

Cardiovascular risk assessment of dyslipidemic children:

analysis of biomarkers for the correct assessment of monogenic dyslipidemia

Ana Margarida Medeiros¹, Ana Catarina Alves¹, Pedro Aguiar², Mafalda Bourbon¹
em nome dos investigadores do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

1. Unidade de I&D, Grupo de Investigação Cardiovascular, Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal, e Center for Biodiversity, Functional & Integrative Genomics (BioFIG), Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal
2. Grupo de Epidemiologia e Estatística, Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade Nova de Lisboa, Portugal

DISLIPIDEMIA

- Fator de risco cardiovascular
- Causa: Monogénica (FH)
Poligénica/Ambiental
Secundária (obesidade, DM, hipotiroidismo)
- Dislipidemia, e outros fatores de risco CV, persistem até vida adulta
(*PDAY Study, Strong et al, JAMA. 1999; 281:727-735*)
- Combinação de múltiplos fatores de risco associado a maior risco CV
(*Bogalusa Heart Study, Berenson et al, N Engl J Med. 1998; 338:1650-1656*)

Identificação e estratificação do risco CV em crianças
Medidas terapêuticas & Alteração de estilos de vida

↓ **Risco CV**

HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR (FH)

- Doença genética metabolismo lipídico + frequente crianças/adolescentes
- Frequência 1:400/500 populações europeias
- Autossómica dominante (mutações *LDLR, APOB, PCSK9*)
- C-LDL muito elevado no plasma desde nascença
- Risco elevado de aterosclerose e DCV prematura → Diagnóstico precoce !
- Identificação e tratamento adequado → redução na placa aterosclerótica

**Dislipidemia
Monogénica (FH)**

Risco CV maior
Tratamento farmacológico

**Dislipidemia
Poligénica/Ambiental**

Risco CV menor
Estilos de Vida Saudáveis

BIOMARCADORES

Objectivos

- 1) Avaliação risco CV de um grupo de crianças com diagnóstico clínico de FH
- 2) Identificação de biomarcadores: dislipidemia monogénica vs poligénica/ambiental
- 3) Determinação de novos critérios clínicos para identificação de crianças com FH

▪ População de Estudo

237 crianças não relacionadas (2 – 17 anos) referenciadas ao Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar (caso-index) entre 1999-2012

Critérios de admissão (adaptados de Simon Broome):

CT >260 mg/dL ou c-LDL >155 mg/dL*

& História familiar de hipercolesterolemia e/ou pDCV

*exceção: crianças <10 anos, CT >200mg/dL ou C-LDL>120mg/dL

& um dos pais com CT>300mg/dL ou C-LDL >200mg/dL

Critérios de exclusão: Disfunção tiróide e diabetes

▪ Fatores de risco CV avaliados

Percentis IMC: P75, P85, P95; Excesso de peso>P85, Obesidade >P95

Hipertensão: grau 1 (>P95), grau 2 (>P99) ajustada sexo e idade

Dislipidemia: >P95 (CT>225mg/dL; C-LDL>135mg/dL; TG>125mg/dL)
[Valores Referência Pop. Espanhola]

▪ Caracterização bioquímica

Determinação de CT, C-LDL, C-HDL, TG, apoB, apoA1, Lp(a), apoA2, apoC2, apoC3, apoE, sdLDL

▪ Caracterização genética

Estudo molecular dos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9* pelas metodologias de PCR, sequenciação automática e MLPA

Patogenicidade avaliada de acordo com estudos de co-segregação, natureza dos aminoácidos, conservação entre espécies e em alguns casos foram realizados estudos funcionais (RNA e *in vitro*) (*Bourbon et al, 2009; Silva et al, 2012*)

▪ Análise estatística

Programa SPSS. Comparação frequências (Qui-quadrado), comparação médias (teste t-Student ou ANOVA), comparação medianas (teste Mann-Whitney ou Kruskal Wallis) (*P-value* <0.05)

Curvas ROC para determinação valores de corte (*cut-off*) para biomarcadores (AUC>0.7)

Cross-tables para avaliação/comparação de critérios clínicos (sensibilidade e especificidade)

FATORES DE RISCO CV

Demographic and clinical data		Cardiovascular risk factors		Lipids (mg/dL)	
<i>Demographic</i>		<i>BMI (kg/m²) (n=218)</i>	19.8±4.2	<i>Basic lipid profile</i>	<i>n=237</i>
Index patients	237	<75 th percentile	47.7 %	TC	273.3±56.9
Age (years)	10.0±3.6	75 th – 85 th percentile	10.6 %	LDL-C	200.0±56.5
Male gender	44.7 %	85 th – 95 th percentile	15.6 %	HDL-C	57.3±16.1
		>95 th percentile	26.1 %	TG	97.5±57.3
<i>Family history</i>		<i>Physical activity</i>	<i>n=207</i>	<i>Advanced lipid profile</i>	<i>n=155</i>
1 st or 2 nd degree relative with CVD	24.5 %	≤2 hs/week	66.7 %	Lp(a)	55.9±61.1
		3-4 hs/week	24.2 %	apoA1	149.1±28.1
Physical symptoms		5-6 hs/week	7.7 %	apoB	100.0±31.9
Xanthomas	0.0%	≥7 hs/week	1.4 %	<i>Specific lipid profile</i>	<i>n=100</i>
		<i>Blood Pressure</i>	<i>n=150</i>	apoA2	28.8±5.4
<i>Therapeutic measures</i>		Normal	64.7 %	apoC2	3.7±1.5
on diet	49.4 %	prehypertension	19.3 %	apoC3	8.4±2.2
on medication	32.3 %	stage 1 and 2 hypertension	16.0 %	apoE	3.1±0.8
		<i>Smoking habits</i>	<i>0.0%</i>	sdLDL	29.9±14.9

Prevalência fatores de risco CV

1. CT e C-LDL >P95 – 89.5%
2. Obesidade/Exc. peso – 41.7%
3. Hist fam DCV – 24.5%
4. TG – 16%
5. Hipertensão – 16%

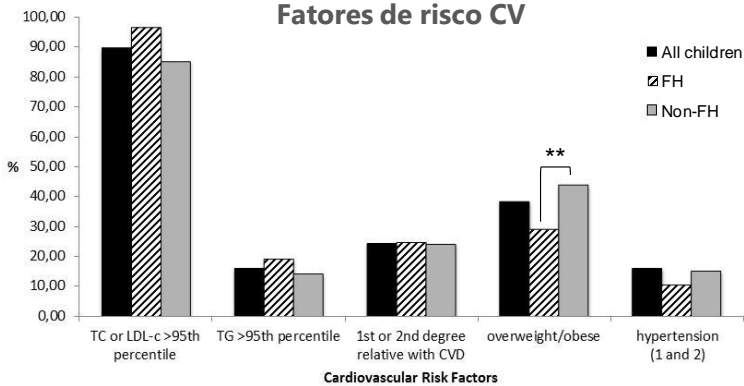
40% crianças já possuem pelo menos 2 fatores de risco CV!

FH VS NON FH

237 casos-índex



171 crianças identificadas com FH
 89 casos-índex
 82 cascade screening



	FH	Non-FH		FH	Non-FH
Age (years) (n=237)	10.2 3.9	9.91 3.4	<i>Basic lipid profile (mg/dl)</i>	n=89	n=148
Male gender (n=237)	53.9%	39.2%	TC	311.1 58.8*	250.6 41.7*
1st or 2nd degree relative with CVD on diet	24.7%	24.3%	LDL-C	233.3 59.7*	178.8 42.6*
on medication	35.2%	57.4%	HDL-C	54.0 15.9*	59.3 16.0*
BMI (kg/m ²) (n=218)	19.0 3.6*	20.4 4.4*	TG	92.0 54.9	101.0 58.7
<75 th percentile	56.5%	42.1%	non-HDL-C/HDL-C ratio	5.2 2.0*	3.5 1.3*
75 th – 85 th percentile	12.9%	9%	<i>Advanced lipid profile (mg/dl)</i>	n=50	n=105
85 th – 95 th percentile	16.5%	15.0%	Lp(a)	50.3 47.2	58.7 66.9
>95 th percentile	14.1%	33.8%	apoA1	138.8 25.1*	154.0 28.2*
<i>Physical activity (n=207)</i>			apoB	118.6 25.0*	91.3 31.1*
≤2 (hs/week)	66.2%	66.9%	apoB/apoA1 ratio	0.9 0.3*	0.6 0.2*
3-4 (hs/week)	22.1%	25.3%	<i>Specific lipid profile (mg/dl)</i>	n=30	n=70
5-6 (hs/week)	10.4%	6.2%	apoA2	27.8 5.5*	29.2 5.3*
≥7 (hs/week)	1.3%	1.5%	apoC2	3.2 1.3*	3.9 1.5*
<i>Blood Pressure (n=150)</i>			apoC3	7.6 1.5*	8.7 2.4*
Normal	73.7%	59.1%	apoE	3.4 0.9*	2.9 0.8*
Prehypertension	15.8%	21.5%	sdLDL	40.1 15.7*	25.6 12.2*
stage 1 and 2 hypertension	10.5%	15.1%			

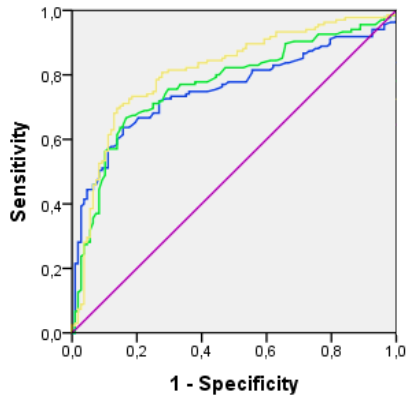
*P-value < 0.05

Obesidade/excesso peso – 30.6% FH; 48.8% non-FH (**P=0.017)
Hipertensão – 10.5% FH; 15.1% non-FH (ns)

Associação entre Obesidade/Excesso peso e Hipertensão
 (P=0.047, cor. Pearson)

BIOMARCADORES LIPIDICOS

Curvas ROC



Biomarcadores para diferenciar FH de outras dislipidemias (valores de cut-off)

apoB/apoA1 ratio ≥ 0.68
 LDL-C ≥ 190 mg/dL

Biomarker	AUC	Cut-off point	Sensitivity	Specificity
apoB/apoA1 ratio	0.835	0.6848	80.0%	76.9%
apoB	0.820	96.95 mg/dL	77.9%	76.0%
LDL-C	0.743	189.93 mg/dL	72.5%	70.3%

	Sensitivity	Specificity	Kappa statistic
A. Index cases:			
#1 (Simon Broome Criteria)	84.3%	68.9%	0.496
#2	73.0%	75.0%	0.467
#3	92.1%	56.1%	0.427
#4	74.2%	81.8%	0.554
#5	88.8%	67.6%	0.519
B. Relatives:			
#1 (Simon Broome Criteria)	29.3%	100.0%	0.257
#2	80.5%	100.0%	0.775
#3	84.1%	76.3%	0.606
#4	24.4%	100.0%	0.213
#5	82.9%	100.0%	0.803
C. Index cases + Relatives:			
#1 (Simon Broome Criteria)	57.9%	77.5%	0.358
#2	76.6%	81.9%	0.586
#3	88.3%	61.3%	0.482
#4	50.3%	86.8%	0.381
#5	86.0%	76.5%	0.617

Crítérios clínicos de FH propostos

- #1 (TC ≥ 260 mg/dL OR LDL-C ≥ 155 mg/dL) **AND** (family history of pCVD OR family history of hypercholesterolemia)
- #2 apoB/apoA1 ratio ≥ 0.68
- #3 [(TC ≥ 260 mg/dL OR LDL-C ≥ 155 mg/dL) **AND** (family history of pCVD OR family history of hypercholesterolemia)] **OR** apoB/apoA1 ratio ≥ 0.68
- #4 (TC ≥ 260 mg/dL OR LDL-C ≥ 190 mg/dL) **AND** (family history of pCVD OR family history of hypercholesterolemia)
- #5 [(TC ≥ 260 mg/dL OR LDL-C ≥ 190 mg/dL) **AND** (family history of pCVD OR family history of hypercholesterolemia)] **OR** apoB/apoA1 ratio ≥ 0.68

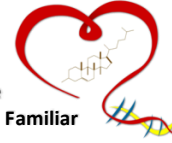


- Principais fatores de risco analisados numa coorte de 237 crianças com diagnóstico clínico de FH
- Cerca de 40% apresentavam pelo menos 2 fatores de risco
- 37.6% crianças com diagnóstico genético de FH com mutações nos genes *LDLR* e *APOB*
- Crianças com FH apresentam marcadores aterogénicos (CT, C-LDL, razão não-C-HDL/C-HDL, apoB, razão apoB/apoA1, sdLDL) significativamente mais elevados e menor concentração de partículas anti-aterogénicas (C-HDL, apoA1, apoA2)
- Crianças sem diagnóstico genético de FH apresentavam valores elevados de TG, apoC2, apoC3 e maior frequência de excesso de peso/obesidade, sugerindo uma dislipidemia de causa ambiental
- Razão apoB/apoA1 melhor biomarcador para diferenciar FH de outras formas de dislipidemia
- A inclusão de valores de *cut-off* nos critérios clínicos de FH (C-LDL \geq 190mg/dL ou razão apoB/apoA1 \geq 0.68) aumentaram a sensibilidade e especificidade
- Determinação de apoB e apoA1 como método de rotina, como sugerido igualmente pelas *guidelines* europeias ESC/EAS, em casos de dislipidemia severa, e consequente determinação da razão apoB/apoA1 para a identificação de doentes com FH

Identificação de crianças em risco e estratificação do seu risco CV

Aumento de iniciativas de educação para a saúde, implementação estilos de vida saudáveis e/ou tratamento farmacológico em idade precoce

Redução da carga de doença CV da população adulta



**Estudo Português de
Hipercolesterolemia Familiar**

**Equipa de colaboradores
do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar:**

Henedina Antunes, MD, PhD, Serviço de Pediatria, Hospital de São Marcos, Braga;
Goreti Lobaninhas, MD, Serv. Pediatria, Hosp. Sta Maria Menor, E.P.E., Barcelos;
Carla Laranjeira, MD, Serv. Pediatria, Centro Hospitalar do Alto Ave, EPE, Guimarães;
Natalina Miguel, MD, Vânia Martins, MD, Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro, E.P.E., Vila Real;
Helena Mansilha, MD, Centro Hospitalar do Porto, E.P.E., Porto;
António Guerra, MD, PhD, Serv. de Pediatria, Hosp. de S. João, E.P.E., Porto;
Elisabete Martins, MD, PhD, Ana Sofia Correia, MD, Serv. de Cardiologia, Hosp. de S. João, E.P.E., Porto;
Paula Martins, MD, Serv. Cardiologia Pediátrica, Hosp. Pediátrico Coimbra, Coimbra;
Lina Cardoso Ramos, MD, Serv. Genética, Hosp. Pediátrico, Coimbra;
Luís Diogo, PhD, Paula Garcia, MD, Unid. Doenças Metabólicas, Hosp. Pediátrico, Coimbra;
António Cruz, MD, Pascoal Moleiro, MD, Serv. Pediatria, Hosp. Sto André, Leiria;
Ana Gaspar, MD, Serv. Pediatria, Hosp. de Santa Maria, E.P.E., Lisboa;
Helóisa Santos, MD, PhD, Fundação Professor Fernando de Pádua, Lisboa;
Isabel Gaspar, MD, Serv. de Genética Médica, Hosp. de Egas Moniz, Lisboa;
Leonor Sasseti, MD, Unid. De Adolescentes, Hosp. D. Estefânia, Lisboa;
Sílvia Sequeira, MD, Serv. Doenças Metabólicas, Hosp. D. Estefânia, Lisboa;
Piedade Sande Lemos, MD, PhD, Serv. Pediatria, Hosp. Amadora Sintra, Amadora;
Renata Rossi, MD, Serv. Cardiologia Pediátrica, Hosp. Sta. Cruz, Carnaxide;
Susana Correia, MD, Serv. de Pediatria, Hospital Nossa Senhora do Rosário, E.P.E., Barreiro;
Quitéria Rato, MD, Serv. de Cardiologia, CHS, Hosp. de São Bernardo, Setúbal;
Fernando Simões, MD, Serv. de Pediatria, Hosp. Litoral Alentejano.

Financiamento: