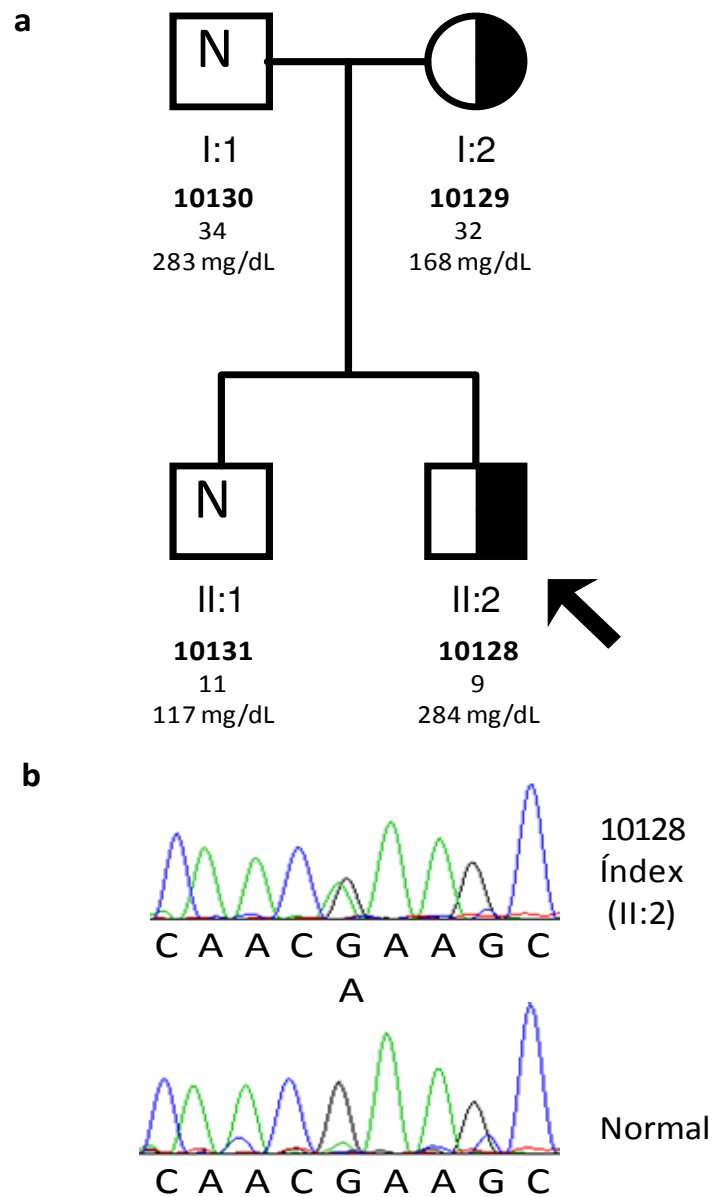


Figura 7 – Apresentação do caso-índice 10128.

a | Árvore genealógica da família. A seta indica o caso-índice. Por baixo do símbolo encontra-se o ID, a idade do índice (em anos) e os valores de colesterol antes de tratamento. O símbolo metade preto identifica o indivíduo heterozigótico para a mutação *missense* (p.E626K) e os símbolos com um N no interior identificam os indivíduos normolipidémicos. **b** | Electroferograma de parte da sequência do exão 13 do gene da *LDLR*, onde se poderá observar a mutação identificada no caso-índice em comparação com uma sequência normal.

Durante o estudo genético foram identificadas duas pequenas deleções (uma ainda não descrita) em indivíduos distintos, ambos com 16 anos e do sexo masculino.

A deleção de 9 pb encontrada no exão 12 (p.L611_V613del) do gene *LDLR* é uma mutação descrita pela primeira vez na população portuguesa. Esta mutação *in frame* (Figura 8) identificada no caso-índice 10106 (III:1) resulta na deleção de 3 aa na sequência proteica originando uma proteína mais pequena. Infelizmente não foi possível realizar o estudo familiar a uma vez que não foram referenciadas ao estudo amostras.

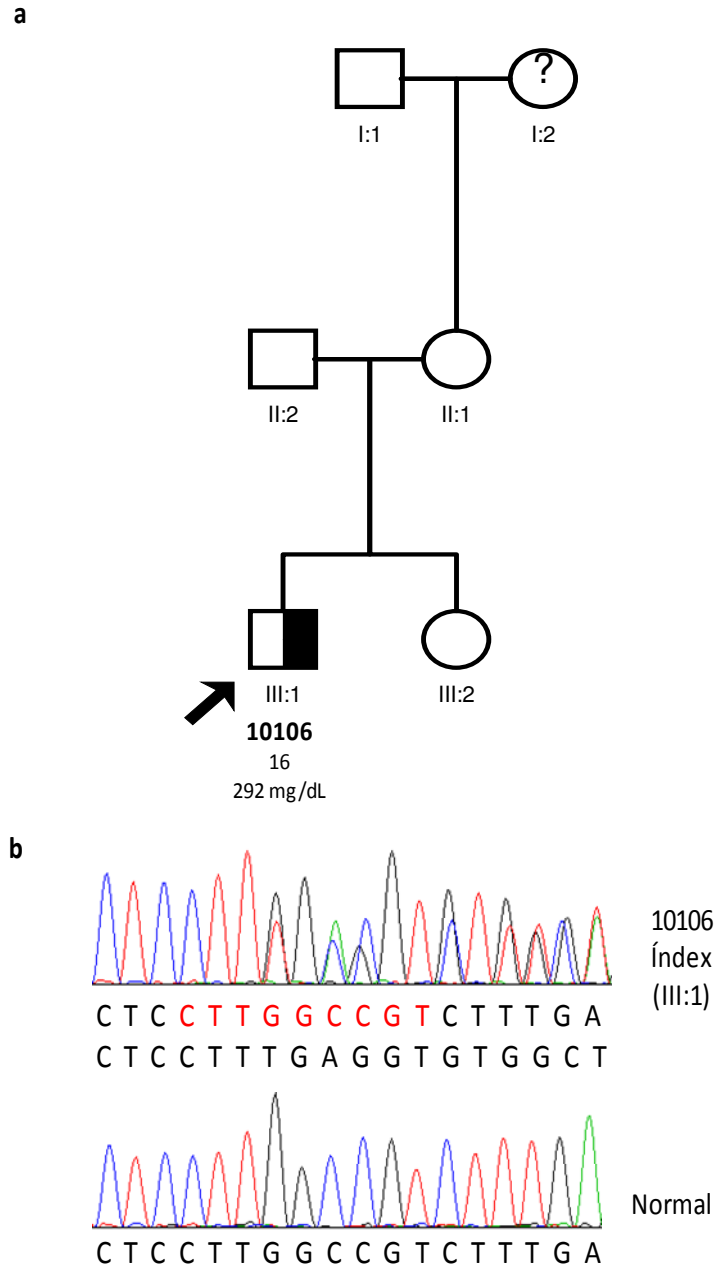


Figura 8 – Apresentação do caso-índice 10106.

a | Árvore genealógica da família. A seta indica o caso-índice. Por baixo do símbolo encontra-se o ID, a idade do índice (em anos) e os valores de colesterol antes de tratamento. O símbolo metade preto identifica o indivíduo heterozigótico para a mutação de *frameshift* (p.L611_V613del) **b** | Electroferograma de parte da sequência do exão 12 onde se poderá observar a deleção identificada no índice em comparação com uma sequência normal. A vermelho encontra-se os 9 pares de base (pb) delectados.

A pequena deleção de 2 pb (p.S123fsX6) encontrada no exão 4 do gene *LDLR* foi identificada neste estudo pela primeira vez. A mutação identificada no caso-índice 29257 (III:1) encontra-se apenas descrita em indivíduos de etnia africana oriundos da África do Sul [87]. O indivíduo português (Figura 9) identificado com esta mutação é de etnia caucasiana porém e devido às limitações na informação obtida não se conseguiu saber se este doente possui ou não antepassados de etnia africana. Esta mutação de *frameshift* leva à alteração da grelha de leitura produzindo um codão *stop* prematuro (6 aa depois da deleção), levando a uma proteína não funcional.

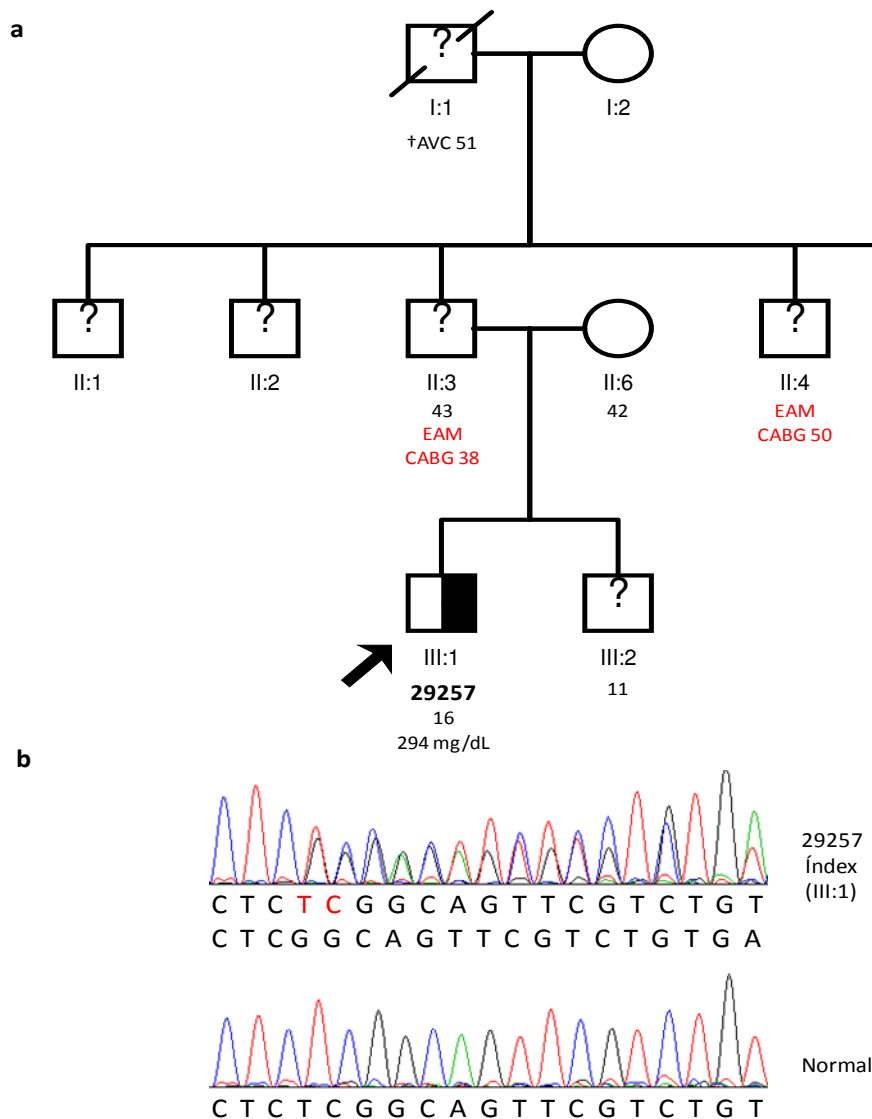


Figura 9 – Apresentação do caso-índice 29257.

a | Árvore genealógica da família. A seta indica o caso-índice. Por baixo do símbolo encontra-se o ID, a idade do índice (em anos) e os valores de colesterol antes de tratamento. O símbolo metade preto identifica o indivíduo heterozigótico para a mutação de *frameshift* (p.S123fsX6) (EAM – Enfarte de Miocárdio; CABG – Cirurgia de Revascularização do Miocárdio.) **b** | Electroferograma de parte da sequência do exão 4 onde se poderá observar a pequena deleção identificada no índice em comparação com uma sequência normal. A vermelho encontra-se os 2 pares de base (pb) delectados.

Este doente apresenta história familiar de DCV no lado paterno, nomeadamente o Pai (II:3) e um dos Tios (II:4). Ambos os familiares sofreram enfarte de miocárdio e foram submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio (CABG, *Coronary Artery Bypass Graft Surgery*) aos 38 e 50 anos, respectivamente. Para além disso, o Avô paterno do índice (I:1) faleceu com um AVC (Acidente Vascular Cerebral) aos 51 anos de idade. Infelizmente não foi possível confirmar com os familiares a mutação de *frameshift* contudo é de extrema importância que o estudo genético da família possa ser realizado para assim se poder diagnosticar com mais precisão os familiares e tomar medidas preventivas para reduzir o risco de DCV.

A última alteração encontrada neste grupo foi identificada no caso-índice 29292 (III:2) com história familiar de DCV. Trata-se de uma alteração *missense* encontrada no exão 10 do gene *LDLR* que tem como consequência a substituição de uma base no DNA por outra – GTC por ATC. A nível proteico traduz-se na substituição de uma Isoleucina por uma Valina (p.I473V). Ambos os aminoácidos apresentam radicais de hidrocarbonetos apolares (alifáticos), não afectando significativamente a proteína todavia está descrito que mutações sinónimas podem afectar o processo de *splicing* do mRNA [94], daí que esta alteração tenha suscitado interesse.

Cotton e Scriver (1998) consideram que para que uma alteração possa ser considerada mutação e não polimorfismo (1) a alteração de aminoácido deve ser significativa, (2) o domínio da proteína deve ser conservado, (3) o aminoácido afectado deve ser conservado entre espécies, (4) a alteração não deve possuir uma prevalência superior a 1% e (5) devem ser realizados estudos de funcionais a fim de confirmar se tal alteração interfere com o fenótipo. Os autores consideram ainda que, se a alteração for correctamente analisada através de estudos de expressão *in vitro*, os critérios acima mencionados tornam-se redundantes [95].

Tendo em conta a análise dos critérios definidos por Cotton e Scriver (1998) verificou-se que a alteração de aminoácido não é significativa (Ile → Val) conforme já mencionado, e que o aminoácido não se encontra conservado entre espécies. O domínio da proteína (domínio II – homólogo ao precursor da EGF) que esta alteração afecta é conservado sendo importante no posicionamento da proteína durante a ligação ao ligando e na dissociação do receptor em meio ácido. A fim de analisar a prevalência desta alteração (p.I473V) foi verificada a sua presença num painel de 100 indivíduos normolipidemicos – indivíduos com um perfil lipídico normal (Anexo E) através da metodologia de RFLP.

O padrão do tamanho dos fragmentos dos indivíduos com a alteração será diferente do padrão apresentado pelos indivíduos sem a alteração. Assim, para os indivíduos que possuem a alteração espera-se que a enzima corte o alelo alterado em dois locais distintos formando 3 fragmentos de tamanhos 170 pb, 119 pb e 113 pb, enquanto para os indivíduos sem a alteração isto é com 2 alelos normais, apenas será de esperar 2 fragmentos distintos com 232 pb e 170 pb de tamanho. A análise dos produtos da digestão enzimática (Figura 10) confirmou que apenas o caso-índice (III:2) e os 2 dos familiares (II:2 – Pai e III:1 – Irmão) previamente identificados por sequenciação, apresentavam a alteração. Assim como a Mãe do índice (II:3) também nenhum dos 100 indivíduos normolipidemicos apresentou a alteração.

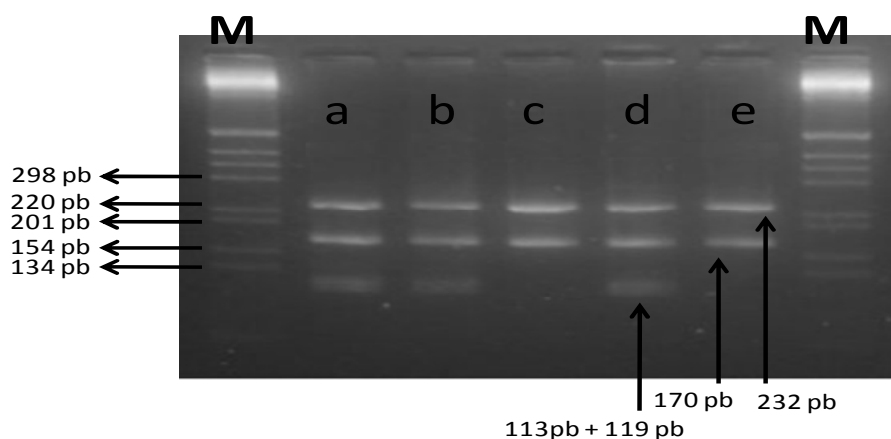


Figura 10 – Separação electroforética dos fragmentos de DNA obtidos por digestão enzimática, num gel de agarose de 3%.

M | Marcador 1 Kb (Invitrogen) **a** | Caso-índice 29292* **b** | Familiar 29293* **c** | Familiar 29294 **d** | Familiar 29295* **e** | amostra de um indivíduo normolipidemicos onde se pode observar a existência de dois alelos normais. *Observa-se a existência de 4 fragmentos sendo que, não foi possível separar os 2 fragmentos com apenas 6 pb de diferença (119 e 113 bp).

O auxílio de programas bio-informáticos disponíveis *online* como o PolyPhen, SIFT e SNPs3D [<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>, <http://www.bork.embl-heidelberg.de/PolyPhen> e www.snps3d.org/], permitiu prever o efeito desta alteração na proteína (Tabela 6). A análise *in silico* concluiu que a alteração não é patogénica sugerindo que a alteração (p.I473V) não é causadora de doença. Aquando a realização do estudo familiar, a alteração foi identificada em 2 dos 3 familiares (II:2 – Pai e III:1 – Irmão) recebidos para estudo (Figura 11). Verificou-se ainda que esta alteração não co-segrega na família uma vez que o Irmão do caso-índice (III:1) com 16 anos de idade, não apresenta critérios de FH (CT=203 mg/dL e LDL=127 mg/dL).

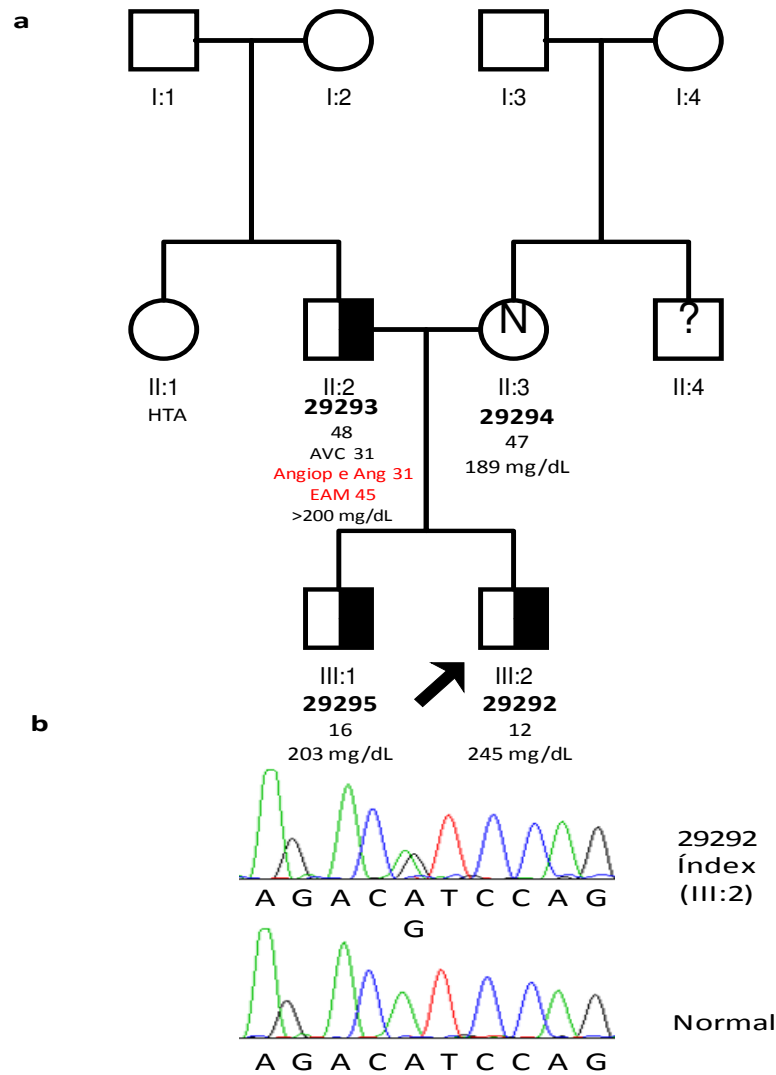


Figura 11 – Apresentação do caso-index 29292.

a | Árvore genealógica da família. A seta indica o caso-index. Por baixo do símbolo encontra-se o ID, a idade (em anos) e os valores de colesterol apresentados antes de tratamento. O símbolo metade preto identifica indivíduos heterozigóticos para a mutação de *missense* (p.I473V) e os símbolos com um N no interior identificam os indivíduos normolipidêmicos (AVC – Acidente Vascular Cerebral Ang – Angina de Peito; Angiop – Angioplastia; EAM – Enfarte de Miocárdio) **b** | Electroferograma de parte da sequência do exão 10 onde se poderá observar a mutação identificada no índice em comparação com uma sequência normal.

Salienta-se que não foi encontrada nenhuma outra mutação quer no gene *LDLR* quer no gene *APOB* e como esta alteração ainda não está descrita serão realizados posteriormente estudos de expressão do receptor das LDL. Para avaliar os níveis de expressão do LDLR à superfície e consequentemente o efeito desta alteração vai-se realizar estudos de expressão em sistemas heterólogos *in vitro*. A expressão desta alteração será feita em células CHO IdIA7 – sem expressão endógena do receptor das LDL e determinado os níveis de *uptake* (ligação e internalização) e degradação do LDL

marcado radioactivamente com ^{125}I . Posteriormente são analisados os níveis de LDLR à superfície das células transfectadas, por imunocitoquímica.

b) Alterações identificadas no Grupo dos Adultos

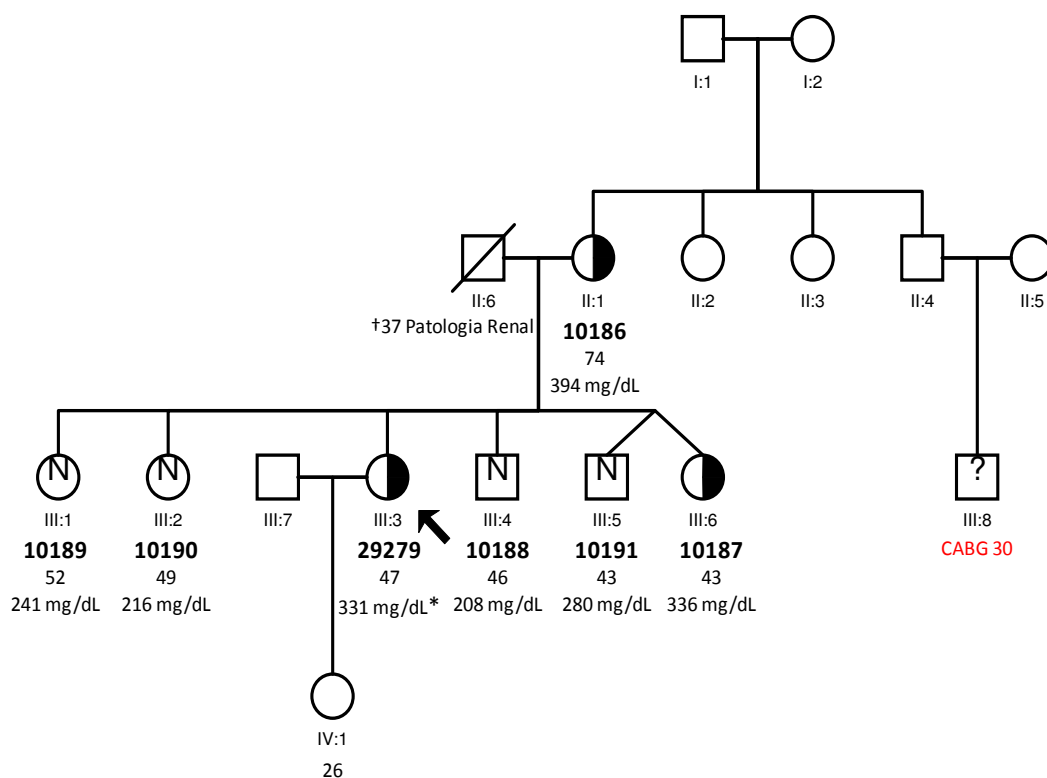
Nos 13 adultos foram identificadas 3 pequenas deleções no gene *LDLR* – 2 descritas anteriormente e 1 mutação nunca antes descrita.

A mutação de *frameshift* identificada no exão 4 (p.G207_S213del21) do gene *LDLR* do caso-índice 29279 (III:3) foi previamente descrita noutros 2 indivíduos do EPFH [54, 94]. Esta mutação encontra-se apenas na população portuguesa e em indivíduos com origem geográfica na região norte do País (Porto, Famalicão e Guimarães) indicando fortemente a presença de um antepassado em comum e/ou efeito fundador nesta região do País. Há que salientar que a Mãe do índice (II:1) é natural de Famalicão o que dá mais ênfase à possível proximidade das 3 famílias identificadas até agora. Esta possibilidade é meramente especulativa mas ao ser confirmada a existência de um nicho nesta região do País seria a primeira vez, tendo em conta esta doença genética.

Esta mutação *in frame* origina a eliminação de 7 aa do domínio de ligação ao ligando, traduzindo-se uma proteína mais pequena. O estudo familiar (Figura 12) permitiu a identificação de 2 indivíduos (II:1 – Mãe e III:6 – Irmã) sendo os restantes 4 familiares estudados, normais. Tal como o caso-índice, também a Mãe (II:1) e a irmã (III:6) encontram-se medicadas com uma estatina todavia tomam de forma irregular, o que se reflecte nos valores bioquímicos apresentados. O motivo pelo qual estes familiares não tomam a medicação de forma regular não é conhecido porém, esta situação é verificada com regularidade nos doentes do EPFH [54]. O motivo mais frequentemente relatado é o elevado custo deste tipo de medicação todavia, o desconhecimento por parte dos doentes do elevado risco de DCV a que estão sujeitos é um outro motivo.

Seria importante estudar a Filha do índice (IV:1), o Primo (III:8) – porque já teve um episódio de DCV e o Pai deste (II:4) – Tio do caso-índice, uma vez que há a possibilidade de também eles terem herdado a mutação. Neste sentido, iremos interceder junto do médico assistente para apelar à participação dos familiares mencionados, sempre salvaguardando a vontade do mesmo.

a



b

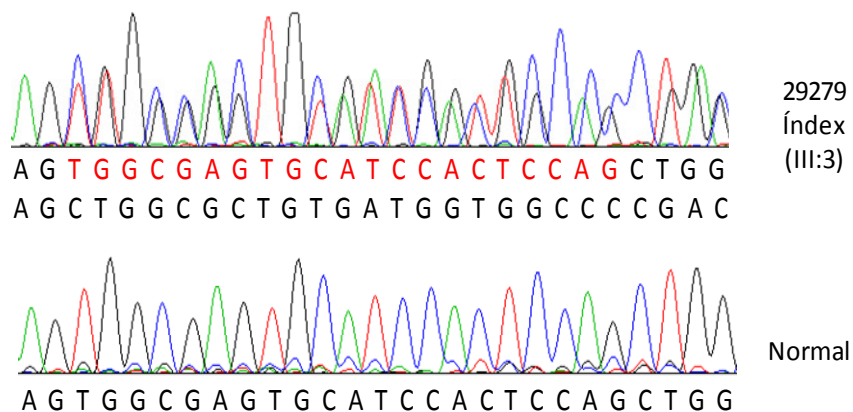


Figura 12 – Apresentação do caso-index 29279.

a | Árvore genealógica da família. A seta indica o caso-index. Por baixo do símbolo encontra-se o ID, a idade (em anos) e os valores de colesterol antes de tratamento, excepto para o caso-index (*) o qual apresenta valores em tratamento. O símbolo metade preto identifica indivíduos heterozigóticos para a mutação de *frameshift* (p.G207_S213del) e os símbolos com um N no interior identificam os indivíduos normolipidémicos (CABG – Cirurgia de Revascularização do Miocárdio) **b** | Electroferograma de parte da sequência do exão 4 onde se poderá observar a mutação identificada no index em comparação com uma sequência normal. A vermelho encontra-se os 21 pares de bases (bp) delectados.

Uma outra mutação de *frameshift*, com a deleção de 2 pb foi identificada no exão 14 do gene *LDLR* (p.K692VfsX23). Esta mutação identificada no índice 10083 (II:1) leva à alteração da grelha de leitura e a produção de um codão *stop* prematuro, originando uma proteína truncada e portanto não funcional (Figura 13). Este tipo de mutações origina fenótipos mais severos em comparação com as mutações *in frame*.

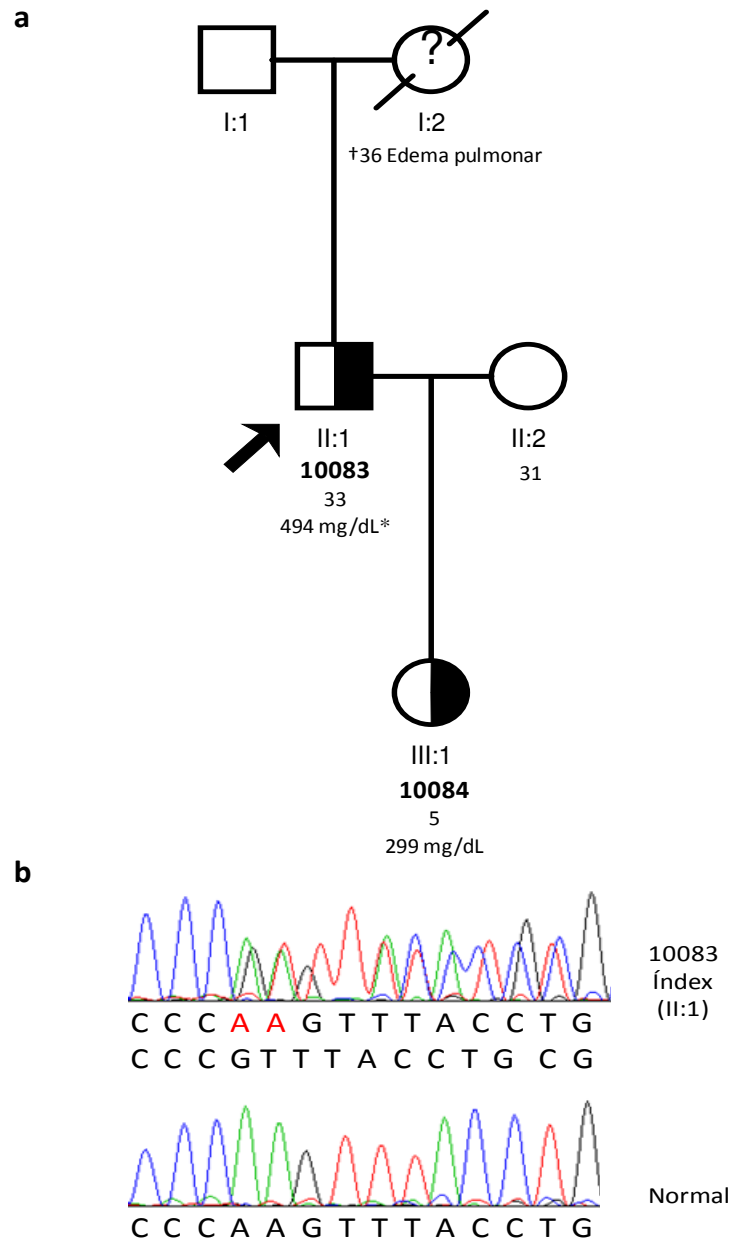


Figura 13 – Apresentação do caso-índice 10083.

a | Árvore genealógica da família. A seta indica o caso-índice. Por baixo do símbolo encontra-se o ID, a idade (em anos) e os valores de colesterol antes de tratamento excepto para o caso-índice (*) o qual apresenta valores em tratamento. O símbolo metade preto identifica indivíduos heterozigóticos para a mutação de *frameshift* (p.K692VfsX23). **b** | Electroferograma de parte da sequência do exão 14 onde se poderá observar a mutação identificada no índice em comparação com uma sequência normal. A vermelho encontra-se os 2 pares de bases (bp) delectados.

Esta mutação já se encontra identificada e descrita [41] tendo também já sido identificada em Portugal noutras 2 famílias do EPFH, naturais do Alentejo e Centro do País [54]. O estudo familiar conduziu à identificação da Filha do caso-índice (III:1) de apenas 5 anos de idade. O diagnóstico precoce vai ajudar na mudança do estilo de vida desta criança/família e permitir o ajuste dos valores lipídicos com terapêutica farmacológica normalmente resinas, logo após a menarca. Estas mudanças para além de proporcionarem uma melhoria na qualidade de vida vão também, possibilitar a redução do risco cardiovascular desta criança. O caso-índice encontra-se medicado (estatina e ezetimiba) todavia os valores de CT (494 mg/dL) e LDL (429 mg/dL) apresentados pelo mesmo são bastante elevados o que sugere que muito provavelmente este doente ou não cumpre com a terapêutica prescrita ou esta necessita de ser ajustada.

A última mutação *in frame* (Figura 14) foi identificada no exão 17 do gene *LDLR*. (p.L799_L804del) do caso-índice 10028 (II:5), sendo uma mutação ainda não descrita. Trata-se de uma pequena deleção que origina a deslocação do quadro de leitura em 15 pb levando à eliminação de 5 aa na sequência proteica, traduzindo-se numa proteína mais pequena. O estudo familiar (Figura 14) levou à identificação da Filha do caso-índice (III:4) de 11 anos de idade, contudo seria importante estudar também a Mãe (I:2) os Irmãos do caso-índice nomeadamente o Irmão (II:1) que aos 49 anos fez a cirurgia de revascularização do miocárdio.

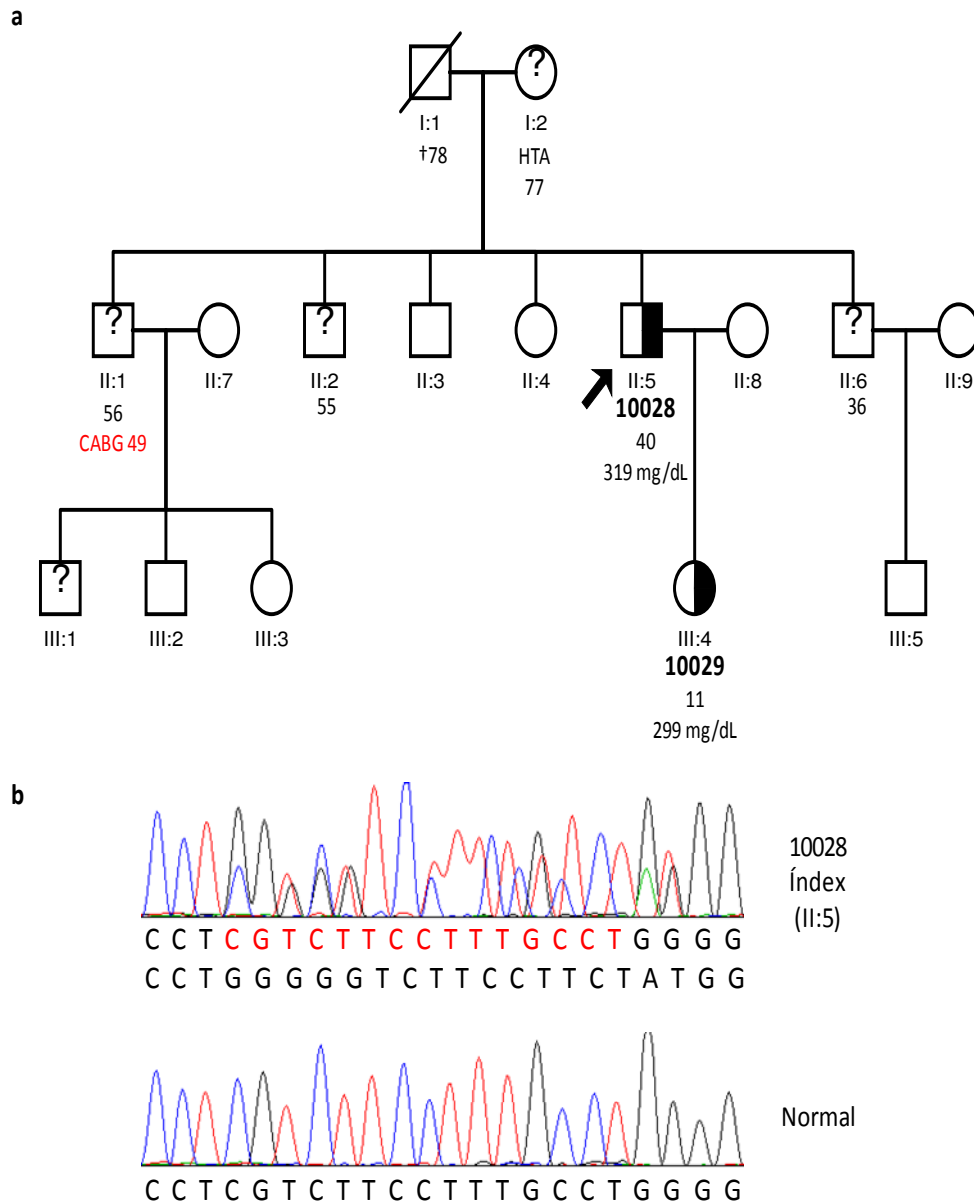


Figura 14 – Apresentação do caso-índice 10028.

a] Árvore genealógica da família. A seta indica o caso-índice. Por baixo do símbolo encontra-se o ID, a idade (em anos) e os valores de colesterol antes de tratamento. O símbolo metade preto identifica indivíduos heterozigóticos para a mutação de *frameshift* (p.L799_L804del). (CABG – Cirurgia de Revascularização do Miocárdio) **b**] Electroferograma de parte da sequência do exão 17 onde se poderá observar a mutação identificada no caso-índice em comparação com uma sequência normal. A vermelho encontra-se os 15 pares de bases (bp) delectados.

4.3 Análise dos Genótipos da APOE

Neste estudo foi ainda determinada a frequência dos alelos e respectivos genótipos dos polimorfismos existente no gene *APOE* em toda a população estudada. Estudos revelam que o genótipo da *APOE* influencia os valores de LDL, HDL e TG causando uma variabilidade em cerca de 20% no perfil lipídico dos indivíduos com diagnóstico clínico de FH [96]. Como esperado, o alelo $\epsilon 3$ com uma frequência de 85,2%, foi o mais comum em ambos os grupos estudados. Estes resultados estão de acordo com o descrito no projecto ApoEuropa, que contou com a participação de Portugal [14]. A distribuição da frequência dos genótipos pode ser observada na Tabela 8.

Tabela 8 – Distribuição dos genótipos da APOE em ambos os Grupos Estudados.

	Grupo Pediátrico			Grupo de Adultos		
Genótipo	E3/E3	E3/E4	Total	E3/E3	E3/E4	Total
Frequência	12	5	17	7	3	10
Percentagem (%)	70,6	29,4	100	70,0	30,0	100

Os valores de CT e c-LDL para as 12 crianças homozigóticas para o alelo $\epsilon 3$ foram de $248,5 \pm 27,0$ mg/dL e $172,8 \pm 26,9$ mg/dL, respectivamente. As restantes 5 crianças apresentaram valores de CT de $251,9 \pm 24,5$ mg/dL e c-LDL $175,5 \pm 32,9$ mg/dL. A análise estatística entre os valores de CT nas crianças com os 2 ou apenas 1 alelo $\epsilon 3$, não revelou qualquer diferença significativa ($p=0,79$). O mesmo sucedeu para os valores de LDL ($p=0,94$). Relativamente à população adulta verifica-se que os valores de CT para os indivíduos com os 2 alelos $\epsilon 3$ foram de $299,4 \pm 13,7$ mg/dL e para os indivíduos com apenas um alelo $\epsilon 3$ foi de $329,5 \pm 29,0$ mg/dL. As diferenças nos valores de colesterol LDL apresentados por este grupo foram respectivamente de $219,3 \pm 19$ mg/dL e 216 mg/dL. É de salientar que apenas se sabe o valor de c-LDL de um dos indivíduos adultos com o genótipo E3/E4. Devido à reduzida amostra neste grupo não foi possível estabelecer nenhuma relação entre as diferentes variáveis. Também devido a este facto, não foi possível estabelecer qualquer comparação entre os indivíduos de ambos os grupos, que possuem o alelo $\epsilon 4$ e mutação num dos genes estudados e os que apesar de apresentarem um alelo $\epsilon 4$ não possuem qualquer mutação. Aliás, o reduzido número de casos-índice estudados é sem dúvida, uma grande limitação deste trabalho.

4.4 Diagnóstico Molecular Versus Caracterização Bioquímica

Do total de 34 indivíduos naturais da região norte e centro de Portugal referenciados ao estudo, 7 (4 crianças e 3 adultos) não preenchem os critérios clínicos de FH. Duas das crianças sem critérios (caso-índice 10116 e 10118) apresentam excesso de peso, o que reforça a ideia de que neste caso os valores elevados de CT e LDL terão uma forte componente ambiental. Os 3 adultos sem critérios apresentam valores de CT ($264,7 \pm 20,8$ mg/dL) e LDL ($156,5 \pm 3,5$ mg/dL) abaixo dos valores estabelecidos pelos critérios adoptados neste estudo (ver Tabela 4 no ponto 3.1). Nenhum destes indivíduos adultos apresenta DCV prematura.

Foi identificada a causa genética para a hipercolesterolemia em 29,6% dos indivíduos com diagnóstico clínico de FH, contudo muito abaixo dos 43% referenciados na última publicação do EPFH [54]. Há que realçar que nenhum dos indivíduos sem critérios e portanto excluídos do estudo apresentavam causa genética de FH, indicando que os critérios definidos neste trabalho são os adequados. Salienta-se que o estudo molecular ainda não está completo, uma vez que falta a 3ª fase – estudo de mutações no gene *PCSK9*. Todavia, num total de 359 indivíduos referenciados ao EPFH e com o estudo molecular completo, apenas foram identificados 2 casos-índice com mutação neste gene [54], logo a probabilidade de se encontrar qualquer mutação nos restantes 19 casos-índice deste estudo não identificados molecularmente, é muito reduzida.

Comparando o perfil lipídico dos indivíduos com e sem mutação, verificaram-se diferenças significativas em alguns parâmetros bioquímicos, quer no grupo pediátrico quer na população adulta.

No grupo Pediátrico (Tabela 9) salienta-se diferenças estatisticamente significativas entre os valores de colesterol total ($p=0,015$) e LDL ($p=0,011$) antes de tratamento, contrariamente ao verificado com os valores de HDL ($p=0,089$) e TG ($p=0,310$). Os resultados obtidos poderão indicar que nos indivíduos não identificados com qualquer mutação no gene do *LDLR* ou *APOB*, a hipercolesterolemia tende a ter origem ambiental. Das 5 crianças identificadas geneticamente apenas uma (caso-índice 10100) se encontra medicada com estatina. O perfil lipídico desta criança ainda não se encontra dentro do considerado desejável [1], contudo também não existe informação sobre há quanto tempo está medicada e se o faz conforme recomendação médica. Nos

restantes parâmetros bioquímicos não foi possível efectuar qualquer relação estatística tendo em conta a reduzida amostra.

Tabela 9 – Comparação dos Parâmetros Bioquímicos nos Indivíduos do Grupo Pediátrico, Com e Sem Mutação.

		Com Mutação			Sem Mutação			p
		Média	n	DP	Média	n	DP	
CT (mg/dL)	<i>antes trat</i>	275,2	5	21,4	238,7	12	18,9	0,015 ^a
	<i>em trat</i>	220,0	1	n.a.	210,0	2	24,0	n.a.
LDL (mg/dL)	<i>antes trat</i>	203,5	4	21,9	160,6	9	19,0	0,011 ^a
	<i>em trat</i>	156,0	1	n.a.	127,0	2	24,0	n.a.
HDL (mg/dL)	<i>antes trat</i>	47,8	4	8,5	58,1	11	13,0	0,089 ^a
	<i>em trat</i>	55,0	1	n.a.	54,5	2	14,8	n.a.
TG (mg/dL)	<i>antes trat</i>	101,3	3	19,6	97,6	10	56,3	0,310 ^a
	<i>em trat</i>	36,0	1	n.a.	54,5	2	14,8	n.a.
ApoA1 (mg/dL)	<i>em trat</i>	136,0	1	n.a.	189,5	2	21,9	n.a.
ApoB (mg/dL)	<i>em trat</i>	95,0	1	n.a.	123,5	2	84,1	n.a.
Lp(a) (mg/dL)	<i>em trat</i>	8,0	1	n.a.	44,0	2	50,9	n.a.

Legenda: *antes trat* – valores antes de tratamento, *em trat* – valores em tratamento, DP – Desvio Padrão; n.a. – não aplicável; ^a Teste Mann-Whitney.

Relativamente à população adulta (Tabela 10) verificou-se diferenças estatisticamente significativas nos valores de CT ($p=0,020$), LDL ($p=0,020$) e apoB ($p=0,020$) após tratamento. Uma vez que mutações no gene *LDLR* originam fenótipos mais agressivos era de esperar as diferenças observadas nos valores de CT e LDL. Além disso, os 3 adultos identificados geneticamente apresentam mutações de *frameshift* as quais estão relacionadas com fenótipos mais agressivos e consequentemente com perfis lipídicos mais acentuados nomeadamente c-LDL, do que nos indivíduos afectados com mutações *missense* [97]. Visto a apoB ser o único ligando das LDL era expectável obter-se esta diferença estatística. Interessantemente, foram ainda verificadas diferenças significativas nos valores de HDL ($p=0,039$), após tratamento. O HDL possui um possível efeito protector na parede arterial nomeadamente no processo aterosclerótico, daí que a terapêutica farmacológica também aumente ligeiramente a sua concentração. Neste sentido e apesar de c-HDL não ser considerado um alvo terapêutico, existe um acordo generalizado de que o risco cardiovascular aumenta quando os seus níveis se encontram abaixo de 40 mg/dL [69].

Os valores de TG, ($p=0,302$) ApoA1 ($p=0,243$) e Lp(a) ($p=0,439$) não apresentaram diferenças significativas. Devido ao tamanho da amostra, não foi impossível estabelecer qualquer relação estatística com os parâmetros bioquímicos obtidos antes de tratamento, dos indivíduos com e sem mutação.

Tabela 10 – Comparação dos Parâmetros Bioquímicos nos Indivíduos do Grupo de Adultos, Com e Sem Mutação.

		Com Mutação			Sem Mutação			p
		Média	n	DP	Média	n	DP	
CT (mg/dL)	<i>antes trat</i>	319,0	1	n.a.	306,2	6	23,4	n.a.
	<i>em trat</i>	350,3	3	135,0	181,2	6	17,0	0,020 ^a
LDL (mg/dL)	<i>antes trat</i>	238,0	1	n.a.	212,0	3	10,6	n.a.
	<i>em trat</i>	289,7	3	129,1	109,8	6	13,3	0,020 ^a
HDL (mg/dL)	<i>antes trat</i>	37,0	1	n.a.	64,4	3	3,9	n.a.
	<i>em trat</i>	40,3	3	8,3	55,3	6	10,3	0,039 ^a
TG (mg/dL)	<i>antes trat</i>	220,0	1	n.a.	118,0	3	20,0	n.a.
	<i>em trat</i>	135,3	3	51,9	94,8	6	28,3	0,302 ^a
ApoA1 (mg/dL)	<i>em trat</i>	151,7	3	18,2	164,5	6	14,3	0,243 ^a
ApoB (mg/dL)	<i>em trat</i>	168,7	3	54,8	73,0	6	6,5	0,020 ^a
Lp(a) (mg/dL)	<i>em trat</i>	48,3	3	18,9	106,5	6	83,2	0,439 ^a

Legenda: *antes trat* – valores antes de tratamento, *em trat* – valores em tratamento, DP – Desvio Padrão; n.a. – não aplicável; ^aTeste Mann-Whitney.

Nos indivíduos adultos com mutação observa-se que os valores de CT antes de iniciaram tratamento (319 mg/dL) são inferiores aos observados após tratamento (350,3 mg/dL). Há que salientar, que apenas se obteve informação dos valores bioquímicos antes de tratamento em 1 (caso-índice 10028) dos 3 indivíduos com mutação. Os 2 restantes indivíduos, identificados geneticamente com mutações no gene *LDLR* apresentam valores de CT e LDL após tratamento bastante elevados. Considerando que ambos se encontram medicados pode-se afirmar que estes valores influenciaram os dados obtidos. Muito provavelmente estes 2 indivíduos (caso-índice 29279 e 10084) não cumprem com a terapêutica prescrita ou apresentam polimorfismos genéticos os quais interferem com a terapêutica determinando dificuldades na sua captação, metabolização e eliminação [69]. Porém e caso seja determinado que estes não cumprem com a medicação, será importante alertar estes indivíduos de que é impreterível haver uma mudança de comportamento uma vez que apresentam elevado risco cardiovascular.

5. Conclusão

Numa amostra de 34 casos-índice naturais da região norte e centros do País referenciados ao EPFH, 7 (20,6%) não preenchiam os critérios de inclusão. Apesar de estudados, os dados bioquímicos e moleculares destes indivíduos não foram considerados para análise

Dos 27 casos-índice estudados, 21 são naturais da região norte e os restantes 6 indivíduos são naturais da região centro do País. Desses, 63% são crianças (≤ 16 anos) o que poderá reflectir a maior atenção dos clínicos para com esta problemática mundial.

A análise das características clínicas demonstrou que 76,5% das crianças pratica exercício físico regular o que reforça a importância da actividade física escolar. Verificou-se a ocorrência de DCV prematura ($42,5 \pm 4,9$ anos) em 2 dos indivíduos adultos, característica de indivíduos com diagnóstico clínico de FH. A diabetes e o tabagismo – factores de risco cardiovascular, foram apresentados por 22,3% e 44,4% da população adulta, respectivamente. Os valores de CT e LDL apresentados pelo grupo pediátrico ($9,5 \pm 4,0$ anos) foram de $249,4 \pm 25,6$ mg/dL e $173,8 \pm 28,0$ mg/dL, respectivamente. Para o grupo dos adultos ($45,8 \pm 9,0$ anos) estes valores foram de $308,0 \pm 21,9$ mg/dL e $218,5 \pm 15,6$ mg/dL, respectivamente. Ambos os grupos apresentam valores acima dos recomendados pela Sociedade Europeia de Cardiologia [1].

Neste trabalho foi ainda determinada a frequência de alelos e os diferentes genótipos apresentados pelo gene *APOE*. Apenas 2 dos 6 possíveis genótipo foram identificados – E3/E3 e E3/E4, sendo o genótipo E3/E3 o mais comum em ambos os grupos estudados. Como esperado [14] o alelo $\epsilon 3$ foi o mais frequente (85,2%). A presença do alelo $\epsilon 4$ poderá justificar o aumento dos valores de CT e LDL em indivíduos com diagnóstico clínico de FH e sem mutação num dos genes estudados, uma vez a maior afinidade da apoE4 para o LDLR interfere na remoção das partículas de LDL do plasma, aumentando os níveis de c-LDL [7].

O estudo molecular determinou a causa genética de hipercolesterolemia familiar para 29,6% dos casos-índice. Através destes, foram identificados geneticamente 9 (56,3%) dos 16 familiares estudados. Nos restantes 19 casos-índice (70,4%) com diagnóstico clínico de FH não foi encontrada causa genética para a sua

hipercolesterolemia evidenciando-se que de facto, a variabilidade de fenótipo nos indivíduos com FH torna o diagnóstico clínico bastante difícil e ambíguo.

Os níveis elevados de colesterol nos 70,4% dos indivíduos em que não foi identificada qualquer mutação quer no gene *LDLR* e quer no gene *APOB*, podem resultar de alterações genéticas noutros genes ainda não identificados mas que podem estar envolvidos no metabolismo lipoproteico. O perfil lipídico destes indivíduos pode ainda estar sujeito a uma forte influência ambiental o que vai de encontro ao verificado por Alves *et al* (2010) que demonstrou que a caracterização clínica não é suficiente para distinguir entre indivíduos com dislipidemia genética e ambiental [98]. Esta observação é também sustentada pelos elevados valores de IMC apresentado pelos adultos ($26,8 \pm 6,3$), 2 dos quais apresentam obesidade grave ($34,6$ e $39,1 \text{ Kg/m}^2$) tendo em conta os valores de referência para a população Portuguesa [<http://www.min-saude.pt/portal/>]. Toda a população adulta (excepto um indivíduo do qual não se obteve informação) e 18,8% das crianças encontram-se com terapêutica farmacológica. Nas 5 crianças com FH confirmada, apenas 1 (caso-índice 10100) se encontra medicada e 2 (ambas com 16 anos) encontra-se em dieta todavia devem completar as medidas não farmacológicas com medicação de modo a reduzir o risco cardiovascular.

Em 8 indivíduos com diagnóstico clínico de FH foram identificadas 8 alterações distintas, 3 das quais ainda não descritas (p.I473V, p.L611_V613del e p.L799_L804del) e 1 unicamente descrita em Portugal (p.G207_S213del) [54, 88] mais concretamente em indivíduos provenientes da região norte do País. Das 3 alterações ainda não descritas fazem parte 2 mutações de *frameshift* (p.L611_V613del e p.L799_L804del) e uma alteração *missense* (p.I473V) da qual não há certeza quanto a sua patogenicidade. Neste caso em concreto e depois de ser concluído o estudo molecular do gene *PCSK9*, serão realizados estudos de expressão do receptor LDL os quais são essenciais em casos de diagnóstico incerto de FH. Este tipo de estudos funcionais permitem uma caracterização mais detalhada e precisa da causa genética da FH, assim como a avaliação da patogenicidade de mutações *missense* e a determinação da severidade do efeito das mesmas na expressão/função do *LDLR*.

Neste estudo não foram identificados por MLPA, grandes rearranjos de DNA (delecções ou duplicações), assim como também não foram identificadas outras mutações pontuais (p.A410T, p.D203N, p.R385W e p.S156L) muito comuns na população Portuguesa [54, 88].

A análise estatística ao perfil lipídico dos indivíduos de ambos os grupos com e sem mutação, revela diferenças significativas entre os valores de CT e LDL após tratamento porém, nada se pode aferir sobre os valores apresentados pelos mesmos antes de tratamento. A reduzida adesão ao EPHF de indivíduos da região norte e centro do País e de clínicos a exercerem nestas regiões e consequentemente o reduzido número de indivíduos estudados, foi a maior limitação deste trabalho.

A comparação efectuada aos valores de CT nos adultos identificados geneticamente revelou que 2/3 destes indivíduos muito provavelmente não seguem as recomendações médicas referentes à terapêutica. Esta observação é recorrente nos doentes participantes do EPHF sendo frequentemente mencionados 2 motivos: (1) o doente não está consciente do seu elevado risco cardiovascular ou (2) possui problemas sócio-económicos uma vez que este tipo de medicação é cara e nem toda é comparticipada pelo estado Português [54].

Em suma este trabalho evidência uma vez mais, a importância do diagnóstico precoce e da importância deste na prevenção cardiovascular. Viabiliza a introdução de medidas da terapêuticas as quais se têm mostrado eficazes na redução da morbilidade e mortalidade por DCV, mais precoces e/ou agressivas tanto nos casos-índice como nos familiares identificadas geneticamente. Reforça ainda a importância da adopção de estilos de vida mais saudáveis complementando a terapêutica farmacológica com a não farmacológica. Um dos principais benefícios do diagnóstico molecular da FH é a identificação de familiares (*cascade screening*) possibilitando orientação terapêutica e evitando mortes prematuras. Nas crianças, o diagnóstico precoce assume especial importância uma vez que vários factores de risco estão presentes desde a infância e persistem na idade adulta. Dá ainda a possibilidade a estas crianças de através do aconselhamento sobre estilos de vida e administração de terapêutica, terem uma esperança média de vida igual á um indivíduo saudável.

A implementação destas medidas vai certamente diminuir os custos com a saúde e otimizar os recursos mas essencialmente, vai permitir melhorar a qualidade de vida dos doentes e das respectivas famílias [54, 88, 98, 99].

6. Bibliografia

1. Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, Boysen G, Burell G, Cifkova R, Dallongeville J, De Backer G, Ebrahim S, Gjelsvik B *et al*: **European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary: Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (Constituted by representatives of nine societies and by invited experts)**. *Eur Heart J* 2007, **28**(19):2375-2414.
2. Bonney RC: **Cardiovascular disease: overview of a world pandemic**. *Eur Clin Lab* February 2004:18 -19.
3. Engler MB: **Nutrigenomics in cardiovascular disease: implications for the future**. *Prog Cardiovasc Nurs* 2009, **24**(4):190-195.
4. WHO: **Familial hypercholesterolaemia: report of a second WHO Consultation**. In: *Human Genetics DoNDP*. In: 1999; Geneve; 1999.
5. Rifai N, Bachorik PS, Albers JJ: **Lipoproteins and Apolipoproteins**. In: *Text Book of Clinical Chemistry*. Edited by Burtis C, Ashwood, E, 3rd edn. Philadelphia: WB Saunders & Co; 1999.
6. Myant NB: **The metabolic basis of familial hypercholesterolemia**. *Klin Wochenschr* 1983, **61**(8):383-401.
7. 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.
8. Berg JM: **Biochemistry**, 4th edn; 2002.
9. Feher MD, Richmond W: **Lipids and Lipid Disorders**, 2 edn. London: Mosby-Wolfe Medical Communications; 1997.
10. Mahley RW: **Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology**. *Science* 1988, **240**(4852):622-630.
11. Rall SC, Jr., Weisgraber KH, Mahley RW: **Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence**. *J Biol Chem* 1982, **257**(8):4171-4178.
12. Vohl MC, Szots F, Lelievre M, Lupien PJ, Bergeron J, Gagne C, Couture P: **Influence of LDL receptor gene mutation and apo E polymorphism on lipoprotein response to simvastatin treatment among adolescents with**

- heterozygous familial hypercholesterolemia.** *Atherosclerosis* 2002, **160**(2):361-368.
13. Eichner JE, Kuller LH, Orchard TJ, Grandits GA, McCallum LM, Ferrell RE, Neaton JD: **Relation of apolipoprotein E phenotype to myocardial infarction and mortality from coronary artery disease.** *Am J Cardiol* 1993, **71**(2):160-165.
 14. Schiele F, De Bacquer D, Vincent-Viry M, Beisiegel U, Ehnholm C, Evans A, Kafatos A, Martins MC, Sans S, Sass C *et al*: **Apolipoprotein E serum concentration and polymorphism in six European countries: the ApoEurope Project.** *Atherosclerosis* 2000, **152**(2):475-488.
 15. Bennet AM, Di Angelantonio E, Ye Z, Wensley F, Dahlin A, Ahlbom A, Keavney B, Collins R, Wiman B, de Faire U *et al*: **Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk.** *JAMA* 2007, **298**(11):1300-1311.
 16. Hatters DM, Peters-Libeu CA, Weisgraber KH: **Apolipoprotein E structure: insights into function.** *Trends Biochem Sci* 2006, **31**(8):445-454.
 17. Eichner JE, Ferrell RE, Kamboh MI, Kuller LH, Becker DJ, Drash AL, Stein EA, Orchard TJ: **The impact of the apolipoprotein E polymorphism on the lipoprotein profile in insulin-dependent diabetes: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study IX.** *Metabolism* 1992, **41**(4):347-351.
 18. Hauser PS, Narayanaswami V, Ryan RO: **Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology.** *Progress in Lipid Research*, In Press, Accepted Manuscript.
 19. Bourbon M, Rato Q: **Lipoproteínas, Genética e Aterosclerose.** *RFML* 2006, **Série III, 11 (2)**:67-73.
 20. Goldstein JL, Hobbs HH, Brown M: **Familial hypercholesterolemia**, vol. 2, 7th edn. New York: McGraw-Hill Publishing Co; 1995.
 21. Heller DA, de Faire U, Pedersen NL, Dahlen G, McClearn GE: **Genetic and environmental influences on serum lipid levels in twins.** *N Engl J Med* 1993, **328**(16):1150-1156.
 22. Wasan KM, Brocks DR, Lee SD, Sachs-Barrable K, Thornton SJ: **Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery.** *Nat Rev Drug Discov* 2008, **7**(1):84-99.

23. Ohashi R, Mu H, Wang X, Yao Q, Chen C: **Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis.** *QJM* 2005, **98**(12):845-856.
24. Mantilla Morato T, Alonso R, Mata P: **Diagnosis and treatment of familial hyperlipaemia episodes.** *Aten Primaria* 2004, **34**(10):557-564.
25. **Recommendations of the European Atherosclerosis Society prepared by the International Task Force for the Prevention of Coronary Heart Disease: scientific background and new clinical guidelines.** *Nutr Metab Cardio Dis* 1992;2:113-156.
26. Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG: **Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia.** *J Clin Invest* 1973, **52**(7):1544-1568.
27. Campos EM: **From Fredrickson's classification of phenotypes--lipoprotein patterns--to genotype comprehension.** *Acta Med Port* 2005, **18**(3):189-198.
28. Bourbon M, Rato Q: **Alterações Genéticas do Metabolismo Lipoproteico.** *RFML* 2006, **Série III, 11 (4)**:193-201.
29. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL: **Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia.** *Hum Mutat* 1992, **1**(6):445-466.
30. Goldstein JL, Brown MS: **Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973, **70**(10):2804-2808.
31. Neil HA, Hammond T, Huxley R, Matthews DR, Humphries SE: **Extent of underdiagnosis of familial hypercholesterolaemia in routine practice: prospective registry study.** *BMJ* 2000, **321**(7254):148.
32. Rader DJ, Cohen J, Hobbs HH: **Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment.** *J Clin Invest* 2003, **111**(12):1795-1803.
33. Bourbon M, Rato Q: **Portuguese Familial Hypercholesterolemia Study: presentation of the study and preliminary results.** *Rev Port Cardiol* 2006, **25**(11):999-1013.
34. Williams RR, Hunt SC, Schumacher MC, Hegele RA, Leppert MF, Ludwig EH, Hopkins PN: **Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using**

- new practical criteria validated by molecular genetics. *Am J Cardiol* 1993, **72**(2):171-176.
35. Defesche JC: **Low-density lipoprotein receptor--its structure, function, and mutations.** *Semin Vasc Med* 2004, **4**(1):5-11.
36. **Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group.** *BMJ* 1991, **303**(6807):893-896.
37. **Mortality in treated heterozygous familial hypercholesterolaemia: implications for clinical management. Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group.** *Atherosclerosis* 1999, **142**(1):105-112.
38. Soutar AK, Naoumova RP: **Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia.** *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007, **4**(4):214-225.
39. Myant NB: **Familial defective apolipoprotein B-100: a review, including some comparisons with familial hypercholesterolaemia.** *Atherosclerosis* 1993, **104**(1-2):1-18.
40. Müller C: **Xanthomata, Hypercholesterolemia, Angina Pectoris.** *Acta Med Scand* 1983, **89**:75-84.
41. Fouchier SW, Kastelein JJ, Defesche JC: **Update of the molecular basis of familial hypercholesterolemia in The Netherlands.** *Hum Mutat* 2005, **26**(6):550-556.
42. van Aalst-Cohen ES, Jansen AC, de Jongh S, de Sauvage Nolting PR, Kastelein JJ: **Clinical, diagnostic, and therapeutic aspects of familial hypercholesterolemia.** *Semin Vasc Med* 2004, **4**(1):31-41.
43. Humphries SE, Whittall RA, Hubbart CS, Maplebeck S, Cooper JA, Soutar AK, Naoumova R, Thompson GR, Seed M, Durrington PN *et al*: **Genetic causes of familial hypercholesterolaemia in patients in the UK: relation to plasma lipid levels and coronary heart disease risk.** *J Med Genet* 2006, **43**(12):943-949.
44. Tosi I, Toledo-Leiva P, Neuwirth C, Naoumova RP, Soutar AK: **Genetic defects causing familial hypercholesterolaemia: identification of deletions and duplications in the LDL-receptor gene and summary of all mutations found in patients attending the Hammersmith Hospital Lipid Clinic.** *Atherosclerosis* 2007, **194**(1):102-111.

45. Lindgren V, Luskey KL, Russell DW, Francke U: **Human genes involved in cholesterol metabolism: chromosomal mapping of the loci for the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase with cDNA probes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, **82**(24):8567-8571.
46. Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Schneider WJ, Casey ML, Goldstein JL, Russell DW: **The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA.** *Cell* 1984, **39**(1):27-38.
47. Russell DW, Schneider WJ, Yamamoto T, Luskey KL, Brown MS, Goldstein JL: **Domain map of the LDL receptor: sequence homology with the epidermal growth factor precursor.** *Cell* 1984, **37**(2):577-585.
48. Sudhof TC, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW: **The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins.** *Science* 1985, **228**(4701):815-822.
49. Lehrman MA, Schneider WJ, Sudhof TC, Brown MS, Goldstein JL, Russell DW: **Mutation in LDL receptor: Alu-Alu recombination deletes exons encoding transmembrane and cytoplasmic domains.** *Science* 1985, **227**(4683):140-146.
50. Ma PT, Yamamoto T, Goldstein JL, Brown MS: **Increased mRNA for low density lipoprotein receptor in livers of rabbits treated with 17 alpha-ethinyl estradiol.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, **83**(3):792-796.
51. 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**(1):243-246.
52. Leigh SE, Foster AH, Whittall RA, Hubbart CS, Humphries SE: **Update and analysis of the University College London low density lipoprotein receptor familial hypercholesterolemia database.** *Ann Hum Genet* 2008, **72**(Pt 4):485-498.
53. Hobbs HH, Brown MS, Russell DW, Davignon J, Goldstein JL: **Deletion in the gene for the low-density-lipoprotein receptor in a majority of French Canadians with familial hypercholesterolemia.** *N Engl J Med* 1987, **317**(12):734-737.

54. Medeiros AM, Alves AC, Francisco V, Bourbon M: **Update of the Portuguese Familial Hypercholesterolaemia Study.** *Atherosclerosis* 2010, **212(2)**:553-558.
55. Yang CY, Chen SH, Gianturco SH, Bradley WA, Sparrow JT, Tanimura M, Li WH, Sparrow DA, DeLoof H, Rosseneu M *et al*: **Sequence, structure, receptor-binding domains and internal repeats of human apolipoprotein B-100.** *Nature* 1986, **323**(6090):738-742.
56. Knott TJ, Rall SC, Jr., Innerarity TL, Jacobson SF, Urdea MS, Levy-Wilson B, Powell LM, Pease RJ, Eddy R, Nakai H *et al*: **Human apolipoprotein B: structure of carboxyl-terminal domains, sites of gene expression, and chromosomal localization.** *Science* 1985, **230**(4721):37-43.
57. Brown MS, Goldstein JL: **A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis.** *Science* 1986, **232**(4746):34-47.
58. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D *et al*: **Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia.** *Nat Genet* 2003, **34**(2):154-156.
59. Miserez AR, Muller PY: **Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation emerged in the mesolithic ancestors of Celtic peoples?** *Atherosclerosis* 2000, **148**(2):433-436.
60. Tai DY, Pan JP, Lee-Chen GJ: **Identification and haplotype analysis of apolipoprotein B-100 Arg3500-->Trp mutation in hyperlipidemic Chinese.** *Clin Chem* 1998, **44**(8 Pt 1):1659-1665.
61. Castillo S, Tejedor D, Mozas P, Reyes G, Civeira F, Alonso R, Ros E, Pocovi M, Mata P: **The apolipoprotein B R3500Q gene mutation in Spanish subjects with a clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia.** *Atherosclerosis* 2002, **165**(1):127-135.
62. Haddad L, Day IN, Hunt S, Williams RR, Humphries SE, Hopkins PN: **Evidence for a third genetic locus causing familial hypercholesterolemia. A non-LDLR, non-APOB kindred.** *J Lipid Res* 1999, **40**(6):1113-1122.
63. Sun XM, Eden ER, Tosi I, Neuwirth CK, Wile D, Naoumova RP, Soutar AK: **Evidence for effect of mutant PCSK9 on apolipoprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolaemia.** *Hum Mol Genet* 2005, **14**(9):1161-1169.

64. Naoumova RP, Tosi I, Patel D, Neuwirth C, Horswell SD, Marais AD, van Heyningen C, Soutar AK: **Severe hypercholesterolemia in four British families with the D374Y mutation in the PCSK9 gene: long-term follow-up and treatment response.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, **25**(12):2654-2660.
65. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Jr., Hobbs HH: **Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease.** *N Engl J Med* 2006, **354**(12):1264-1272.
66. Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH: **Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism.** *Trends Biochem Sci* 2007, **32**(2):71-77.
67. Maxwell KN, Breslow JL: **Proprotein convertase subtilisin kexin 9: the third locus implicated in autosomal dominant hypercholesterolemia.** *Curr Opin Lipidol* 2005, **16**(2):167-172.
68. Hobbs FDR, McGregor E, Shepherd J: **Pharmacotherapy: Improving the Lipid Profile:** Wiley-Blackwell; 2009.
69. Rato Q: **Terapêutica farmacológica das dislipidemias.** *Revista Portuguesa de Cardiologia* 2010, **29** (Supl III):49-66.
70. Gould AL, Rossouw JE, Santanillo NC, Heyse JF, Furberg CD: **Cholesterol reduction yields clinical benefit: impact of statin trials.** *Circulation* 1998, **97**(10):946-952.
71. Rodenburg J, Vissers MN, Wiegman A, van Trotsenburg ASP, van der Graaf A, de Groot E, Wijburg FA, Kastelein JJP, Hutten BA: **Statin Treatment in Children With Familial Hypercholesterolemia: The Younger, the Better.** *Circulation* 2007, **116**(6):664-668.
72. de Jongh S, Ose L, Szamosi T, Gagne C, Lambert M, Scott R, Perron P, Dobbelaere D, Saborio M, Tuohy MB *et al*: **Efficacy and safety of statin therapy in children with familial hypercholesterolemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial with simvastatin.** *Circulation* 2002, **106**(17):2231-2237.
73. Dirisamer A, Hachemian N, Bucek RA, Wolf F, Reiter M, Widhalm K: **The effect of low-dose simvastatin in children with familial hypercholesterolaemia: a 1-year observation.** *Eur J Pediatr* 2003, **162**(6):421-425.

74. Couture P, Brun LD, Szots F, Lelievre M, Gaudet D, Despres JP, Simard J, Lupien PJ, Gagne C: **Association of specific LDL receptor gene mutations with differential plasma lipoprotein response to simvastatin in young French Canadians with heterozygous familial hypercholesterolemia.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998, **18**(6):1007-1012.
75. Stein EA, Illingworth DR, Kwiterovich PO, Jr., Liacouras CA, Siimes MA, Jacobson MS, Brewster TG, Hopkins P, Davidson M, Graham K *et al*: **Efficacy and safety of lovastatin in adolescent males with heterozygous familial hypercholesterolemia: a randomized controlled trial.** *JAMA* 1999, **281**(2):137-144.
76. Superko HR, Greenland P, Manchester RA, Andreadis NA, Schectman G, West NH, Hunninghake D, Haskell WL, Probstfield JL: **Effectiveness of low-dose colestipol therapy in patients with moderate hypercholesterolemia.** *Am J Cardiol* 1992, **70**(2):135-140.
77. Davidson MH, Dillon MA, Gordon B, Jones P, Samuels J, Weiss S, Isaacsohn J, Toth P, Burke SK: **Colesevelam hydrochloride (cholestagel): a new, potent bile acid sequestrant associated with a low incidence of gastrointestinal side effects.** *Arch Intern Med* 1999, **159**(16):1893-1900.
78. Insull W, Jr., Toth P, Mullican W, Hunninghake D, Burke S, Donovan JM, Davidson MH: **Effectiveness of colesevelam hydrochloride in decreasing LDL cholesterol in patients with primary hypercholesterolemia: a 24-week randomized controlled trial.** *Mayo Clin Proc* 2001, **76**(10):971-982.
79. Hunninghake D, Insull W, Jr., Toth P, Davidson D, Donovan JM, Burke SK: **Coadministration of colesevelam hydrochloride with atorvastatin lowers LDL cholesterol additively.** *Atherosclerosis* 2001, **158**(2):407-416.
80. Knapp HH, Schrott H, Ma P, Knopp R, Chin B, Gaziano JM, Donovan JM, Burke SK, Davidson MH: **Efficacy and safety of combination simvastatin and colesevelam in patients with primary hypercholesterolemia.** *Am J Med* 2001, **110**(5):352-360.
81. Davidson MH, Toth P, Weiss S, McKenney J, Hunninghake D, Isaacsohn J, Donovan JM, Burke SK: **Low-dose combination therapy with colesevelam hydrochloride and lovastatin effectively decreases low-density lipoprotein cholesterol in patients with primary hypercholesterolemia.** *Clin Cardiol* 2001, **24**(6):467-474.

82. Stein EA, Marais AD, Szamosi T, Raal FJ, Schurr D, Urbina EM, Hopkins PN, Karki S, Xu J, Misir S *et al*: **Colesevelam hydrochloride: efficacy and safety in pediatric subjects with heterozygous familial hypercholesterolemia.** *J Pediatr* 2009, **156**(2):231-236 e231-233.
83. Van Heek M, France CF, Compton DS, McLeod RL, Yumibe NP, Alton KB, Sybertz EJ, Davis HR, Jr.: **In vivo metabolism-based discovery of a potent cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, in the rat and rhesus monkey through the identification of the active metabolites of SCH48461.** *J Pharmacol Exp Ther* 1997, **283**(1):157-163.
84. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**(12):5463-5467.
85. Dracopoli N, Haines JL, Korf BR, Moir DT, C. M, Seidman C, Smith DR: **Current Protocols in Human Genetics.** New York: John Wiley & Sons; 1994.
86. Hartl D, Jones E: **Analysis of Genes and Genomes.** In: *Genetics*. 5th edn: Jones and Bartlett Publishers; 2000.
87. Loubser O, Marais AD, Kotze MJ, Godenir N, Thiar R, Scholtz CL, de Villiers JN, Hillermann R, Firth JC, Weich HF *et al*: **Founder mutations in the LDL receptor gene contribute significantly to the familial hypercholesterolemia phenotype in the indigenous South African population of mixed ancestry.** *Clin Genet* 1999, **55**(5):340-345.
88. Bourbon M, Alves AC, Medeiros AM, Silva S, Soutar AK: **Familial hypercholesterolaemia in Portugal.** *Atherosclerosis* 2008, **196**(2):633-642.
89. Pullinger CR, Hennessy LK, Chatterton JE, Liu W, Love JA, Mendel CM, Frost PH, Malloy MJ, Schumaker VN, Kane JP: **Familial ligand-defective apolipoprotein B. Identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity.** *J Clin Invest* 1995, **95**(3):1225-1234.
90. Seripa D, Gravina C, Volpe R, Margaglione M, Papa S, Merla G, Parrella P, Di Minno G, Ricci G, Testa M *et al*: **Absence of apolipoprotein B3500 mutation in type 2a hyperlipoproteinemia patients and in the general population from southern Italy.** *J Inherit Metab Dis* 1999, **22**(5):670-671.
91. Chmara M, Wasag B, Zuk M, Kubalska J, Wegrzyn A, Bednarska-Makaruk M, Pronicka E: **Molecular characterization of Polish patients with familial hypercholesterolemia: novel and recurrent LDLR mutations.** *J Appl Genet* 2010, **51**(1):95-106.

92. Miserez AR, Muller PY: **Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation emerged in the Mesolithic period.** *Atherosclerosis* 2001, **158**(1):253-254.
93. Real JT, Chaves FJ, Ejarque I, Garcia-Garcia AB, Valldecabres C, Ascaso JF, Armengod ME, Carmena R: **Influence of LDL receptor gene mutations and the R3500Q mutation of the apoB gene on lipoprotein phenotype of familial hypercholesterolemic patients from a South European population.** *Eur J Hum Genet* 2003, **11**(12):959-965.
94. Bourbon M, Sun XM, Soutar AK: **A rare polymorphism in the low density lipoprotein (LDL) gene that affects mRNA splicing.** *Atherosclerosis* 2007, **195**(1):e17-20.
95. Cotton RG, Scriver CR: **Proof of "disease causing" mutation.** *Hum Mutat* 1998, **12**(1):1-3.
96. Bertolini S, Cantafora A, Averna M, Cortese C, Motti C, Martini S, Pes G, Postiglione A, Stefanutti C, Blotta I *et al*: **Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, **20**(9):E41-52.
97. Graham CA, McClean E, Ward AJ, Beattie ED, Martin S, O'Kane M, Young IS, Nicholls DP: **Mutation screening and genotype:phenotype correlation in familial hypercholesterolaemia.** *Atherosclerosis* 1999, **147**(2):309-316.
98. Alves AC, Medeiros AM, Francisco V, Gaspar IM, Rato Q, Bourbon M: **Molecular diagnosis of familial hypercholesterolemia: an important tool for cardiovascular risk stratification.** *Rev Port Cardiol* 2010, **29**(6):907-921.
99. Hadfield GS, Humphries SE: **Familial hypercholesterolaemia: Cascade testing is tried and tested and cost effective.** *BMJ* 2007, **335**(7622):683.

Anexo A

Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

Adaptado do “Simon Broome Heart Research Trust”

Confidencial

Número do processo:

Número da família:

(A preencher pelo INSA)

Identificação do caso-índice

Nome completo: _____

Morada: _____

Telefone: _____

Data de Nasc.: _____

Estado Civil: _____

Naturalidade: _____

Sexo: Masculino ☐ Feminino ☐

Origem étnica (assinalar a opção adequada):

☐ Caucasiano ☐ Asiático ☐ Africano ☐ outro

Condições de colheita e envio das amostras

Devem ser feitas as seguintes colheitas em jejum:

CASO-INDEX:

Adultos:

7.5 mL de sangue em tubo seco - separar e enviar só o soro

~8 mL (3x2.7mL) de sangue em tubos de EDTA

Crianças:

4 mL de sangue em tubo seco - separar e enviar só o soro

~6 mL (2x2.7mL) de sangue em tubos de EDTA

FAMILIARES (adultos e crianças):

4 mL de sangue em tubo seco - separar e enviar só o soro

~6 mL (2x2.7mL) de sangue em tubos de EDTA

Estas amostras devem ser enviadas em **correio azul**, em envelope almofadado ou numa caixa, bem envolvidas em algodão, acompanhadas por este formulário.

O tempo máximo entre a colheita das amostras e a sua análise não deverá ultrapassar os **dois dias**, o que implica que a amostra seja enviada logo após a colheita. Esta condição é de extrema importância para este estudo. Para qualquer informação complementar contactar: Dra. Mafalda Bourbon, Tel: 217 508 130 / 217 508 126.

Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

Adaptado do “Simon Broome Heart Research Trust”

Declaração de Consentimento Informado e Esclarecido (Original)

Para que se possa compreender e actuar a nível da prevenção das doenças cardiovasculares é necessário a realização de estudos de investigação nesta área. Alguns dos factores de risco mais importantes para doenças cardiovasculares são a hipertensão arterial, a diabetes, o tabagismo e a hipercolesterolemia (dislipidemia). Algumas dislipidemias têm origem genética, nomeadamente a Hipercolesterolemia Familiar. O objectivo deste estudo é determinar a causa genética da hipercolesterolemia em indivíduos com o diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, assim como aumentar o conhecimento sobre os mecanismos do desenvolvimento da doença cardiovascular nas pessoas afectadas. Para este estudo é necessária a colheita de duas amostras de sangue, cerca de 15 ml no total, para a determinação de parâmetros laboratoriais de relevância e extracção de DNA para estudos moleculares. As amostras colhidas serão utilizadas apenas para os trabalhos de investigação acima referidos.

Estes estudos são confidenciais e o anonimato dos participantes está assegurado de acordo com as normas éticas dos estudos genéticos: os dados referentes à sua identidade não constarão das bases de dados do estudo. Apenas serão pedidas informações sobre alguns dos seus dados pessoais e elementos da sua história clínica importantes para este estudo. Como participante no estudo pode em qualquer altura ter acesso aos seus dados clínicos e moleculares, podendo exigir ser retirado do mesmo assim que o desejar. Os resultados obtidos serão enviados para o seu médico assistente.

Declaro que fui informado dos objectivos deste estudo e aceito participar nele. Autorizo o tratamento automatizado dos meus dados pessoais.

Localidade: _____ Data: _____/_____/_____

Nome do Participante:

Assinatura:

(Em caso do caso-índice ser menor de 18 anos, um dos pais deve assinar para dar o seu consentimento)

Nome do Médico Assistente:

Assinatura:

Responsável pelo Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar
Dra. Mafalda Bourbon, Tel: 217 508 130 / 217 508 126

Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

Adaptado do “Simon Broome Heart Research Trust”

Declaração de Consentimento Informado e Esclarecido (Duplicado)

(Este duplicado deverá ser entregue ao participante do estudo)

Para que se possa compreender e actuar a nível da prevenção das doenças cardiovasculares é necessário a realização de estudos de investigação nesta área. Alguns dos factores de risco mais importantes para doenças cardiovasculares são a hipertensão arterial, a diabetes, o tabagismo e a hipercolesterolemia (dislipidemia). Algumas dislipidemias têm origem genética, nomeadamente a Hipercolesterolemia Familiar. O objectivo deste estudo é determinar a causa genética da hipercolesterolemia em indivíduos com o diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, assim como aumentar o conhecimento sobre os mecanismos do desenvolvimento da doença cardiovascular nas pessoas afectadas. Para este estudo é necessária a colheita de duas amostras de sangue, cerca de 15 ml no total, para a determinação de parâmetros laboratoriais de relevância e extracção de DNA para estudos moleculares. As amostras colhidas serão utilizadas apenas para os trabalhos de investigação acima referidos.

Estes estudos são confidenciais e o anonimato dos participantes está assegurado de acordo com as normas éticas dos estudos genéticos: os dados referentes à sua identidade não constarão das bases de dados do estudo. Apenas serão pedidas informações sobre alguns dos seus dados pessoais e elementos da sua história clínica importantes para este estudo. Como participante no estudo pode em qualquer altura ter acesso aos seus dados clínicos e moleculares, podendo exigir ser retirado do mesmo assim que o desejar. Os resultados obtidos serão enviados para o seu médico assistente.

Declaro que fui informado dos objectivos deste estudo e aceito participar nele. Autorizo o tratamento automatizado dos meus dados pessoais.

Localidade: _____ Data: _____/_____/_____

Nome do Participante:

Assinatura:

(Em caso do caso-índice ser menor de 18 anos, um dos pais deve assinar para dar o seu consentimento)

Nome do Médico Assistente:

Assinatura:

Responsável pelo Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

Dra. Mafalda Bourbon, Tel: 217 508 130 / 217 508 126

Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

Adaptado do “Simon Broome Heart Research Trust”

Confidencial

Número do processo:

Número da família

(A preencher pelo INSA)

Razão primária de inclusão no estudo:

(assinalar a opção adequada)

- ☐ Parente afectado
- ☐ Parente com doença coronária crónica
- ☐ Caso-index tem doença coronária crónica
- ☐ caso-index sofre de outras doenças vasculares
- ☐ Sinais físicos
- ☐ Screening
- ☐ Outros

Critérios para admissão no estudo (segundo os critérios abaixo mencionados):

- ☐ Hipercolesterolemia familiar confirmada
- ☐ Hipercolesterolemia familiar possível

Critérios para diagnóstico:

Hipercolesterolemia familiar confirmada é definida como:

- (a) **crianças menores de 16 anos:** Colesterol total acima de 200 mg/dL (5,18 mmol/L) ou LDL colesterol acima de 120 mg/dL (3.10 mmol/L)

Adultos: Colesterol total acima de 290 mg/dL (7,5 mmol/L) ou LDL colesterol acima de 190mg/dL (4.9 mmol/L)

- e
- (b) Xantomas nos tendões no caso-index ou parente (pais, filhos avós, irmãos, tios)
- ou
- (c) Evidência genética de mutação no receptor de LDL ou APOB

Hipercolesterolemia familiar possível é definida como:

- (a)

- e
- (d) História familiar de enfarte do miocárdio antes dos 50 anos em avós e tios ou antes dos 60 anos nos pais, irmãos e filhos
- ou
- (e) História familiar de nível elevado de colesterol nos pais, irmãos ou filhos; ou colesterol total acima de 290 mg/dL (7,5 mmol/L) nos avós e/ou tios.

Identificação médica do caso-índice:

Nome, morada e telefone do médico assistente

--

Hospital

--

Número hospitalar do caso-índice

--

História médica do caso-index

Valores antes do tratamento

Colesterol	LDL	HDL	TG	ApoB	ApoAI	Lp(a)

Xantomas nos tendões:

(assinale se o caso index alguma vez apresentou xantomas)

	Presente	Ausente		Presente	Ausente
Dorso da mãos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Pretibiais	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cotovelos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Dorso dos pés	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
			Tendão de Achilles	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Olhos

	Presente	Ausente
<i>Lipaemia retinalis</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Arco corneano	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Xantelasma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Assinalar se o caso-index tem ou teve algumas das seguintes situações:

	Confirmado	Possível	
Angina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Idade de início (anos): _____
Enfarte do miocárdio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Idade do 1º enfarte: _____
CABG	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Se sim, quando? _____
Angioplastia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Se sim, quando? _____
Outras doenças vasculares	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Se sim, quando? _____
Hipertensão	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
A.V.C.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Idade do 1º A.V.C.: _____
A.I.T.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Claudicação	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Pancreatite	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doença da tiroide	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doença renal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Diabetes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Idade de início (anos): _____
Tratamento da Diabetes:	Insulina	<input type="checkbox"/>	
	Oral	<input type="checkbox"/>	
	Insulina e oral	<input type="checkbox"/>	
	dieta	<input type="checkbox"/>	

Informação médica da consulta mais recente

Data: _____ Terapêutica: Sim ☐ Não ☐

Colesterol	LDL	HDL	TG	ApoB	ApoAI	Lp(a)

Altura: _____ IMC: _____

Peso: _____

Pressão arterial: Sístole _____ Diástole _____

Álcool

Número de unidades por semana: _____

(1 unidade = 1 cerveja ou um copo de vinho)

Fumador? Sim ☐ quantos cigarros por dia? _____

Não ☐ se é um ex-fumador há quantos anos deixou de fumar? _____

Faz exercício? Sim ☐ Que tipo de exercício? _____ Quantas vezes por semana? _____

Não ☐

História familiar do caso-índice

Parentesco	Colesterol elevado	Presença de xantomias	Triglicerídeos elevado	Idade do 1º enfarte do miocárdio	Vivo (V) Morto (M) Desc.(?)	Idade presente ou na morte	Causa de morte
Pai Nome:	mg/dl		mg/dl				
Mãe Nome:	mg/dl		mg/dl				
Irmão M/F Nome:	mg/dl		mg/dl				
Irmão M/F Nome:	mg/dl		mg/dl				
Irmão M/F Nome:	mg/dl		mg/dl				
Filho M/F Nome:	mg/dl		mg/dl				
Filho M/F Nome:	mg/dl		mg/dl				
Filho M/F Nome:	mg/dl		mg/dl				
Cônjuge Nome:	mg/dl		mg/dl				

Preencher com SIM e NÃO quando os valores não são conhecidos

NOTA: Preencher o Anexo A caso envie amostras de familiares

Árvore genealógica

Tratamento:

Dieta ☐ LDL Aferese ☐

Medicamentos ☐

Terapia actual para baixar os lípidos

Estatinas ☐ Qual? _____ Dosagem _____
Data do início do tratamento _____

Resinas ☐ Qual? _____ Dosagem _____
Data do início do tratamento _____

Fibratos ☐ Qual? _____ Dosagem _____
Data do início do tratamento _____

Ácido nicotínico
ou derivado ☐ Qual? _____ Dosagem _____
Data do início do tratamento _____

Inibidor da absorção
intestinal do colesterol ☐ Qual? _____ Dosagem _____
Data do início do tratamento _____

Outro ☐ Qual? _____ Dosagem _____
Data do início do tratamento _____

Outras observações:

A preencher pelo INSA

Data: ____/____/____

Col.Total	LDL	HDL	TG	Lp (a)	Apo AI	Apo B

Anexo A – Familiares

Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

Adaptado do “Simon Broome Heart Research Trust”

Confidencial

Número do processo:

Número da família:

(A preencher pelo INSA)

Nome do Caso índice: _____

Identificação do Familiar:

Grau de Parentesco: _____

Nome completo: _____

Morada: _____

Telefone: _____

Data de Nasc.: _____

Estado Civil: _____

Naturalidade: _____

Sexo: Masculino ☐ Feminino ☐

Origem étnica (assinalar a opção adequada):

☐ Caucasiano ☐ Asiático ☐ Africano ☐ outra

Dados Bioquímicos:

	Data	CT	LDL	HDL	TG
Sem tratamento (análises disponíveis)					
Em tratamento (últimas análises)					

Dados Clínicos:

Doença	S	N
Cardiovascular		
Qual?		
Idade 1º evento		

Tratamento: _____ Dosagem _____ Data do início: _____

Médico Assistente: _____

Morada: _____

Outras observações:

Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

Adaptado do “Simon Broome Heart Research Trust”

Declaração de Consentimento Informado e Esclarecido (Original)

Para que se possa compreender e actuar a nível da prevenção das doenças cardiovasculares é necessário a realização de estudos de investigação nesta área. Alguns dos factores de risco mais importantes para doenças cardiovasculares são a hipertensão arterial, a diabetes, o tabagismo e a hipercolesterolemia (dislipidemia). Algumas dislipidemias têm origem genética, nomeadamente a Hipercolesterolemia Familiar. O objectivo deste estudo é determinar a causa genética da hipercolesterolemia em indivíduos com o diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, assim como aumentar o conhecimento sobre os mecanismos do desenvolvimento da doença cardiovascular nas pessoas afectadas. Para este estudo é necessária a colheita de duas amostras de sangue, cerca de 15 ml no total, para a determinação de parâmetros laboratoriais de relevância e extracção de DNA para estudos moleculares. As amostras colhidas serão utilizadas apenas para os trabalhos de investigação acima referidos.

Estes estudos são confidenciais e o anonimato dos participantes está assegurado de acordo com as normas éticas dos estudos genéticos: os dados referentes à sua identidade não constarão das bases de dados do estudo. Apenas serão pedidas informações sobre alguns dos seus dados pessoais e elementos da sua história clínica importantes para este estudo. Como participante no estudo pode em qualquer altura ter acesso aos seus dados clínicos e moleculares, podendo exigir ser retirado do mesmo assim que o desejar. Os resultados obtidos serão enviados para o seu médico assistente.

Declaro que fui informado dos objectivos deste estudo e aceito participar nele. Autorizo o tratamento automatizado dos meus dados pessoais.

Localidade: _____ Data: _____/_____/_____

Nome do Participante:

Assinatura:

(Em caso do familiar ser menor, um dos pais deve assinar para dar o seu consentimento)

Nome do Médico Assistente:

Assinatura:

(Em caso do familiar ser menor, um dos pais deve assinar para dar o seu consentimento)

Responsável pelo Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

Dra. Mafalda Bourbon, Tel: 217 508 130 / 217 508 126

Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

Adaptado do “Simon Broome Heart Research Trust”

Declaração de Consentimento Informado e Esclarecido (Duplicado)

(Este duplicado deverá ser entregue ao participante do estudo)

Para que se possa compreender e actuar a nível da prevenção das doenças cardiovasculares é necessário a realização de estudos de investigação nesta área. Alguns dos factores de risco mais importantes para doenças cardiovasculares são a hipertensão arterial, a diabetes, o tabagismo e a hipercolesterolemia (dislipidemia). Algumas dislipidemias têm origem genética, nomeadamente a Hipercolesterolemia Familiar. O objectivo deste estudo é determinar a causa genética da hipercolesterolemia em indivíduos com o diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, assim como aumentar o conhecimento sobre os mecanismos do desenvolvimento da doença cardiovascular nas pessoas afectadas. Para este estudo é necessária a colheita de duas amostras de sangue, cerca de 15 ml no total, para a determinação de parâmetros laboratoriais de relevância e extracção de DNA para estudos moleculares. As amostras colhidas serão utilizadas apenas para os trabalhos de investigação acima referidos.

Estes estudos são confidenciais e o anonimato dos participantes está assegurado de acordo com as normas éticas dos estudos genéticos: os dados referentes à sua identidade não constarão das bases de dados do estudo. Apenas serão pedidas informações sobre alguns dos seus dados pessoais e elementos da sua história clínica importantes para este estudo. Como participante no estudo pode em qualquer altura ter acesso aos seus dados clínicos e moleculares, podendo exigir ser retirado do mesmo assim que o desejar. Os resultados obtidos serão enviados para o seu médico assistente.

Declaro que fui informado dos objectivos deste estudo e aceito participar nele. Autorizo o tratamento automatizado dos meus dados pessoais.

Localidade: _____ Data: _____/_____/_____

Nome do Participante:

Assinatura:

(Em caso do familiar ser menor, um dos pais deve assinar para dar o seu consentimento)

Nome do Médico Assistente:

Assinatura:

(Em caso do familiar ser menor, um dos pais deve assinar para dar o seu consentimento)

Responsável pelo Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

Dra. Mafalda Bourbon, Tel: 217 508 130 / 217 508 126

Anexo B

Anexo B1 – Sequência dos *primers*, tamanho da região flanqueada e temperatura de ligação dos fragmentos de ADN amplificados por PCR, de cada um dos exões dos três genes estudados (*LDLR* e *APOB*).

Gene <i>LDLR</i>	Sequência 5'–3'	Região amplificada (pb)	Temperatura de ligação (°C)	Primer's
Promotor e Exão 1	F: GGG TTA AAA AGC CGA TGT CA R: TGC CAT TAC CCC ACA AGT CTC C	416	59	MB257 SPR+1R
Exão 2	F: TCC CAT ACC CCA GAG AGT CCA TA R: CAG CCG CCA TCA AAA AG	580	58	2F 2R
Exão 3	F: GAT TAC AGG CGT GAG CCA CT R: CTC CCC AGG ACT CAC ATA GG	250	59	MB259 MB260
Exão 4	F: GTA CAG ATG AGG AAA CTG AG R: TTG GCA TGT TGT TGG AAA TCC	677	57	EX4F EX4R
Exão 5	F: GCA AAA GGC CCT GCT TCT TT R: GAG GCT CTG AGA AGT CAA GT	340	58	EX5F NEW EX5R NEW
Exão 6	F: ATT ACA GGC ACA AAC CAC CGT G R: GCA GAG TGG AGT TCC CAA AAC C	370	59	EX6F EX6R
Exão 7	F: GAG TGA CCA GTC TGC ATC CC R: GAA GCG CAG AGG GGG CCC AG	327	63	LDL7F LDL7R
Exão 8	F: GGA TGA CAC CTG GCT GTT TCC TT R: CGG TCA GGG GAT ATG AGT CTG TG	388	59	EX8F EX8R
Exão 9+10	F: GGT CTT TTC CAC CCT CTT TTT C R: TAA CCA GTT CCT GAA GCT CC	695	58	EX9+10F EX9+10R
Exão 10	F: CCT TGG CCC GCA GGT GAG A R: GTG CTG GGA TTA CAG GTG CTT TGA	400	62	MB34 MB35
Exão 11	F: GCC ACA TTT GGA GTT TGG GGT TC R: AGC AGC TTG GGC TTG TCC CAG A	350	60	EX11F EX11R
Exão 12	F: GGT GCT TTC TGC TAG GTC C R: TTT TCT GCG TTC ATC TTG GCT	340	59	EX12F EX12R
Exão 13	F: CTA GTT GTG GAG AGA GGG TGG C R: GCG GAG TCA GGG CAG GAA CGA G	340	60	EX13F EX13R
Exão 14	F: GAA ACC TCC TTG TGG AAA CTC T R: GAA AAG TAT GGT TAT CCC GAC T	388	58	EX14F EX14R
Exão 15	F: CCA AGG TCA TTT GAG ACT TTC GT R: GAG AGA AGG TCA GCA AGG GAG TG	388	60	EX15F EX15R
Exão 16	F: GTCCTCTGCCTGCTCCATTCTT R: ATC CTC CAT CTG ACC CCT TAG C	350	60	EX16F EX16R

Gene LDLR	Sequência 5'–3'	Região amplificada (pb)	Temperatura de ligação (°C)	Primer's
Exão 17	F: GAG CTG GGT CTC TGG TCT CG R: GCG CAC AGA AGC ATT CAC CTA GGT GAA TGC TTC TGT GCG C	500	60	R17F R17R
Exão 18	F: GAG CGG TGG GAA GTG ACT GAA T R: TGG TGC CAT CTG CTG TTG TGT G	580	59	EX18F EX18R
Gene APOB	Sequência 5'–3'	Região amplificada (pb)	Temperatura de ligação (°C)	Primer's
Exão 26	F: GGA GCA GTT GAC CAC AAG CTT AGC TTG GAA R: GGG TGG CTT TGC TTG TAT GTT CTC CGT	343	59	P61 P62
Exão 29	F: CCA AGA TGA GAT CAA CAC AAT C R: AAC TTG ACT TGA GAG TTG GG	334	59	MB63 MB64

Anexo B2 – Tamanho da sequência, temperatura de ligação e sequência dos *primers* usados para sequenciação, de cada um dos exões dos três genes estudados (*LDLR* e *APOB*).

Gene <i>LDLR</i>	Sequência 5'–3'	Tamanho	Primer	Temperatura de ligação (°C)
Promotor e	F: GGG TTA AAA AGC CGA TGT CA	416	MB257	58
Exão 1				
Exão 2	F: TCC CAT ACC CCA GAG AGT CCA TA	580	2F	
Exão 3	F: GAT TAC AGG CGT GAG CCA CT	250	MB279	
Exão 4	F: GTA CAG ATG AGG AAA CTG AG	677	R4F	
Exão 5	F: GCA AAA GGC CCT GCT TCT TT	340	EX5F	
Exão 6	F: ATT ACA GGC ACA AAC CAC CGT G	370	EX6F	
Exão 7	F: GAG TGA CCA GTC TGC ATC CC	327	EX7F	
Exão 8	F: GGA TGA CAC CTG GCT GTT TCC TT	388	EX8F	
Exão 9+10	F: GGT CTT TTC CAC CCT CTT TTT C	695	EX9+10F	
Exão 10	F: CCT TGG CCC GCA GGT GAG A	400	MB34	
Exão 11	R: AGC AGC TTG GGC TTG TCC CAG A	350	EX11R	
Exão 12	F: GGT GCT TTC TGC TAG GTC C	340	EX12F	
Exão 13	F: CTA GTT GTG GAG AGA GGG TGG C	340	EX13F	
Exão 14	F: GAA ACC TCC TTG TGG AAA CTC T	388	EX14F	
Exão 15	R: GAG AGA AGG TCA GCA AGG GAG TG	388	EX15R	
Exão 16	F: GTCCTCTGCCTGCTCCATTTCTT	350	EX16F	
Exão 17	F: GAG CTG GGT CTC TGG TCT CG	500	R17F	
Exão 18	F: GAG CGG TGG GAA GTG ACT GAA T	580	EX18F	
Gene <i>APOB</i>	Sequência 5'–3'	Tamanho	Primer	Temperatura de ligação (°C)
Exão 26	F: GGA GCA GTT GAC CAC AAG CTT AGC TTG GAA	288	P61	58
Exão 29	F: CCA AGA TGA GAT CAA CAC AAT C	334	MB63	

Anexo C

Anexo C1 – Sequência dos *primers*, tamanho da região flanqueada e temperatura de ligação do fragmento de ADN amplificado por PCR, do exão 4 do gene *APOE*.

Gene <i>APOE</i>	Sequência 5'–3'	Região amplificada (pb)	Temperatura de ligação (°C)	Primer's
Exão 4	F: TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A R: ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC	244	58	MB183 MB184

Anexo C2 – Tamanho da sequência, temperatura de ligação e sequência dos *primers* para a reacção de SnapShot.

Gene <i>APOE</i>	Sequência 5'–3'	Tamanho	Primer	Temperatura de ligação (°C)
Exão 4	F: AAA AAA CGG ACA TGG AGG ACG TG R: GCC TGG TAC ACT GCC AGG C	244	MB181 MB182	60

Anexo D

Anexo D – Sondas do MLPA® *Salsa P062 LDLR Kit* usadas na pesquisa de grandes rearranjos.

Tamanho (nt)	SALSA MLPA sonda	Posição Cromossomal	
		Localização	LDLR
64-70-76-82*	Fragmento Q		
88-92-96	Fragmento D		
100	Fragmento X		
105	Fragmento Y		
130	Sonda Controlo 0797-L00463	5q31	
136	Sonda Controlo 1819-L10850	16p13	
142	Sonda SMARCA4 2488-L13996		SMARCA4
148	Sonda LDLR 2309-L1800		Exão 1
154	Sonda Controlo 1008-L00577	3p22	
160	Sonda LDLR 2310-L01801		Exão 2
166	Sonda LDLR 2311-L01802		Exão 11
175	Sonda Controlo 1114-L00383	5q12	
184	Sonda LDLR 2312-L01803		Exão 3
193	Sonda LDLR 2313-L01804		Exão 12
202	Sonda Controlo 1116-L00620	8q21	
211	Sonda LDLR 2314-L01805		Exão 4
220	Sonda LDLR 11838-L12635		Exão 14
229	Sonda Controlo 1603-L01185	13q12	
238	Sonda LDLR 2316-L01807		Exão 5
247	Sonda LDLR 2317-L01808		Exão 15
256	Sonda Controlo 0518-L00098	2q13	
265	Sonda LDLR 2318-L01809		Exão 6
274	Sonda LDLR 2319-L01810		Exão 16
283	Sonda Controlo 1326-L0873	17p13	
292	Sonda LDLR 2320-L01811		Exão 7
301	Sonda LDLR 2321-L01812		Exão 17
310	Sonda Controlo 1333-L00876	7q11	
319	Sonda LDLR 2322-L09533		Exão 8
328	Sonda LDLR 2323-L01814		Exão 18
337	Sonda Controlo 1919-L01463	1q21	

Tamanho (nt)	SALSA MLPA sonda	Posição Cromossomal	
		Localização	LDLR
346	Sonda LDLR 2324-L01815		Exão 9
355	KIAA1518 2325-L01816		KIAA1518
364	Sonda Controlo 1234-L12680	10p14	
373	Sonda Controlo 1581-L01135	22q12	
391	Sonda LDLR 3003-L02442		Exão 10
400	Sonda LDLR 3004-L12681		Exão 13
409	Sonda Controlo 0963-L0550	2p14	
418	Sonda Controlo 3065-L02492	4p16	
427	Sonda LDLR 10781-L11396		Exão15
436	Sonda LDLR 6281-L5786		Exão 1
445	Sonda Controlo 8793-L08817	10p21	

Anexo E

Anexo E – Tabela com os dados referentes aos 100 indivíduos normolipidemicos usados para *RFLP*.

Controlo Normolipidémico	Sexo	CT (mg/dL)	LDL (mg/dL)	HDL (mg/dL)	TG (mg/dL)
20023	F	193	105	70	90
21012	F	163	84	50	145
21038	F	212	138	62	59
21051	M	206	120	64	111
22011	F	151	84	55	59
23003	F	207	138	56	66
24002	M	185	102	54	146
26008	F	186	103	69	70
26012	M	149	75	44	150
27051	F	119	52	59	42
27079	F	215	120	81	71
27166	F	194	123	60	53
27184	M	185	117	33	173
28003	F	174	88	54	115
28011	F	160	92	57	57
28070	F	195	88	70	80
28093	F	208	122	56	129
28121	M	202	144	33	125
28136	F	192	118	51	91
99020	F	167	95	64	38
99040	F	173	85	72	81
99119	M	182	86	87	46
128760	F	217	136	69	60
131173	M	132	79	38	77
133519	F	167	103	49	86
134321	M	185	120	51	70
134328	F	150	72	67	56
134787	M	213	118	87	38
C01	M	204	151	42	90
C02	M	159	96	58	50
C03	F	145	94	37	71
C05	F	206	122	69	74
C06	F	123	87	25	54
C07	M	150	102	37	69
C08	F	159	93	55	56
C09	F	141	84	50	53
C10	M	205	139	49	71
C11	M	175	107	50	105
C12	M	205	130	69	43
C13	F	163	85	67	72
C14	F	156	80	60	80

Controlo Normolipidémico	Sexo	CT (mg/dL)	LDL (mg/dL)	HDL (mg/dL)	TG (mg/dL)
C18	M	172	108	51	117
C19	F	181	115	55	47
C20	M	177	120	48	45
C21	F	136	73	55	62
C22	F	218	136	71	65
C24	F	192	118	63	80
C26	F	160	98	55	57
C27	F	158	95	60	49
C29	F	142	75	62	88
C30	F	154	86	62	62
C31	F	159	77	77	40
C32	M	184	124	36	110
C33	F	181	88	65	126
C34	M	174	120	33	107
C35	F	208	123	68	57
C36	F	197	119	53	137
C37	F	208	136	43	121
C38	F	169	107	42	77
C39	M	140	73	41	101
C40	F	188	115	47	156
C41	F	164	86	61	92
C42	M	142	74	58	58
C43	F	176	104	55	110
C44	M	146	98	36	82
C45	F	200	124	55	117
C47	F	211	137	66	72
C49	F	225	137	76	105
C50	F	167	94	56	128
C51	F	220	127	78	136
C52	F	158	101	40	110
C53	F	149	99	34	82
C56	M	147	71	64	76
C58	F	208	129	47	161
C59	F	161	104	47	51
C60	F	147	75	64	38
C62	M	192	124	58	71
C63	F	205	113	87	37
C64	M	160	74	77	47
C65	F	200	132	65	50
C66	M	191	125	50	89
C67	M	150	79	63	41
C68	F	187	122	50	97
C69	M	196	127	63	85
C70	F	189	124	59	30

Controlo Normolipidêmico	Sexo	CT (mg/dL)	LDL (mg/dL)	HDL (mg/dL)	TG (mg/dL)
C71	F	180	114	41	126
C72	F	181	72	96	132
C73	F	186	119	46	92
C74	F	207	117	81	48
C75	F	194	126	57	56
C76	F	226	139	66	102
C78	F	144	85	41	88
C85	M	198	137	53	54
C88	M	171	105	62	50
C90	F	178	97	66	74
C91	F	197	82	98	80
C98	M	152	103	23	131
C101	M	193	121	45	136
C102	F	118	52	56	52
C103	F	179	91	57	153
Média		177,6	105,2	57,1	83,2

Os 100 indivíduos normolipidêmicos foram recrutados aleatoriamente entre a população Portuguesa, tendo em conta os seguintes parâmetros:

- Têm que ser maiores de idade (> 18 anos);
- Não estar em situação de gestação
- Apresentar valores de CT, LDL e TG abaixo dos 220 mg/dL, 130 mg/dL e 150 mg/dL, respectivamente;
- Não apresentar qualquer tipo de doença cardiovascular;
- Não apresentar dislipidemia (Hipercolesterolemia, Hipertrigliceridemia, entre outras);
- Não apresentar qualquer tipo de doença que afete o metabolismo lipídico;
- Não tomar medicação que interfira com os valores lipídicos e com o sistema imunitário;
- Não possuir qualquer doença imunológica conhecida;
- Não manifestar qualquer processo inflamatório ou infeccioso em curso;

Anexo F

Tabela F – Naturalidade e factores de risco cardiovascular referentes aos casos-index estudados.

ID	Naturalidade (Região de Portugal)	Hábitos Tabágicos	Consumo Alcool	Diabetes	Hipertensão	Tiróide	Exercício físico	História Familiar		
								HiperC	Xant Td	DCV
Grupo Pediátrico										
29253	Centro	N	N	N	N	N	S	*	*	*
29257	Norte	N	N	N	N	N	S (4)	S (P, Tsp)	N	S (P, Tp)
29261	Norte	N	N	N	N	N	S (2)	N	N	N
29292	Centro	N	N	N	N	N	S (3)	S (P)	N	S (P)
10033	Centro	N	N	N	N	N	S (1)	N	N	S (P)
10066	Norte	N	N	N	N	N	S (2)	S (M, Ir)	N	N
10100	Norte	N	N	N	N	N	N	S (P, M)	N	S (Avp)
10106	Norte	N	N	N	N	N	S (3)	S (Ir)	N	S (Tp)
10108	Norte	N	N	N	N	N	S (2)	S (Avm)	N	N
10110	Norte	N	N	N	N	N	S (3)	S (P, Tm)	N	N
10114	Norte	N	N	N	N	N	S (2)	S (P)	N	N
10119	Centro	N	N	N	N	N	S (2)	S (Avm)	N	S (Avm)
10121	Norte	N	N	N	N	N	N	S (Avp)	N	S (Tm)
10123	Norte	N	N	N	N	N	N	S (Avm, Tm)	N	N
10124	Norte	N	N	N	N	N	N	S (M)	N	N
10126	Norte	N	N	N	N	N	S (3)	S (P)	N	N
10128	Norte	N	N	N	N	N	S (2)	S (P)	N	N
Grupo de Adultos										
29271	Norte	Ex (19)	S (3)	N	N	N	S (1)	*	*	*
29279	Norte	S (12)	N	N	N	N	N	S (M, Irs, Prm)	N	S (Prm)
10015	Norte	N	N	N	N	N	S (1)	S (Irs)	N	N
10020	Norte	S (12)	N	S	N	N	N	S (Ir)	N	N
10022	Norte	*	*	*	*	*	*	N	N	S (Tm)
10028	Norte	N	N	S	N	N	N	S (P, Irs, S, F)	N	N
10039	Norte	N	N	N	N	N	N	S (F)	N	S (Ir)
10070	Norte	N	N	N	N	N	S (3)	S (M)	N	S (P, M)
10083	Centro	S (5)	S (14)	N	N	N	S (2)	S (M, F)	N	S (M)
10097	Centro	S (20)	N	N	N	N	S (5)	S (P, Irs)	N	S (P, Ir, Avp e Avm)

Legenda: P – Pai; M – Mãe; Ir – Irmão; Irs – Irmãos; Tm – Tio Materno; Tp – Tio Paterno; Tsm – Tios Maternos; Tsp – Tios Paternos; Avm – Avô ou Avó Materna; Avp – Avô ou Avó Paterno; N – Não ou Inexistente; S – Sim; F – Feminino; M – Masculino; Xant Td – Xantomas tendinosos; Xant – Xantomas; HiperC – Hipercolesterolemia; DCV – Doença Cardiovascular; EAM – enfarte de miocárdio; CABG (*Coronary artery bypass graft surgery*) – Cirurgia de revascularização do miocárdio; Ang – Angina de Peito; Angiop – Angioplastia; * Sem Informação do Médico Assistente; Exercício físico é contabilizado pelo número de vezes efectuado por semana. No caso dos fumadores ou ex-fumadores o número de cigarros fumados por dia encontra-se entre parêntesis. O número de consumo de bebidas alcoólicas encontra-se entre parêntesis, sendo 1 unidade equivalente a 1 copo.