

Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar: Apresentação do Estudo e Resultados Preliminares [76]

MAFALDA BOURBON, QUITÉRIA RATO, pelos Investigadores do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar
Unidade de Investigação Cardiovascular, Centro de Biopatologia, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal
Serviço de Cardiologia, Centro Hospitalar de Setúbal, E.P.E., Hospital de São Bernardo, Setúbal, Portugal

Rev Port Cardiol 2006; 25 (11): 999-1013

RESUMO

Introdução: A hipercolesterolemia familiar (FH) é uma patologia genética, autossómica dominante, causada na maioria dos casos pela ausência total ou parcial de receptores das lipoproteínas de baixa densidade (LDLR) funcionais. Mutações no gene LDLR levam ao aumento dos níveis de colesterol plasmático, o que provoca a sua deposição nas artérias e consequente incremento do risco de doença coronária prematura. A forma homozigótica da FH é rara, mas a heterozigótica é comum embora sub-diagnosticada em muitas populações, nomeadamente na portuguesa. Em 1999 iniciou-se no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge o Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar.

Objectivos: O objectivo do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar é a realização de um estudo epidemiológico para a determinação da prevalência e distribuição da Hipercolesterolemia Familiar em Portugal e a melhor compreensão da fisiopatologia da doença cardiovascular. O objectivo do presente trabalho é apresentar os critérios e a organização do estudo assim como os resultados preliminares.

Material e Métodos: A população do estudo são indivíduos de ambos os sexos, sem restrições etárias, com o diagnóstico clínico de FH, sendo efectuada a caracterização bioquímica e molecular. Os critérios clínicos utilizados para o diagnóstico de FH são adaptados de "Simon Broome Heart Research Trust". Este estudo engloba cinco fases: 1- selecção de indivíduos com o diagnóstico clínico de FH, 2- preenchimento de um questionário clínico e obtenção do

ABSTRACT

Portuguese Familial Hypercholesterolemia Study: Presentation of the Study and Preliminary Results

Introduction: Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant genetic disorder caused, in the majority of cases, by a partial or total lack of functional low density lipoprotein receptors (LDLR). Mutations in the LDLR gene lead to increased plasma cholesterol levels, resulting in cholesterol deposition in the arteries, thereby increasing the risk of premature coronary heart disease. The homozygous form of FH is rare but heterozygous FH is common, although underdiagnosed in many populations, including the Portuguese. In 1999 the Portuguese Familial Hypercholesterolemia Study was begun at the National Institute of Health.

Objectives: The aim of the Portuguese Familial Hypercholesterolemia Study is to perform an epidemiological study to determine the prevalence and distribution of FH in Portugal and to better understand the pathophysiology of coronary heart disease in these patients. The aim of the present work is to present the study's criteria and organization as well as its preliminary results.

Methods: The study population consists of individuals of both sexes and all ages with a clinical diagnosis of FH, with biochemical and molecular characterization being performed. The clinical criteria used for the diagnosis of FH were adapted from those of the Simon Broome Heart Research Trust. The study is organized in five stages: 1. selection

consentimento informado, 3- colheita de sangue, 4- caracterização bioquímica 5- estudo molecular englobando a pesquisa de mutações em três genes associados ao fenótipo de FH: *LDLR*, apolipoproteína B (*APOB*) e *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)*.

Resultados: Entre 1999 e Junho 2006 estudaram-se os genes *LDLR* e *ApoB* de 141 casos índice (38 crianças e 103 adultos). Em 78 destes casos índice (76 heterozigotos e dois homozigotos) foram encontradas 50 mutações diferentes no gene *LDLR* e em dois indivíduos foi detectada a mutação *ApoB*₃₅₀₀.

Foi também realizado o estudo do gene *PCSK9* dos indivíduos nos quais não foi detectada uma mutação nos genes *LDLR* e *APOB*, levando à identificação de 2 indivíduos com mutação neste gene. O estudo de 62 famílias levou à identificação adicional de 117 indivíduos com FH, 90 adultos e 27 crianças (86 adultos e 27 crianças/adolescentes com mutações no gene *LDLR*, dois com a mutação *ApoB*₃₅₀₀ e dois com mutação no gene *PCSK9*).

Conclusão: O diagnóstico molecular da FH permite a correcta identificação da patologia e fundamenta a instituição de terapêutica farmacológica mais agressiva e/ou precoce, com a consequente redução do risco cardiovascular nos indivíduos afectados. Actualmente o Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar tem a colaboração de treze clínicos, mas é de extrema importância a colaboração de mais médicos em todo o país, para que a prevalência e distribuição da FH na população portuguesa seja caracterizada e um maior número de indivíduos possa usufruir dos benefícios da terapêutica adequada e/ou precoce.

Palavras-Chave

Hipercolesterolemia familiar; Diagnóstico genético; Receptor das lipoproteínas de baixa densidade; Mutação; Doença coronária; Caso-índice

of individuals with a clinical diagnosis of FH; 2. completion of a clinical questionnaire and declaration of informed consent; 3. collection of blood samples; 4. biochemical characterization; 5. molecular study of three genes associated with the FH phenotype: *LDLR*, apolipoprotein B (*APOB*) and proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (*PCSK9*).

Results: Between 1999 and June 2006 the *LDLR* gene and the *APOB* gene of 141 index cases (38 children and 103 adults) were studied. In 78 of these index cases (76 heterozygotes and two homozygotes) 50 different mutations in the *LDLR* gene were identified, and two unrelated individuals were found to have the *ApoB*₃₅₀₀ mutation. The *PCSK9* gene was also studied in individuals in whom a mutation in the *LDLR* or *APOB* genes was not found, which identified two index cases with a mutation in this gene. The study of 62 families led to the identification of an additional 117 individuals with FH, 90 adults and 27 children (86 adults and 27 children with mutations in the *LDLR* gene, two adults with the *ApoB*₃₅₀₀ mutation, and two adults with a mutation in the *PCSK9* gene).

Conclusions: Genetic diagnosis enables correct identification of the disease and provides the basis for more aggressive pharmacologic therapeutic interventions to reduce cardiovascular risk in affected individuals. At present thirteen clinicians are collaborating in the Portuguese FH Study, but it is extremely important to obtain the collaboration of more physicians throughout the country, so that the prevalence and distribution of FH in the Portuguese population can be characterized and a greater number of individuals can benefit from appropriate and early therapy.

Key words

Familial hypercholesterolemia; Genetic diagnosis; Low-density lipoprotein receptor; Mutation; Coronary heart disease; Index case

INTRODUÇÃO

Hipercolesterolemia Familiar

A hipercolesterolemia familiar (FH) é uma patologia genética, autossômica dominante, com uma prevalência heterozigótica de 1:500 na maioria das populações europeias, o que a torna uma das patologias genéticas mais comuns⁽¹⁾. Num rastreio aleatório a metade dos utentes do ficheiro de um médico de família da Beira Litoral interior (752 utentes), 0,7% dos mesmos tinham um colesterol total superior a 350 mg/dL e triglicéridos inferiores a 200 mg/dl, o que faz suspeitar de hipercolesterolemia familiar nesta população específica⁽²⁾. Não encontramos na revisão da literatura estudos de FH realizados em amostras representativas da população portuguesa, ainda que só por critérios clínicos, que permitam determinar a sua prevalência no nosso país. Assim, e com base na prevalência encontrada na maioria das populações europeias, calcula-se que existam cerca de 20.000 casos de FH em Portugal. A FH homozigótica é rara, estimando-se que afecte uma pessoa num milhão.

A base molecular da hipercolesterolemia familiar foi descoberta nos anos 80 pelos investigadores Goldstein e Brown, que em 1985 ganharam o prémio Nobel da Medicina pelos seus estudos sobre a regulação do metabolismo do colesterol, incluindo a descoberta que a FH era causada pela ausência total ou parcial de receptores das lipoproteínas de baixa densidade funcionais⁽³⁾. Logo de seguida o gene LDLR foi isolado⁽⁴⁾ e as primeiras mutações neste gene foram descritas⁽⁵⁾. Desde então, esta patologia tem sido alvo de vários estudos, que têm contribuído para uma melhor compreensão da sua base molecular, assim como para o desenvolvimento do diagnóstico genético. Ao longo dos anos outros genes associados ao fenótipo de FH foram descobertos, como o gene da apolipoproteína B (*APOB*) e mais recentemente o gene *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9* (*PCSK9*).

Embora a FH seja uma das patologias genéticas mais comuns, não havia nenhum estudo epidemiológico ou registo desta patologia no nosso País, pelo que em 1999 no Centro de Biopatologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) se decidiu iniciar o presente estudo.

INTRODUCTION

Familial hypercholesterolemia

Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant genetic disorder, with the heterozygous form having a prevalence of 1:500 in most European populations, and so it is among the more common genetic disorders⁽¹⁾. In a random screening of half the patients on a family physician's register in the Beira Litoral region (752 patients), 0.7% had total cholesterol above 350 mg/dl and triglycerides below 200 mg/dl, which suggests the presence of familial hypercholesterolemia in this population⁽²⁾. We found no FH studies on representative samples of the Portuguese population in the literature, even measured by clinical criteria alone, that would enable its prevalence in Portugal to be determined. Based on the prevalence found in most other European populations, it is estimated that there are around 20,000 cases of FH in Portugal. Homozygous FH is rare, estimated at one per million.

The molecular basis of familial hypercholesterolemia was discovered in the 1980s by Goldstein and Brown, who won the Nobel Prize for Medicine in 1985 for their research on the regulation of cholesterol metabolism, including the discovery that FH was caused by a partial or total lack of functional low-density lipoprotein receptors (LDLR)⁽³⁾. The *LDLR* gene was then isolated⁽⁴⁾ and the first mutations described⁽⁵⁾. Since then, the disorder has been the subject of various studies that have contributed to a better understanding of its molecular basis and to the development of genetic diagnosis. Over the years, other genes associated with the FH phenotype have been discovered, such as apolipoprotein B (*APOB*) and more recently proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (*PCSK9*).

Although FH is among the most common genetic disorders, there had been no epidemiological study or registry of the pathology in Portugal, and so the Biopathology Center of the National Institute of Health (INSA) decided to set up the present study in 1999.

Clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia

The homozygous form of familial hypercholesterolemia is rare but heterozygous

Diagnóstico clínico da Hipercolesterolemia Familiar

A forma homozigótica da hipercolesterolemia familiar é rara, mas a heterozigótica é comum, se bem que sub-diagnosticada⁽⁶⁾, apesar de preencher os critérios da Organização Mundial de Saúde para programas de rastreio em larga escala⁽⁷⁾. A FH, causada por defeitos no gene do LDLR, e a Deficiência Familiar em ApoB (FDB), causada por defeitos no gene APOB (com uma frequência entre 1:200 a 1:1250 dependendo das populações), são clinicamente indistinguíveis, sendo actualmente englobadas no diagnóstico de hipercolesterolemia familiar^(8,9,10). No entanto, em geral, as manifestações clínicas da FDB são mais leves que as causadas por defeitos no gene do LDLR^(11,12).

A FH é caracterizada por níveis elevados de colesterol total e das LDL, acima do percentil 95% para o sexo e a idade, com valores de colesterol das lipoproteínas de alta densidade e de triglicéridos dentro da normalidade e uma história familiar de hipercolesterolemia e de doença cardiovascular prematura. Clinicamente a forma homozigótica da FH tem um fenótipo mais severo do que a heterozigótica⁽¹⁰⁾. O colesterol total na forma heterozigótica varia entre 290 e 500 mg/dL e na forma homozigótica habitualmente encontra-se entre os 600 mg/dL e os 1000 mg/dL⁽¹³⁾. O nível elevado de colesterol no plasma frequentemente resulta em depósitos de colesterol nos tecidos extravasculares, que por vezes podem ser facilmente identificados: xantomas, xantelasmas, arco corneano em indivíduos ainda jovens (abaixo dos 45 anos)⁽¹³⁾. A presença de xantomas tendinosos é geralmente considerada patognomónica da FH, pois embora eles possam estar presentes na hiperlipoproteinemia tipo III, na fitoesterolemia e na xantomatose cerebrotendinosa estas patologias são muito raras⁽¹⁴⁾. Os xantomas tendinosos são mais facilmente reconhecidos no tendão de Aquiles, onde causam irregularidades e o seu espessamento. Outra localização frequente é nos tendões extensores dos dedos das mãos. A ecografia do Tendão de Aquiles em casos suspeitos pode ter interesse, já que a medição da sua espessura apresenta uma boa sensibilidade e especificidade⁽¹⁵⁾. Na população portuguesa a presença de xantomas tendinosos parece ser semelhante à descrita na população espanhola

FH is common, albeit underdiagnosed⁽⁶⁾, despite meeting the World Health Organization criteria for large-scale screening programs⁽⁷⁾. FH, caused by defects in the *LDLR* gene, and familial defective ApoB (FDB), which is caused by defects in the APOB gene and has a prevalence of between 1:200 and 1:1250 depending on the population, are clinically indistinguishable and are both currently included under the diagnosis of familial hypercholesterolemia^(8, 9, 10). However, the clinical manifestations of FDB are generally milder than those caused by defects in the *LDLR* gene^(11, 12).

FH is characterized by high levels of total and LDL cholesterol, above the 95th percentile for sex and age, with normal levels of high density lipoprotein (HDL) cholesterol and triglycerides, and a family history of hypercholesterolemia and premature cardiovascular disease. Clinically, the homozygous form of FH has a more severe phenotype than the heterozygous form⁽¹⁰⁾. Total cholesterol in heterozygous FH ranges between 290 and 500 mg/dl, while in the homozygous form it is usually between 600 mg/dl and 1000 mg/dl⁽¹³⁾. Elevated plasma cholesterol levels frequently result in cholesterol deposition in extravascular tissues, which can be easily detected in some cases, resulting in xanthoma, xanthelasma, and corneal arcus in young adults (under 45)⁽¹³⁾. The presence of tendon xanthomas is generally considered diagnostic of FH, as although they can be due to type III hyperlipoproteinemia, phytosterolemia or cerebrotendinous xanthomatosis, these pathologies are extremely rare⁽¹⁴⁾. Tendon xanthomas are most easily detected on the Achilles tendon, which appears irregular and thickened. Another common location is on the finger tendons. Achilles tendon ultrasonography can be useful in suspected cases, since assessment of the tendon's thickness has high sensitivity and specificity⁽¹⁵⁾. The prevalence of tendon xanthomas in the Portuguese population appears to be similar to that found in Spain but is much lower than that reported in United Kingdom⁽¹⁶⁾. Xanthelasmas may be found in people with a normal lipid profile; they are not uncommon in the elderly, and arcus senilis is often found among those aged over 60⁽¹³⁾.

Differential diagnosis of FH from other causes of hypercholesterolemia, particularly common or polygenic hypercholesterolemia, is important

mas bastante menos frequente do que a referida na população inglesa⁽¹⁶⁾. Os xantelasmas podem encontrar-se em pessoas normolipidémicas e não são incomuns nos idosos, o arco senil encontra-se frequentemente em indivíduos acima dos 60 anos⁽¹³⁾.

A diferenciação da FH de outras causas de hipercolesterolemia, nomeadamente da hipercolesterolemia comum ou poligénica, assume o maior interesse por a FH se associar a um elevado risco de doença coronária prematura, não fatal e fatal, já que o indivíduo está exposto a elevados níveis de colesterol plasmático desde o nascimento⁽¹⁷⁻²⁰⁾. O aumento do colesterol plasmático leva ao incremento da deposição de partículas lipídicas nas artérias, dando origem a aterosclerose precoce⁽²¹⁾. O território coronário é o mais atingido, mas o território arterial periférico também é afectado⁽²²⁾. A associação entre FH e o aumento de risco para acidente vascular cerebral ainda é pouco clara⁽²²⁾. Nos indivíduos com FH homozigótica o ateroma da crossa da aorta e da válvula aórtica é a manifestação cardíaca mais frequente, podendo levar a um estreitamento da aorta ascendente e arco aórtico, bem como a estenose dos óstios das artérias coronárias⁽²⁰⁾. Em crianças com a forma homozigótica da patologia pode encontrar-se doença aterosclerótica massiva desde os primeiros meses de vida, e a doença cardiovascular começa na infância podendo levar à morte na primeira ou segunda décadas de vida, particularmente se o tratamento não for iniciado nos primeiros meses/anos de vida⁽²⁰⁾. Estudos recentes indicam que crianças com FH heterozigótica, a partir dos 12 anos de idade, já apresentam um aumento significativo da espessura da íntima-média das artérias carotídeas^(17,23).

Como a FH é uma patologia genética, autossómica dominante, os descendentes de um indivíduo afectado têm uma probabilidade de 50% de ter a patologia. É estimado que 5-10% dos doentes que sofrem um enfarte do miocárdio antes dos 55 anos de idade possam ter FH^(24,25), o que demonstra a importância do estudo desta patologia para a prevenção cardiovascular. De uma forma generalizada, considera-se que a melhor abordagem para a descoberta de novos casos é a que tem como base a investigação de familiares de casos conhecidos⁽²⁶⁾. O estudo de

since FH is associated with a high risk of premature coronary heart disease, which can be fatal, since affected individuals have been exposed to high plasma cholesterol levels since birth^(17, 18, 19, 20). Elevated plasma cholesterol leads to increased deposition of lipid particles in arteries, resulting in premature atherosclerosis⁽²¹⁾. The coronary territory is the most affected but peripheral arteries may also be involved⁽²²⁾. It is still unclear whether there is an association between FH and increased risk of stroke⁽²²⁾. The most common cardiac manifestation in individuals with homozygous FH is atheroma in the aortic arch or aortic valve, which can result in narrowing of the ascending aorta and aortic arch, as well as stenosis of the coronary artery ostia⁽²⁰⁾. Children with the homozygous form of the disorder may develop widespread atherosclerotic disease in the first months of life, and cardiovascular disease can begin in childhood and lead to death in the first or second decade of life, particularly if left untreated in the first months or years⁽²⁰⁾. Recent studies indicate that children with heterozygous FH present a significant increase in carotid artery intima-media thickness from the age of twelve^(17, 23).

Since FH is an autosomal dominant genetic disorder, descendants of an affected individual will have a 50% probability of developing the disease. It is estimated that 5-10% of patients who suffer myocardial infarction before the age of 55 have FH^(24, 25), which demonstrates the importance for cardiovascular prevention of screening for the disease. It is generally believed that the best way to detect new cases is to investigate relatives of known cases⁽²⁶⁾. Studying patients with premature cardiovascular disease and the children of patients who have died or suffer from premature cardiovascular disease, as well as screening 16-year-olds, have also been suggested as cost-effective strategies for early identification of these individuals^(26, 27). Genetic testing for the LDL receptor is seen as the most effective. However, diagnosis is generally based on a range of clinical and biochemical criteria and family history. There is no international agreement on the clinical criteria for a diagnosis of FH, with three systems currently in use: in the United States, the MEDPED (Make Early Diagnoses to Prevent Early Deaths in MEDical PEDigrees) system is used⁽²⁸⁾; in The Netherlands, a scoring system classifying FH as

doentes com doença cardiovascular prematura, os filhos de doentes que morrem ou sofrem prematuramente de doença cardiovascular ou o rastreio de jovens de 16 anos, têm sido também apontados como a estratégia mais custo-efectiva para a identificação precoce destes indivíduos^(26, 27). O teste genético para o receptor das LDL é visto como o mais eficaz. O diagnóstico é no entanto geralmente baseado num conjunto de critérios clínicos, bioquímicos e na história familiar. Não há acordo internacional na definição de critérios clínicos para o diagnóstico de FH, sendo utilizados habitualmente três sistemas. Nos Estados Unidos da América usa-se o sistema MEDPED (make early diagnosis, prevent early death on medical pedigrees)⁽²⁸⁾. Na Holanda um sistema de *score* definindo FH em “confirmada”, “provável” e “possível” (Dutch familial hypercholesterolaemia diagnostic system)⁽¹⁹⁾. No Reino Unido são utilizados os critérios do registo de FH de Simon Broome que estabelecem o diagnóstico de FH em “confirmada” ou “possível”^(29,30) (*Tabela I*). Os valores preditivo positivo e negativo destes diferentes sistemas não têm sido largamente comparados e dependem em parte dos critérios de selecção usados para o recrutamento dos indivíduos a rastrear⁽⁸⁾.

Diagnóstico molecular de Hipercolesterolemia Familiar

A FH é maioritariamente causada por defeitos no gene do receptor das lipoproteínas de baixa densidade (LDLR), cuja função é a remoção do colesterol LDL do plasma, entregando-o ao fígado para ser processado. Existe também outra forma de hipercolesterolemia familiar denominada Deficiência Familiar em Apo B (FDB) que é causada por defeitos no gene APOB. A ApoB é o único ligando da partícula LDL através do qual esta partícula se liga ao receptor das LDL⁽¹⁾. Quando o gene que codifica para este ligando se encontra mutado dá origem a uma ApoB deficiente, à qual o receptor das LDL não se consegue ligar. Mutações neste gene levam também à acumulação de colesterol no plasma, tendo as mesmas consequências clínicas que a FH. Enquanto que já foram descritas mais de 900 mutações no gene LDLR nas mais diversas populações (base de dados www.fh.ucl.uk/fh) a maioria dos doentes com FDB apresentam normalmente uma das quatro mutações mais

“confirmed”, “probable” or “possible” (familial hypercholesterolemia diagnostic criteria of the Dutch Lipid Clinic Network) is employed⁽¹⁹⁾; and the United Kingdom uses the criteria defined by the Simon Broome Register, which establish a diagnosis of FH as “confirmed” or “possible”^(29,30) (*Table I*). The positive and negative predictive values of these different systems have not been thoroughly compared and they depend partly on the selection criteria used to recruit the individuals to be screened⁽⁸⁾.

Genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia

FH is caused in most cases by defects in the *LDLR* gene, whose function is to remove LDL cholesterol from plasma and deliver it to the liver for processing. There is another form of familial hypercholesterolemia called familial defective apolipoprotein B (FDB), which is caused by defects in the *APOB* gene. ApoB is the only ligand of the LDL particle that can bind to the LDL receptor⁽¹⁾. If the gene that codes for this ligand is mutated, it leads to defective ApoB, which cannot bind to the LDL receptor. Mutations in this gene also result in accumulation of cholesterol in plasma, which has the same clinical consequences as FH. Although more than 900 mutations have been described for the *LDLR* gene in a wide variety of populations (database at www.fh.ucl.uk/fh), most patients with FDB present one of the four most frequent *APOB* mutations, ApoB₃₅₀₀ being the most common⁽³¹⁾. Another gene associated with the FH phenotype was discovered in 2004, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9⁽³²⁾. This gene codes for the protein with the same name, whose function has yet to be determined; it is known only that it is strongly expressed in the liver, where it appears to perform some role in cholesterol homeostasis. So far seven different mutations have been described in this gene^(32,33,34) in patients in whom no mutations in *LDLR* or *APOB* had been detected, and which may explain their hypercholesterolemia. Thus, genetic diagnosis of FH is currently based on the search for mutations in these three genes: *LDLR*, *APOB* and *PCSK9*.

Tabela I

Crítérios de FH adaptados de “Simon Broome Heart Research Trust”

<p>Hipercolesterolemia Familiar confirmada é definida como:</p> <p>(a) Caso-índice: Criança menor de 16 anos com colesterol total acima de 200 mg/dL (5.20 mmol/L) ou colesterol LDL acima de 120 mg/dL (3.10 mmol/L); Caso-índice: Adulto com colesterol total acima de 290 mg/dL (7.5 mmol/L) ou colesterol LDL acima de 190mg/dL (4.9 mmol/L), e</p> <p>(b) Xantomas tendinosos no caso-índice ou familiar (pais, filhos, avós, irmãos, tios) ou</p> <p>(c) Evidência genética de mutação no gene receptor de LDL ou ApoB</p>
<p>Hipercolesterolemia Familiar possível é definida como:</p> <p>(a) Caso-índice: Criança menor de 16 anos com colesterol total acima de 200 mg/dL (5.20 mmol/L) ou colesterol LDL acima de 120 mg/dL (3.10 mmol/L); Caso-índice: Adulto com colesterol total acima de 290 mg/dL (7.5 mmol/L) ou colesterol LDL acima de 190mg/dL (4.9 mmol/L), e</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 (7,5 mmol/L) nos avós e/ou tios.</p>

Table I

FH criteria adapted from those of the Simon Broome Heart Research Trust

<p>Confirmed familial hypercholesterolemia is defined as:</p> <p>(a) Index case: Child under 16 with total cholesterol over 200 mg/dl (5.20 mmol/l) or LDL cholesterol over 120 mg/dl (3.10 mmol/l); Index case: Adult with total cholesterol over 290 mg/dl (7.5 mmol/l) or LDL cholesterol over 190 mg/dl (4.9 mmol/l), and</p> <p>(b) Tendon xanthoma in the index case or relative (parents, children, grandparents, siblings, aunts or uncles), or</p> <p>(c) Genetic evidence of a mutation in the LDL receptor gene or <i>APOB</i></p>
<p>Possible familial hypercholesterolemia is defined as:</p> <p>(a) Index case: Child under 16 with total cholesterol over 200 mg/dl (5.20 mmol/l) or LDL cholesterol over 120 mg/dl (3.10 mmol/l); Index case: Adult with total cholesterol over 290 mg/dl (7.5 mmol/l) or LDL cholesterol over 190 mg/dl (4.9 mmol/l), and</p> <p>(d) Family history of myocardial infarction before the age of 50 in grandparents or aunts or uncles, or before the age of 60 in parents, siblings or children, and/or family history of elevated cholesterol levels (>290 mg/dl) in parents, siblings or children; or total cholesterol over 290 mg/dl (7.5 mmol/l) in grandparents and/or aunts or uncles.</p>

comuns no gene da APOB, sendo a mutação ApoB₃₅₀₀ a mais comum⁽³¹⁾. Em 2004 foi descoberto outro gene associado ao fenótipo de hipercolesterolemia familiar, o gene PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type

OBJECTIVES

The Portuguese Familial Hypercholesterolemia Study is an epidemiological study aimed at determining the prevalence and

9)⁽³²⁾. Este gene codifica para uma proteína com o mesmo nome e cuja função é ainda desconhecida, sabendo-se somente que esta é uma proteína com alta expressão no fígado, onde se pensa que desempenhará alguma função na homeostase do colesterol. Cerca de sete mutações diferentes já foram descritas neste gene⁽³²⁻³⁴⁾ em doentes nos quais não tinham sido detectadas mutações nos genes *LDLR* e *APOB* e que possivelmente explicam a sua hipercolesterolemia. Assim, actualmente o diagnóstico molecular da FH realiza-se pela pesquisa de mutações nestes três genes: *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*.

OBJECTIVOS DO ESTUDO

O objectivo do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar é a realização de um estudo epidemiológico para a determinação da prevalência e distribuição da Hipercolesterolemia Familiar em Portugal e melhorar a compreensão da fisiopatologia da doença cardiovascular. O objectivo do presente trabalho é apresentar os critérios e a organização do estudo assim como os resultados preliminares.

MATERIAIS E MÉTODOS

A população do estudo são indivíduos de ambos os sexos, sem restrições etárias, com o diagnóstico clínico de FH, sendo efectuada a caracterização bioquímica e molecular. A metodologia que se passa a indicar mantém-se em curso, já que o estudo continua a decorrer.

Organização do estudo

1. Seleção de indivíduos com o diagnóstico clínico de FH de acordo com os critérios apresentados na *tabela I*. Estes critérios foram adaptados de “Simon Broome Heart Research Trust”⁽²⁹⁾.

2. Preenchimento de um questionário clínico pelo médico assistente para cada caso-índice e cada familiar. O médico assistente após a necessária explicação, obtém dos indivíduos que recruta para o estudo (caso-índice e familiares) o seu consentimento informado, sendo assinada a respectiva declaração (no caso de menores de

distribuição de FH in Portugal and improving understanding of the pathophysiology of coronary heart disease. The aim of the present work is to present the study's criteria and organization as well as its preliminary results.

METHODS

The study population consists of individuals of both sexes and all ages with a clinical diagnosis of FH, with biochemical and molecular characterization being performed. The methodology described below is still being used as the study continues.

Study organization

1. Selection of individuals with a clinical diagnosis of FH according to the criteria given in Table I, which were adapted from those of the Simon Broome Heart Research Trust⁽²⁹⁾.

2. Completion of a clinical questionnaire by the attending physician for each index case and each relative. After explaining the study, the physician obtains informed consent from those recruited (index cases and relatives) by means of a signed declaration (in the case of minors, the declaration is signed by the parents). A confidential number is allocated to all samples. Steps are being taken to ensure that the study's computerized database conforms to legal requirements.

3. Collection of blood samples performed as described in *Table II*. The maximum time interval between collection of samples and analysis is two days, which means the sample must be sent for analysis immediately after collection. This condition is of the utmost importance for the study. The samples are sent by express post to the National Institute of Health, for the attention of the Portuguese Familial Hypercholesterolemia Study, appropriately packaged in a padded envelope, or alternatively, sample collection can be performed at the Institute by prior appointment. Whenever possible, samples from relatives with or without suspected FH are collected at the same time for subsequent family studies.

4. Biochemical characterization performed by the Clinical Chemistry Laboratory (CBP, INSA). This includes measurement of total and HDL cholesterol, triglycerides and LDL cholesterol.

idade a declaração é assinada pelos pais). A todas as amostras é atribuído um número confidencial. Encontra-se em fase de legalização a base de dados informatizada referente a este estudo.

3. Colheita de sangue realizada de acordo com a *Tabela II*. 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 o estudo. As amostras são enviadas em correio azul para o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, a/c Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar, em envelope almofadado e bem acondicionadas ou, opcionalmente, a colheita é realizada no Instituto após marcação prévia. Sempre que possível é feita a colheita simultânea a familiares com e sem suspeita de FH para posterior realização dos estudos familiares.

Whenever possible, levels of apolipoprotein AI (ApoAI), ApoB and lipoprotein(a) are also determined.

The results are sent to the attending physician within two to five days of sample receipt or collection.

5. Genetic study performed by the Cardiovascular Research Unit (CBP, INSA). This consists of the search for mutations in the LDLR gene and of the four most common mutations in the *APOB* gene. The *PCSK9* gene has also been studied since 2005. Access to samples from relatives with or without suspected FH is essential in confirming the results of genetic study in the index case, which is why it is advisable to collect samples from relatives at the same time as the index case. Only after such confirmation are the results of genetic study sent to the attending physician, within one to four

Tabela II

Condições da colheita das amostras

1.1.1.1 <u>Caso-índice</u> (as colheitas devem ser realizadas após jejum de 12 horas) Adultos: 4 mL de sangue em tubo seco - separar e enviar só o soro 10 mL (2x5mL) de sangue em tubos de EDTA Crianças: 2 mL de sangue em tubo seco - separar e enviar só o soro 6 mL (2x3mL) de sangue em tubos de EDTA
1.1.1.2 <u>Familiares</u> do caso-índice (as colheitas devem ser realizadas após jejum de 12 horas) 4 mL de sangue em tubo seco - separar e enviar só o soro 5 mL de sangue em tubos de EDTA

Table II

Conditions for collection of samples

<u>Index case</u> (samples must be collected after 12 hours fasting) Adult: 4 ml blood in a dry tube - separate and send serum only 10 ml (2x5ml) blood in tubes with EDTA Child: 2 ml blood in a dry tube - separate and send serum only 6 ml (2x3ml) blood in tubes with EDTA
<u>Relatives of index case</u> (samples must be collected after 12 hours fasting) 4 ml blood in a dry tube - separate and send the serum only 5 ml blood in a tube with EDTA

4. Caracterização bioquímica realizada no Laboratório de Química Clínica (CBP, INSA). A caracterização bioquímica é realizada através da determinação dos valores de colesterol total, colesterol das lipoproteínas de alta densidade (HDL), trigliceridos e colesterol das LDL. Sempre que possível os valores da apolipoproteína AI (ApoAI), ApoB e lipoproteína (a) (Lp (a)) são também determinados.

Os resultados são enviados ao médico assistente no prazo máximo de dois a cinco dias, após a recepção das amostras ou efectivação da colheita.

5. Estudo molecular - realizado na Unidade de Investigação Cardiovascular (CBP, INSA). Este estudo é efectuado através da pesquisa de mutações do gene LDLR e também pela pesquisa das quatro mutações mais comuns no gene da APOB. A partir de 2005 o estudo do gene PCSK9 também passou a ser efectuado. A existência de amostras de familiares com e sem suspeita de FH é um factor essencial para confirmação do resultado molecular no caso-índice, razão pela qual é aconselhável a colheita de amostras de familiares juntamente com o caso-índice. Só após esta confirmação é que o resultado do estudo é enviado para o médico assistente no prazo de 1 a 4 meses, podendo variar conforme a existência de financiamento externo. Este é um estudo de investigação, gratuito para os casos-índice e familiares, financiado em parte pelo próprio Instituto, mas que, como todos os estudos de investigação, depende de financiamento externo.

RESULTADOS

Até Junho de 2006 estudaram-se os genes LDLR e APOB de 141 indivíduos (38 crianças e 103 adultos) (Tabela III) com diagnóstico clínico de FH. Dos 141 indivíduos estudados 78 apresentam uma mutação no gene LDLR (20 crianças e 58 adultos), 2 adultos apresentam a mutação APOB₃₅₀₀ no gene da APOB, e outros 2 adultos apresentam uma mutação no gene PCSK9 (Tabela III). No gene da LDLR foram encontradas 50 mutações diferentes, 19 destas mutações não foram descritas anteriormente, sendo actualmente exclusivas da nossa população. Identificou-se dois casos índice homozigotos, embora um seja

months, depending on availability of external funding. This is a research project, which is free of charge to index cases and their relatives and is partly financed by the Institute, but, as with all research studies, depends on external funding.

RESULTS

Up until June 2006 the LDLR and APOB genes had been studied in 141 individuals (38 children and 103 adults) (Table III) with a clinical diagnosis of FH. Of these 141, 78 (20 children and 58 adults) had a mutation in the LDLR gene, two adults had the APOB₃₅₀₀ mutation, and another two adults had a mutation in the PCSK9 gene (Table III). Fifty different mutations were identified in the LDLR gene, 19 of which had not been previously described and are at present exclusive to our study population. Two index cases of homozygous FH were identified, although one of them was a compound heterozygote, with two different mutations in different alleles of the LDLR gene. The study of 62 families led to the identification of an additional 117 individuals with FH (90 adults and 27 children) (Table IV). Of these 117 relatives, 113 had mutations in the LDLR gene, two adults had the ApoB₃₅₀₀ mutation and two adults a mutation in the PCSK9 gene (Table IV).

Table III

III Distribution of index cases recruited for the study, by age-group and mutations in the genes studied

Age-group	No. of ICs studied	No. of ICs with LDLR mutation	No. ICs with APOB mutation	No. ICs with PCSK9 mutation
<18	38	20	0	0
>18	103	58	2	2

IC: index case; <18: children and adolescents; >18: adults

Table IV

Distribution of all individuals recruited for the study (index cases and relatives), by age-group and mutations in the genes studied

Age-group	No. of ICs+Rs	No. of ICs+Rs with LDLR mutation	No. of ICs+Rs with APOB mutation	No. of ICs+Rs with PCSK9 mutation
<18	38+65	20+27	0	0
>18	103+284	58+86	2+2	2+2

IC: index case; R: relative; <18: children and adolescents; >18: adults

um heterozigoto composto, ou seja, com duas mutações diferentes em alelos diferentes do gene LDLR. Estudos familiares de 62 famílias levaram à identificação adicional de 117 indivíduos com FH, (90 adultos e 27 crianças) (Tabela IV). Destes 117 familiares, 113 apresentavam mutações no gene LDLR, dois a mutação ApoB₃₅₀₀ e dois uma mutação no gene PCSK9 (Tabela IV).

Tabela III

Distribuição dos casos índice recebidos para o estudo por grupo etário e mutações encontradas nos diferentes genes estudados

Grupo etário	Nº de CI estudados	Nº CI com mutação LDLR	Nº CI com mutação APOB	Nº CI com mutação PCSK9
<18	38	20	0	0
>18	103	58	2	2

CI, caso índice; < 18, crianças e adolescentes; >18, adultos

Tabela IV

Distribuição de todos os indivíduos recebidos para o estudo (casos índice e familiares) por grupo etário e mutações encontradas nos diferentes genes estudados

Grupo etário	Nº CI+F recebidos	Nº CI+F com mutação LDLR	Nº CI+F com mutação APOB	Nº CI+F com mutação PCSK9
<18	38+65	20+27	0	0
>18	103+284	58+86	2+2	2+2

CI, caso índice; F, familiares; < 18, crianças e adolescentes; >18, adultos

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os critérios clínicos de hipercolesterolemia familiar usados neste estudo foram adaptados de “Simon Broome Heart Research Trust” uma vez que este trabalho foi iniciado em colaboração com o laboratório do Medical Reserach Council, Lipoprotein Group, Hammersmith Hospital, Londres, UK, que usa aqueles critérios⁽¹⁶⁾. Além disso os outros dois sistemas descritos comparativamente não têm demonstrado benefícios significativos, pelo que se decidiu manter os critérios escolhidos inicialmente. Os métodos para a análise molecular da FH estão estabelecidos em Portugal e apenas o teste para a pesquisa de grandes rearranjos no gene LDLR ainda é efectuado no laboratório de Londres, mas brevemente também passará a ser efectuado no

DISCUSSION AND CONCLUSION

The clinical criteria for familial hypercholesterolemia used in this study were adapted from those of the Simon Broome Heart Research Trust, as the project was begun in collaboration with the Medical Research Council Laboratory, Lipoprotein Group, Hammersmith Hospital, London, which uses these criteria⁽¹⁶⁾. Comparison of the other two systems referred to above has not shown them to have significant advantages, and so it was decided to keep to the criteria initially chosen. Molecular analysis methods for FH are available in Portugal and only the test for large rearrangements in the LDLR gene are still performed by the London laboratory, but this too will soon be performed in the Cardiovascular Research Unit laboratory (CBP, INSA).

Four hundred and ninety individuals, including index cases and relatives with or without a clinical diagnosis of FH, are currently enrolled in the Portuguese Familial Hypercholesterolemia Study. Genetic study has identified a total of 199 individuals with FH (82 index cases and 117 relatives). It was only possible to perform a family study for two-thirds of the subjects with a clinical diagnosis of FH, and in most cases only close relatives. The cooperation of family members can be difficult to obtain, and this is one of the problems of the study. Nevertheless, genetic study of relatives of affected individuals is undoubtedly the most cost-effective method of detecting new cases of familial hypercholesterolemia and several countries have already begun cascade screening programs^(35, 36, 37).

Analyzing the results by age-group, a total of 47 children and adolescents (under 18 years of age) were diagnosed with heterozygous FH, and 152 adults were diagnosed with FH, of whom 150 had the heterozygous form and two the homozygous form. The two cases with homozygous FH are the first to be reported among the Portuguese population. Interestingly, these individuals do not present the typical phenotype of patients with homozygous FH, but are similar to that of individuals with heterozygous FH, which seems to indicate a positive effect of environmental or genetic factors. The two index cases with the APOB₃₅₀₀ mutation are the first to be reported in the Portuguese literature. The

Laboratório da Unidade de Investigação Cardiovascular, CBP, INSA .

Quatrocentos e noventa indivíduos, entre casos-índice e familiares, com e sem diagnóstico clínico de FH, estão inscritos no Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar. O estudo molecular levou à identificação de um total de 199 indivíduos com FH (82 casos-índice e 117 familiares). Só foi possível realizar o estudo familiar de 2/3 dos indivíduos com diagnóstico clínico de FH, e na maioria dos casos apenas da família nuclear. A colaboração dos familiares parece ser difícil de obter, o que é uma das dificuldades do estudo. Não obstante, o estudos dos familiares de indivíduos afectados é sem dúvida o método mais custo-efectivo para a detecção de novos casos de hipercolesterolemia familiar e vários países começaram já a realizar programas de “*cascade screening*”⁽³⁵⁻³⁷⁾.

Analisando os resultados por grupos etários, no total diagnosticaram-se 47 crianças e adolescentes (menos de 18 anos de idade) com FH heterozigótica e 152 adultos com FH, sendo que 150 têm FH heterozigótica e 2 têm FH homozigótica. Os dois casos-índice de FH homozigótica são os primeiros descritos na população portuguesa. Curiosamente estes indivíduos não apresentam o fenótipo característico de doentes com FH homozigótica, assemelhando-se o seu fenótipo ao de indivíduos com FH heterozigótica, o que parece indicar uma modulação positiva por factores ambientais ou genéticos. Os dois caso-índice com a mutação APOB₃₅₀₀ são os primeiros descritos na literatura portuguesa. A mutação encontrada no gene PCSK9 de dois indivíduos com o diagnóstico clínico de FH é uma mutação ainda não descrita na literatura, sendo actualmente exclusiva da nossa população. Os 59 indivíduos no quais não foi possível detectar uma mutação nos três genes estudados poderão ter uma mutação noutra gene ainda não descrito ou podem ter hipercolesterolemia poligénica ou mesmo dislipidemia familiar combinada, já que a história familiar da maioria destes indivíduos sugere a presença de uma doença hereditária. O facto de não ter sido detectada uma mutação existente num dos três genes estudados é uma hipótese que não pode ser ignorada, mas os métodos laboratoriais são cada vez mais fiáveis e a evolução da técnica limita bastante estes erros.

mutation found in the *PCSK9* gene of two patients with a clinical diagnosis of FH has not been previously described in the literature, and is to date exclusive to our study population. The 59 individuals in whom no mutation was detected in the three genes studied may have mutations in other genes that have not yet been identified or they may have polygenic hypercholesterolemia or familial compound hyperlipidemia, since the family history of most of these individuals would suggest the presence of inherited disease. The possibility that a mutation in one of the three genes studied was not in fact detected cannot be discounted, but laboratory methods are increasingly reliable and advances in the technique used mean such errors are very uncommon.

The results presented here are preliminary findings from a wider epidemiological study still in progress. At present thirteen clinicians are collaborating in the study, but it is hoped that all interested physicians will participate so that a greater number of individuals can benefit from genetic diagnosis and the prevalence and distribution of FH in the Portuguese population can be better characterized. The aim of this work is to highlight the clinical importance of distinguishing between hereditary and non-hereditary hypercholesterolemia, since individuals with the inherited form are exposed to high cholesterol levels from birth and therefore have an increased risk of premature cardiovascular disease. Genetic study provides an accurate diagnosis as well as early detection of FH in relatives, thus enabling appropriate therapy to be instituted. Prompt and accurate diagnosis is extremely important in cardiovascular disease prevention as it provides the basis for earlier and/or more aggressive therapeutic measures, which have been shown to be effective in reducing cardiovascular morbidity and mortality in adults and children^(17, 18, 19).

The study of familial hypercholesterolemia is also extremely important in socioeconomic terms for families and society in general. Early diagnosis and appropriate treatment can significantly reduce the number of cardiovascular events and prevent premature death, which have a heavy impact on families and society. Health authorities increasingly stress to the medical community and the general population the costs of medical interventions,

Os resultados preliminares agora apresentados são os primeiros a ser divulgados de um estudo epidemiológico mais alargado ainda em curso. Este estudo até agora contou com a colaboração de 13 médicos, mas pretende-se que todos os clínicos interessados participem no mesmo, para que um maior número de indivíduos possa usufruir dos benefícios do diagnóstico molecular e a prevalência e distribuição da FH na população portuguesa seja melhor caracterizada. Pretende-se com este trabalho chamar a atenção para a importância clínica da distinção entre uma hipercolesterolemia hereditária e uma hipercolesterolemia não hereditária, uma vez que os indivíduos com hipercolesterolemia hereditária estão expostos a concentrações altas de colesterol desde o nascimento, havendo por isso um risco acrescido de doença cardiovascular prematura. O diagnóstico molecular da FH permite o diagnóstico correcto da mesma e possibilita também a identificação precoce de familiares com FH, permitindo a sua adequada orientação terapêutica. O diagnóstico correcto e atempado tem elevada importância na prevenção da doença cardiovascular, pois fundamenta a introdução de medidas terapêuticas mais precoces e/ou agressivas, que se têm mostrado efectivas na redução da morbidade e mortalidade cardiovascular em adultos e crianças⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

O estudo da hipercolesterolemia familiar tem também grande importância no contexto sócio económico das famílias e da sociedade. O diagnóstico atempado e a terapêutica adequada podem reduzir significativamente o número de eventos cardiovasculares e evitar mortes prematuras, o que tem custos familiares e sociais muito importantes. As autoridades de saúde chamam cada vez mais a atenção da comunidade médica e da população em geral para os custos das intervenções em saúde, sejam elas farmacológicas ou outras, já que os recursos são limitados e há que optimizá-los. Um estudo de viabilidade económica efectuado pelo grupo espanhol para o estudo da hipercolesterolemia familiar (www.colesterolfamiliar.com) demonstrou ser mais custo-efectivo identificar e tratar os indivíduos com hipercolesterolemia familiar, durante vários anos e com terapêutica adequada para baixar os níveis de colesterol, do que não os tratar, pois mais cedo ou mais tarde estes

pharmacological or otherwise, since resources are limited and must be optimized. An economic viability study carried out by the Spanish familial hypercholesterolemia study group (www.colesterolfamiliar.com) demonstrated that it is more cost-effective to identify and treat FH with appropriate cholesterol-lowering therapy over several years than to leave it untreated, since these individuals will very probably require coronary revascularization sooner or later, as well as having an increased risk of premature death, thus depriving society of potentially useful members.

The Portuguese Familial Hypercholesterolemia Study is run by the Cardiovascular Research Unit of the Center for Biopathology of the Portuguese National Institute of Health, with Dr. Mafalda Bourbon as coordinator and Dr. Quitéria Rato as clinical consultant. Genetic Study: Dr. Mafalda Bourbon (head researcher), Dr. Ana Catarina Alves (research assistant), Dr. Ana Margarida Medeiros and Dr. Sónia Silva (research trainees) - Cardiovascular Research Unit, CBP, INSA, Lisbon. Clinical Researchers: Prof. António Guerra, Serv. de Pediatria, Hosp. de S. João, E.P.E., Porto; Dr. António Furtado, Serv. de Med. Interna, Hosp. Pedro Hispano, Matosinhos; Prof. José Manuel Silva, Serv. de Med. Interna, HUC, Coimbra; Prof. Graça Morais, Dept. de Bioquímica, Fac. de Ciências Médicas, UNL, Lisbon; Prof. Helófsa Santos, Dr. Isabel Mendes Gaspar, Serv. de Genética, Hosp. de Santa Maria, E.P.E., Lisbon; Dr. Ana Gaspar, Serv. de Pediatria, Hosp. de Santa Maria, E.P.E., Lisbon; Dr. Pedro Marques da Silva, Serv. de Med. Interna, Hosp. de Santa Marta, E.P.E., Lisbon; Dr. João Sequeira Duarte, Serv. de Endocrinologia, Hosp. de Egas Moniz, Lisbon; Dr. Sílvia Sequeira, Serv. Doenças Metabólicas, Hosp. D. Estefânia, Lisbon; Dr. Quitéria Rato, Serv. de Cardiologia, Centro Hospitalar de Setúbal, E.P.E., Hospital de São Bernardo, Setúbal; Dr. Mário Amaro, Serv. Medicina Interna, Hospital Garcia da Orta, Almada; Dr. Isabel Azevedo, Serv. de Medicina Interna I, Hosp. dos Marmeleiros, Funchal.

indivíduos são sérios candidatos a revascularização coronária, além do risco acrescido de morte prematura em indivíduos potencialmente activos para a sociedade.

O Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar é promovido pela Unidade de Investigação Cardiovascular do Centro de Biopatologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, que tem como coordenadora a Doutora Mafalda Bourbon e consultora clínica a Dra. Quitéria Rato. Investigação Molecular: Doutora Mafalda Bourbon (investigadora responsável), Dra Ana Catarina Alves (assistente de investigação), Dra Ana Margarida Medeiros e Dra Sónia Silva (estagiárias de investigação) - Unidade de Investigação Cardiovascular, CBP, INSA Lisboa. Investigação Clínica: Prof. Doutor António Guerra, Serv. de Pediatria, Hosp. de S. João, E.P.E., Porto; Dr. António Furtado, Serv. de Med. Interna, Hosp. Pedro Hispano, Matosinhos; Prof. Doutor José Manuel Silva, Serv. de Med. Interna, HUC, Coimbra; Profª Doutora Graça Morais, Dept. de Bioquímica, Fac. de Ciências Médicas, UNL, Lisboa; Profa. Heloisa Santos, Dra Isabel Mendes Gaspar, Serv. de Genética, Hosp. de Santa Maria, E.P.E., Lisboa; Dra. Ana Gaspar Serv. de Pediatria, Hosp. de Santa Maria, E.P.E., Lisboa; Dr. Pedro Marques da Silva, Serv. de Med. Interna, Hosp. de Santa Marta, E.P.E., Lisboa; Dr. João Sequeira Duarte, Serv. de Endocrinologia, Hosp. de Egas Moniz, Lisboa; Dra. Sílvia Sequeira, Serv. Doenças Metabólicas, Hosp. D. Estefânia, Lisboa; Dra. Quitéria Rato, Serv. de Cardiologia, Centro Hospitalar de Setúbal, E.P.E., Hospital de São Bernardo, Setúbal; Dr. Mário Amaro, Serv. Medicina Interna, Hospital Garcia da Orta, Almada; Dra. Isabel Azevedo, Serv. de Medicina Interna I, Hosp. dos Marmeleiros, Funchal.

Pedidos de separatas para:

Address for reprints:

MAFALDA BOURBON

Unidade de Investigação Cardiovascular

Centro de Biopatologia

Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

Av. Padre Cruz, 1649-016 LISBOA

E-mail: mafalda.bourbon@insa.min-saude.pt

BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. Goldstein JL, Hobbs H, Brown MS. Familial Hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7th ed. New York: McGraw-Hill 1995; 1981-2030.
2. Silva JM. Colesterol, Lípidos e Doença Vascular. Lisboa: LIDEL, Lda. 2000; 38-39.
3. Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, Schneider WJ. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol* 1985; 1:1-39.
4. 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.
5. 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):140-6.
6. 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.
7. WHO - Human Genetics DoNDP. Familial hypercholesterolaemia: report of a second WHO Consultation. Geneva: WHO; 1999.
8. Hadfield SG, Humpries SE. Implementation of cascade testing for the detection of familial hypercholesterolaemia. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16:428-33.
9. Marais AD, Firth JC. The diagnosis and management of familial hypercholesterolaemia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2005; 9(3):141-9.
10. Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGE prevalence review. *Am J Epidemiol* 2004; 160(5): 407-20.
11. Fouchier SW, Defesche JC, Kastelein JJ, Sijbrands EJ. Familial defective apolipoprotein B versus familial hypercholesterolemia: an assessment of risk. *Semin Vasc Med* 2004; 4(3): 259-64.
12. Garcia-Alvarez I, Castillo S, Mozas P et al Grupo de Estudio de la Hipercolesterolemia Familiar. Differences in clinical presentation between subjects with a phenotype of familial hypercholesterolemia determined by defects in the LDL-receptor and defects in Apo B-100. *Rev Esp Cardiol* 2003; 56(8):769-74.
13. Betteridge DJ. Lipids and Vascular Disease. Current Issues. Martin Dunitz Ltd, London, 2000; 65-75.
14. Cruz PD, East C, Bergstresser PR. Dermal, subcutaneous and tendon xanthomas: diagnostic markers for specific lipoprotein disorders. *J Am Acad Dermatol* 1988; 19:95-111.

15. Descamps OS, Leysen X, Van Leuven F, Heller FR. The use of Achilles tendon ultrasonography for the diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2001; 60:38-41.
16. Bourbon M. Characterization of Molecular Defects in Portuguese Patients with Familial Hypercholesterolaemia. Thesis submitted for the Degree of Doctor of Philosophy, Faculty of Medicine, Imperial College, University of London, 2005.
17. Rodenburg J, Vissers MN, Wiegman A, Trip MD, Bakker HD, Kastelein JJ. Familial hypercholesterolemia in children. *Curr Opin Lipidol* 2004; 15:405-11.
18. Marks D, Thorogood M, Neil HA, Humphries SE. A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 2003; 168(1):1-14.
19. Defesche JC, Lansberg PJ, Umans-Eckenhausen MA, Kastelein JJ. Advanced method for the identification of patients with inherited hypercholesterolemia. *Semin Vasc Med* 2004; 4(1):59-65.
20. Naoumova RP, Thompson GR, Soutar AK. Current management of severe homozygous hypercholesterolaemias. *Curr Opin Lipidol* 2004; 15:413-22.
21. Thompson GR. *A Handbook of Hyperlipidaemia*. London: Current Science Ltd. 1989.
22. Hutter CM, Austin MA, Humphries SE. Familial hypercholesterolemia, peripheral arterial disease, and stroke: a HuGE minireview. *Am J Epidemiol* 2004; 160(5):430-5.
23. Wiegman A, de Groot E, Hutten BA, Rodenburg J, Gort J, Bakker HD, Sijbrands EJ, Kastelein JJ. Arterial intima-media thickness in children heterozygous for familial hypercholesterolaemia. *Lancet* 2004; 363(9406):342-3.
24. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992; 1(6):445-66.
25. Humphries S, King-Underwood L, Gudnason V, Seed M, Delattre S, Clavey V, Fruchart JC. Six DNA polymorphisms in the low density lipoprotein receptor gene: their genetic relationship and an example of their use for identifying affected relatives of patients with familial hypercholesterolaemia. *J Med Genet* 1993; 30(4):273-9.
26. Marks D, Wonderling D, Thorogood M, Lambert H, Humphries SE, Neil HA. Screening for hypercholesterolaemia versus case finding for familial hypercholesterolaemia: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health Technol Assess* 2000; 4(29):1-123.
27. Neil HA, Huxley RR, Hawkins MM, Durrington PN, Betteridge DJ, Humphries SE. Comparison of the risk of fatal coronary heart disease in treated xanthomatous and non-xanthomatous heterozygous familial hypercholesterolaemia: a prospective registry study. *Atherosclerosis* 2003; 170(1):73-8.
28. 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;72:171-76.
29. Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register. Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. *BMJ* 1991; 303:893-896.
30. Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. Mortality in treated heterozygous familial hypercholesterolaemia: implications for clinical management. *Scientific Atherosclerosis* 1999;142:105-12.
31. Myant NB, Gallagher JJ, Knight BL et al. Clinical signs of familial hypercholesterolemia in patients with familial defective apolipoprotein B-100 and normal low density lipoprotein receptor function. *Arterioscler Thromb* 1991; 11(3):691-703.
32. Abifadel M, Varret M, Rabes JP et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 2003; 34(2):154-6.
33. Leren TP. Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia. 2004; *Clin Genet* 65(5):419-22.
34. Timms KM, Wagner S, Samuels ME et al. A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Hum Genet* 2004; 114(4):349-53.
35. Humphries SE, Cranston T, Allen M et al. Mutational analysis in UK patients with a clinical diagnosis of familial hypercholesterolaemia: relationship with plasma lipid traits, heart disease risk and utility in relative tracing. *J Mol Med*. 2006 Mar;84(3):203-14.
36. Fouchier SW, Kastelein JJ, Defesche JC. Update of the molecular basis of familial hypercholesterolemia in The Netherlands. *Hum Mutat*. 2005 Dec;26(6):550-6.
37. Leren TP. Cascade genetic screening for familial hypercholesterolemia. *Clin Genet*. 2004 Dec;66(6):483-7. Review.

**REUNIÃO ANUAL DO GRUPO DE ESTUDOS DE RISCO
CARDIOVASCULAR - RISCO GLOBAL E RISCO TERRITORIAL
NA DOENÇA ATEROTROMBÓTICA**

3 a 4 de Fevereiro de 2007 | Centro de Congressos da Alfândega do Porto, Porto

Informações Adicionais: congresso@spc.pt

**REUNIÃO ANUAL DE 2007 DO GRUPO DE ESTUDOS DE
FISIOPATOLOGIA DO ESFORÇO E REABILITAÇÃO CARDÍACA
DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE CARDIOLOGIA**

16 de Fevereiro de 2007 | Escola Superior de Tecnologia da Saúde, Lisboa

Informações Adicionais: Tel: 21 781 76 30 / 34 • E-mail: congresso@spc.pt