

Síndrome de quilomicronemia familiar em Portugal, agosto 2020

Familial chylomicronemia syndrome in Portugal, August 2020

Ana Catarina Alves^{1,2}, Sílvia Sequeira³, Oana Moldovan⁴, Henedina Antunes⁵, Esmeralda Martins⁶, Rute Gonçalves⁷, João Sequeira Duarte⁸, António Guerra^{9,10}, Miguel Salgado¹¹, Aida Azevedo¹², Ana Gaspar¹³, Isabel Palma¹⁴, Quitéria Rato¹⁵, Mafalda Bourbon^{1,2}

mafalda.bourbon@insa.min-saude.pt

(1) Grupo de Investigação Cardiovascular. Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Promoção da Saúde e Doenças Crónicas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Biosystems & Integrative Sciences Institute. Faculty of Sciences, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

(3) Unidade de Doenças Metabólicas. Hospital de Dona Estefânia, Centro Hospitalar de Lisboa Central, Lisboa, Portugal

(4) Serviço de Genética Médica. Departamento de Pediatria, Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Lisboa, Portugal

(5) Consulta de Gastrenterologia. Hepatologia e Nutrição – Serviço de Pediatria, Hospital de Braga, Braga, Portugal

(6) Unidade de Doenças Metabólicas. Centro Materno Infantil do Norte, Centro Hospitalar Universitário do Porto, Porto, Portugal

(7) Serviço de Pediatria, Hospital Dr. Nélio Mendonça, Funchal, Madeira, Portugal

(8) Serviço Endocrinologia. Hospital Egas Moniz, Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, Lisboa, Portugal

(9) Serviço de Pediatria. Centro Hospitalar de São João, Porto, Portugal

(10) Centro de Investigação em Tecnologias e Serviços de Saúde. Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto, Portugal

(11) Serviço de Pediatria. Hospital Senhora da Oliveira, Guimarães, Portugal

(12) Serviço de Pediatria. Centro Hospital do Médio Ave, Vila Nova de Famalicão, Portugal

(13) Serviço de Pediatria, Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Lisboa, Portugal

(14) Serviço de Endocrinologia. Hospital Santo António, Centro Hospitalar do Porto, Porto, Portugal

(15) Serviço de Cardiologia. Hospital de São Bernardo, Centro Hospitalar de Setúbal, Setúbal, Portugal

Resumo

A síndrome de quilomicronemia familiar (FCS) é uma doença rara, com hereditariedade recessiva, envolvendo o metabolismo das lipoproteínas. Caracteriza-se por um aumento acentuado dos triglicéridos (TGs) e quilomicras no plasma. Os doentes apresentam plasma lipémico, pancreatite recorrente, xantomas eruptivos, hepatoesplenomegalia e lipemia retiniana. O presente estudo tem como objetivo a caracterização molecular de indivíduos com quadro clínico de FCS. Até à data foram referenciados a este estudo 26 indivíduos com diagnóstico clínico de FCS. O estudo inclui uma análise bioquímica do perfil lipídico e uma análise molecular dos 5 genes envolvidos. Foi possível identificar uma possível causa genética para a doença em 8/17 casos índice que apresentam variantes potencialmente patogénicas nos genes *LPL*, *APOC2* e *LMF1*. Em 7 doentes só foi identificada uma variante genética em heterozigotia no gene *LPL* e *APOA5*, desconhecendo-se qual o seu impacto no metabolismo da *LPL*. Dois doentes têm estudo genético negativo e 9 ainda se encontram em estudo. Os doentes com FCS devem ser identificados o mais precocemente possível, a fim de minimizar ou prevenir os efeitos nefastos desta condição. Nas situações em que temos diagnóstico molecular, este permite um diagnóstico preciso e uma melhor gestão das morbilidades, contribuindo para uma melhoria do prognóstico.

Abstract

Familial chylomicronemia syndrome (FCS) is a rare recessive disorder, involving lipoprotein metabolism. It is characterized by a severe increase in plasma triglycerides (TGs) and chylomicrons. Patients have lipemic plasma, recurrent pancreatitis, eruptive xanthomas, hepatosplenomegaly

and retinal lipemia. The aim of the present study is the molecular characterization of individuals with a clinical diagnosis of FCS. To date, 26 individuals with a clinical diagnosis of FCS have been referred to this study. The study includes a biochemical analysis of the lipid profile and a molecular analysis of the 5 genes involved. A possible genetic cause for the disease was identified in 8/17 index cases that present potentially pathogenic variants in *LPL*, *APOC2* and *LMF1* genes. In 7 patients, only one genetic variant in heterozygosity was identified in *LPL* and *APOA5* genes, and its impact on *LPL* metabolism is unknown. Two patients have a negative genetic study and 9 are still under study. FCS patients should be identified as early as possible in order to minimize or prevent the harmful effects of this condition. In situations where we have a molecular diagnosis, this allows for a correct diagnosis and better management of morbidities, contributing to an improvement in the prognosis.

Introdução

A síndrome de quilomicronemia familiar (FCS) é uma doença rara, com hereditariedade recessiva, envolvendo o metabolismo das lipoproteínas (1). Caracteriza-se por um aumento acentuado dos triglicéridos (TGs) e quilomicras no plasma. Os doentes apresentam plasma lipémico, pancreatite recorrente, xantomas eruptivos, hepatoesplenomegalia e lipemia retiniana (2). A pancreatite induzida por níveis muito eleva-



dos de TGs está associada a uma evolução clínica grave e a pior prognóstico do que os com outras causas ⁽²⁾. Por este motivo, é importante identificar-se a etiologia da hipertrigliceridemia, de modo a efetuar-se o diagnóstico correto o mais precocemente possível e a iniciar-se o tratamento adequado.

A FCS é geralmente causada por mutações bialélicas no gene *LPL*, que codifica a lipoproteína lípase, ou menos frequentemente nos genes que codificam para a apolipoproteína C2 (*APOC2*), apolipoproteína A5 (*APOA5*), fator de maturação da lípase (*LMF1*) ou à proteína-1 de ligação ao HDL com âncora GPI (*GPIHBP1*), que codificam cofatores da LPL ou para proteínas de interação ⁽²⁾.

A prevalência da FCS é desconhecida, contudo a prevalência da deficiência em LPL e APOC2 foi estimada em 1:1 000 000 (<http://www.orpha.net/>).

_Objetivo

O presente estudo tem como objetivo a caracterização molecular de indivíduos com quadro clínico de síndrome de quilomicronemia familiar (FCS). Nesta publicação são apresentados os casos de FCS já estudados bem como os que se encontram, até agosto de 2020, ainda em estudo no Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças não Transmissíveis (DPS), do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA).

_Métodos

Critérios de inclusão

Os critérios clínicos estabelecidos para inclusão no estudo da FCS são: i) triglicéridos acima de 800 mg/dL, ii) idade inferior a 40 anos, iii) exclusão de causas secundárias de hipertrigliceridemia (como outros distúrbios metabólicos ou consumo excessivo de álcool) e iv) a presença de pelo menos uma das seguintes situações:

- a) Resistência a restrição lipídica na dieta associada à terapia hipolipemiante;
- b) Presença de quilomicras e/ou VLDL no plasma;

- c) História clínica de pelo menos um episódio de pancreatite nos últimos 10 anos;
- d) Presença de xantomas eruptivos e/ou lipemia retiniana e/ou hepatoesplenomegalia.

No entanto, optámos por incluir também no estudo doentes com idade inferior a 65 anos de idade, com valores de TGs acima de 600 mg/dL, sem critérios de exclusão devidos a causas secundárias de hipertigliceridemia (referidas acima) e que apresentassem resistência ao tratamento. Esta cláusula foi estabelecida para melhor caracterizar o perfil de doentes portugueses com o diagnóstico clínico de FCS.

Estudo bioquímico

No âmbito deste estudo, o perfil lipídico de cada caso index, incluindo marcadores da rotina da química clínica (colesterol total (CT), colesterol LDL (LDL-C), colesterol HDL (HDL-C) e TGs, ApoA1, ApoB e Lp(a)) e outros marcadores mais específicos (ApoA2, ApoC2, ApoC3, ApoE e sdLDL), são analisados no DPS, INSA. O perfil lipídico básico é determinado com recurso a ensaios comerciais num equipamento automático, modelo COBAS Integra 400 Plus (Roche). O perfil lipídico mais específico é determinado também por ensaios comerciais, mas no equipamento Dayotna (Randox). O doseamento destes parâmetros específicos encontra-se em transição para o COBAS Integra 400 Plus (Roche).

Estudo molecular

Os genes *LPL*, *APOC2*, *LMF1*, *APOA5* e *GPIHBP1* são sequenciados por Sequenciação de Nova Geração (NGS) com um painel de genes alvo no DPS, INSA. Nos casos referenciados ao DPS, INSA há mais tempo, apenas os genes *LPL* e *APOC2* foram estudados por PCR e sequenciação de Sanger, e os casos negativos por esta metodologia encontram-se de momento a ser sequenciados por NGS. Todas as alterações encontradas por NGS são posteriormente confirmadas por sequenciação de Sanger.

O estudo dos familiares é realizado sempre que possível.



_Resultados

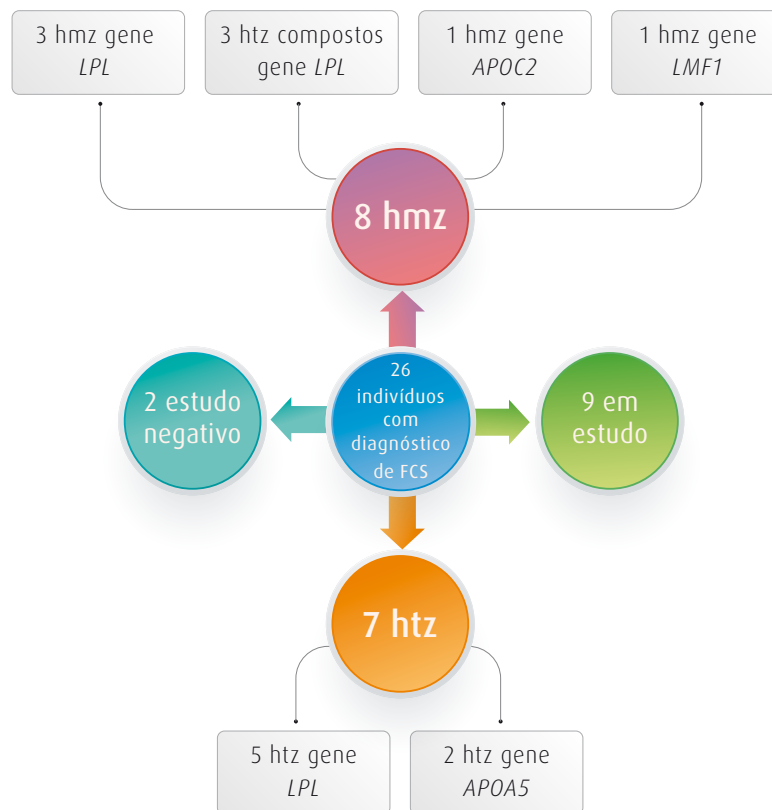
Até agosto de 2020, este estudo incluiu 26 indivíduos com diagnóstico clínico de FCS (tabela 1). Em 8 doentes foi identificada uma causa genética para a doença (figura 1):

- 3 são homozigotos para variantes no gene *LPL*, sendo 2 c.[644G>A];[644G>A]/ p.[(Gly215Glu)];[(Gly215Glu)] e 1 c.[701C>T];[701C>T]/ p.[(Pro234Leu)];[(Pro234Leu)];
- 3 são heterozigotos compostos para o gene *LPL* (c.[644G>A];[1030A>G]/p.[(Gly215Glu)];[(Ser286Gly)]; c.[644G>A];[953A>G]/ p.[(Gly215Glu)];[(Asn318Ser)] e c.[590G>A];[1030A>G]/ p.[(Arg197His)];[(Ser286Gly)];
- 1 é homozigoto para a variante (c.[175T>G];[175T>G]/ p.[(Tyr37Asp)];[(Tyr37Asp)]) no gene *APOC2*;
- 1 é homozigoto para a variante c.[725A>T];[725A>T] p.[Tyr242Phe];[Tyr242Phe] no gene *LMF1*.

Em 7 doentes com um fenótipo grave e concentração de TGs superior a 700 mg/dL, incluindo 2 que manifestaram pancreatite recorrente, só foi possível identificar uma variante em heterozigotia nos genes *LPL* e *APOA5* (tabela 1 e figura 1). Cinco variantes no gene *LPL* já foram descritas em doentes com FCS em homozigotia ou heterozigotia composta (3–8), sendo que apenas a variante c.1030A>G/p.(Ser286Gly) não foi descrita anteriormente. As variantes nos genes *LMF1*, *APOA5* e *APOC2*, não foram descritas anteriormente.

Não foram encontradas variantes nos 5 genes associados à FCS em 2 doentes com fenótipo clínico de FCS e 9 casos ainda se encontram em estudo para os genes *LMF1*, *GPIHBP1* e *APOA5*.

Figura 1: ↓ Resumo dos indivíduos estudados com diagnóstico de síndrome de quilomicronemia familiar (FCS).



Hmz – homozigoto; htz – heterozigoto



Tabela 1: Características clínicas dos casos índice em estudo.

ID	Idade	Valores lipídicos (mg/dL) na referência ao estudo				Valores lipídicos (mg/dL) determinados no INSA								Pancreatite	Trat. atual	Diagnóstico molecular	Ref.
		CT	LDL	HDL	TGs	Lp(a)	ApoA1	ApoB	ApoA2	ApoC2	ApoC3	ApoE	sdLDL				
I	45	419	*	*	1095	8,0	145,0	99,0	40,3	10,0	13,9	4,1	38,6	Não	Não	Gene APOA5: c.995_998delACAG/p.(Asp332Valfs*5)	Este estudo
II	33	204	70	34	616	15,0	140,0	77,0	35,1	11,8	25,1	8,7	35,3	Não	Estatina/fibratos	Gene LPL: c.953A>G/p.(Asn318Ser)	4
III	47	790	*	20	2140	8,0	146,0	147,0	25,1	29,5	37,2	12,0	52,4	Não	Não	Gene LMF1: c.[725A>T];[725A>T]p.[Tyr242Phe];[Tyr242Phe]	Este estudo
IV	13	148	13	19	923	21,0	98,0	58,0	25,5	0,1	33,6	17,7	10,3	Não	Não	Gene APOC2: c.[175T>G];[175T>G]/p.[(Tyr37Asp)];[(Tyr37Asp)]	Este estudo
V	39	231	*	25	757	14,0	154,0	31,0	27,5	4,9	7,3	3,5	9,8	Não	Não	Gene LPL: c.[644G>A];[953A>G]/p.[(Gly215Glu)];[(Asn318Ser)]	3,4
VI	26	753	97	32	7801	13,0	105,0	82,0	**	**	**	**	**	Não	Estatina/fibratos	Em estudo	-
VII	58	301	175	43	787	53,6	141,0	79,5	**	**	**	**	**	Não	Estatina/fibratos	Gene LPL: c.953A>G/p.(Asn318Ser)	4
VIII	14	139	*	8	1156	8,0	75,0	30,0	14,9	3,2	12,9	6,0	10,9	Sim	Não	Gene LPL: c.[644G>A];[1030A>G]/p.[(Gly215Glu)];[(Ser286Gly)]	3
IX	<1	497	*	19	5262	<8	18,0	240,0	**	**	**	**	**	Não	Não	Em estudo	
X	11	320	*	30	3615	18,0	82,0	43,0	12,2	6,9	8,1	8,0	6,9	Não	Fibratos	Gene LPL: c.[590G>A];[1030A>G]/p.[(Arg197His)];[(Ser286Gly)]	7
XI	34	114¥	19¥	12¥	686¥	8,0	77,0	42,0	24,7	3,1	8,5	2,5	15,1	Sim	Estatina/fibratos	Gene LPL: c.[644G>A];[644G>A]/p.[(Gly215Glu)];[(Gly215Glu)]	3
XII	43	299	97	45	864	9,0	214,0	116,0	42,6	24,8	54,3	16,6	31,6	Sim	Fibratos	Em estudo	
XIII	31	858	*	*	4371	12,0	120,0	63,0	33,6	8,3	7,9	3,4	12,8	Sim	Fibratos	Gene LPL: c.836T>G/p.(Leu279Arg)	6
XIV	57	575	382	*	737	31,0	142,0	65,0	**	**	**	**	**	?	Fibratos	Em estudo	
XV	61	296	62	43	1352	48,0	139,0	155,0	**	**	**	**	**	?	Estatina/fibratos	Em estudo	
XVI	11	292	42	52	2093	39,0	93,0	64,0	21,2	7,1	10,0	4,6	19,7	Sim	Estatina/fibratos	Gene LPL: c.644G>A/p.(Gly215Glu)	3
XVII	64	640	*	20	3260	1,8	123,0	97,0	21,7	18,7	25,0	8,0	31,1	Não	Não	Em estudo	
XVIII	32	1282	*	40	6221	9,9	108,0	180,0	44,8	29,5	35,4	16,0	59,0	Sim	Não	Em estudo	
XIX	37	293	*	33	2542	79,9	112,4	86,3	43,6	24,7	54,3	34,8	18,6	?	Não	Em estudo	
XX	43	315	*	*	1110	**	**	**	**	**	**	**	**	?	Estatina/fibratos	Em estudo	
XXI	52	116¥	47¥	27¥	365¥	**	116,0	66,0	**	**	**	**	**	Não	Estatina/fibratos	Estudo negativo	
XXII	<1	1208	*	*	24129	**	**	**	**	**	**	**	**	Não	Não	Gene LPL: c.[644G>A];[644G>A]/p.[(Gly215Glu)];[(Gly215Glu)]	3
XXIII	40	127	7	6	1824	**	**	**	**	**	**	**	**	Sim	Estatina/fibratos	Gene LPL: c.[701C>T];[701C>T]/p.[(Pro234Leu)];[(Pro234Leu)]	8
XXIV	44	272	*	85	737	**	**	**	**	**	**	**	**	Não	Estatina/fibratos	Gene LPL: c.953A>G/p.(Asn318Ser)	4
XXV	1	192	*	19	1158	**	**	**	**	**	**	**	**	Não	Não	Gene APOA5: c.995_998delACAG/p.(Asp332Valfs*5)	Este estudo
XXVI	17	354	39	22	4283	**	**	**	**	**	**	**	**	Sim	Não	Estudo negativo	

Idade (anos); CT – colesterol total (mg/dL); LDL – lipoproteína de baixa densidade (mg/dL); HDL – lipoproteína de alta densidade (mg/dL); TG – triglicéridos (mg/dL); * Valor impossível de determinar através de cálculo; ** Não foi possível determinar o valor durante o estudo; ? sem informação; ¥ valores em tratamento; INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge; trat – tratamento; ref – referência.

Em negrito estão assinalados os doentes que são homocigotos (homocigoto verdadeiro ou heterocigoto composto). Os valores recomendados pelas Sociedades Científicas internacionais e pelo *National Cholesterol Education Program guidelines* (2019) para o perfil lipídico são: CT <200 mg/dL; LDL <130 mg/dL; HDL >40 mg/dL e TGs <150 mg/dL; ApoA1>120mg/dL; ApoB <90 mg/dL; Lp(a) <50 mg/dL.

No que se refere aos marcadores do perfil lipídico mais específicos os valores recomendados pelo fabricante (Randox, www.randox.com) são: ApoA2 entre 25,1 e 34,5 mg/dL; ApoC2 entre 1,6 e 4,2 mg/dL; ApoC3 entre 5,5 e 9,5 mg/dL, ApoE entre 2,7 e 4,5 mg/dL e sdLDL < 35mg/dL.



_Discussão

Foi possível identificar uma causa para a doença em 8/17 casos índice com o estudo dos 5 genes completo. Em outros 7 doentes só foi identificada uma variante genética em heterozigotia, desconhecendo-se qual o seu impacto no metabolismo da LPL. Para clarificar estas situações iremos proceder ao estudo enzimático da LPL nestes indivíduos, para verificar qual o nível de atividade enzimática residual (9). A possibilidade de variantes em heterozigotia em genes associados a doenças recessivas serem a causa do fenótipo tem sido descrita para outras patologias. Os estudos de atividade enzimática da LPL poderão contribuir para esta discussão. Destes 7 doentes, 2 já tiveram pancreatite e apresentam valores muito altos de TGs, sendo casos muito sugestivos de FCS, mas que a genética não consegue, até à data, explicar.

Uma vez que foi encontrada uma alteração ainda não descrita no gene *LMF1*, iremos desenvolver estudos funcionais para investigar qual o efeito desta variante no metabolismo da LPL (10,11). Irá procurar-se caracterizar a variante não descrita encontrada em homozigotia no gene *APOC2* e a variante não descrita encontrada em heterozigotia no gene *LPL* pelo estudo da atividade enzimática da LPL nos doentes portadores das mesmas.

Os doentes com fenótipo clínico de FCS, mas sem uma mutação causal identificada, deverão continuar em estudo até se encontrar a causa da hipertrigliceridemia. É possível que nestes doentes estejam envolvidas variantes em genes que ainda não foram relacionados com a patologia.

_Conclusão

Os doentes com FCS devem ser identificados o mais precocemente possível, a fim de minimizar ou prevenir os efeitos nefastos desta condição. Nas situações em que temos diagnóstico molecular, este permite um diagnóstico preciso e uma melhor gestão das morbidades, contribuindo para uma melhoria do prognóstico.

O estudo genético é importante, embora o estado atual do conhecimento ainda não nos permita caracterizar 100% dos casos de FCS. A investigação nesta área é essencial pois

provavelmente haverá mais genes envolvidos na génese da FCS e a sua identificação permitirá caracterizar mais doentes, compreender melhor a patologia e desenvolver estratégias terapêuticas adequadas.

Agradecimentos e financiamento:

Aos técnicos a exercer ou que já exerceram funções na Unidade de Diagnóstico e Referência do DPS, INSA a realização do estudo bioquímico (TSDT Suza Almeida, TSDT Guida Duarte, TS Margarida Vaz e TSS Marta Alvim). À investigadora Maria Luís Cardoso a revisão do manuscrito.

O estudo da FCS encontra-se presentemente financiado pela Akcea Therapeutics (2020-2021), o que permitirá o estudo de um maior número de doentes nestes anos.

Referências bibliográficas:

- (1) Burnett J, Hooper A, Hegele R. Familial Lipoprotein Lipase Deficiency. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. (eds). GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1308/>
- (2) Moulin P, Dufour R, Aversa M, et al. Identification and diagnosis of patients with familial chylomicronaemia syndrome (FCS): expert panel recommendations and proposal of an "FCS score." *Atherosclerosis*. 2018;275:265-272. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.06.814>
- (3) Reina M, Brunzell J, Deeb S. Molecular basis of familial chylomicronemia: mutations in the lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II genes. *J Lipid Res*. 1992;33(12):1823-32. <https://www.jlr.org/content/33/12/1823.long>
- (4) Zhang H, Henderson H, Gagne SE, et al. Common sequence variants of lipoprotein lipase: standardized studies of in vitro expression and catalytic function. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1302(2):159-66. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(96\)00059-8](https://doi.org/10.1016/0005-2760(96)00059-8)
- (5) Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, et al. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J Intern Med*. 2012;272(2):185-196. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2012.02516.x>
- (6) Chan L, Mak Y, Tomlinson B, et al. Compound heterozygosity of Leu252Val and Leu252Arg causing lipoprotein lipase deficiency in a Chinese patient with hypertriglyceridemia. *Eur J Clin Invest*. 2000;30(1):33-40. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2000.00587.x>
- (7) Wright WT, Young IS, Nicholls DP, et al. Genetic screening of the LPL gene in hypertriglyceridaemic patients. *Atherosclerosis*. 2008;199(1):187-192. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.10.029>
- (8) Ma Y, Henderson HE, Monsalve M V., et al. A mutation in the human lipoprotein lipase gene as the most common cause of familial chylomicronemia in french Canadians. *N Engl J Med*. 1991;324(25):1761-1766. <https://doi.org/10.1056/NEJM199106203242502>
- (9) Woollett LA, Beitz DC, Hood RL, et al. An enzymatic assay for activity of lipoprotein lipase. *Anal Biochem*. 1984;143(1):25-29. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90552-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90552-9)
- (10) Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, et al. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J Intern Med*. 2012;272(2):185-196. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2012.02516.x>
- (11) Wu MJ, Wolska A, Roberts BS, et al. Coexpression of novel furin-resistant LPL variants with lipase maturation factor 1 enhances LPL secretion and activity. *J Lipid Res*. 2018;59(12):2456-2465. <https://doi.org/10.1194/jlr.D086793>