

## Colesterol Total, nem oito(enta) nem (duzentos e) oitenta: Parte 2 – Hipolipidemias primárias – alterações do metabolismo das lipoproteínas

### *Cholesterol, low is not always the best: Part 2 – Alterations in Lipoprotein Metabolism causing low lipid levels*

Ana Catarina Alves<sup>1,2</sup>, Sílvia Sequeira<sup>3</sup>, Maria Luís Cardoso<sup>1,2</sup>, Oana Moldovan<sup>4</sup>, Raquel Espírito Santo<sup>5</sup>, Renata Oliveira<sup>6</sup>, António Guerra<sup>7,8</sup>, Mafalda Bourbon<sup>1,2</sup>

mafalda.bourbon@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Investigação e desenvolvimento. Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças não Transmissíveis, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(2) Biosystems & Integrative Sciences Institute. Faculdade de Ciências, 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) Serviço de Endocrinologia. Hospital de Faro, Centro Hospitalar Universitário do Algarve, Faro, Portugal.

(6) Serviço de Genética. Hospital de São João, Centro Hospitalar Universitário de S. João, Porto, Portugal.

(7) Serviço de Pediatria. Hospital de São João, Centro Hospitalar Universitário de S. João, Porto, Portugal.

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

### \_Resumo

A dislipidemia é um distúrbio do perfil lipídico, seja por elevação ou diminuição de uma ou mais partículas lipídicas. O objetivo deste trabalho é fazer uma revisão das causas moleculares de hipolipidemias e suas consequências clínicas. São também apresentados casos com hipolipidemias raras já estudados, ou com estudo em curso no laboratório do INSA, apresentando os dados clínicos e moleculares mais relevantes. O perfil lipídico foi determinado por métodos automatizados para cada caso índice e familiares e o estudo molecular dos genes envolvidos foi realizado por amplificação por PCR e sequenciação de Sanger ou sequenciação de nova geração (NGS). Foram referenciados ao laboratório do INSA 7 casos índice, tendo sido possível até ao momento identificar a causa molecular do fenótipo apresentado em 3 casos: 2 com hipobetalipoproteinemia (1 homocigoto e 1 heterocigoto) e 1 caso índice com doença de Tangier; os restantes encontram-se ainda em estudo. Doentes com as dislipidemias raras apresentadas têm um risco elevado de ter complicações cardiovasculares, neurológicas e/ou esteatose hepática e devem, por esta razão, ser identificados o mais precocemente possível, de forma a minimizar ou prevenir os efeitos nefastos destas condições.

### \_Abstract

*Dyslipidemia is a disorder of the lipid metabolism profile, by either elevation or decrease of lipid particles. The objective of this work is to review the molecular causes of hypolipidemia and its clinical consequences. In this study, we present cases with rare hypolipidemias already studied or with a study in progress in laboratory of INSA, presenting the most relevant clinical and molecular data. The lipid profile was determined by automated methods for each index case and relatives and the molecular study of the genes involved was performed by PCR amplification and Sanger sequencing or next generation sequencing (NGS). Seven index cases were referred to laboratory of INSA and it was possible to identify the molecular cause of the phenotype presented by 3 cases:*

*2 with hypobetalipoproteinemia (1 homozygous and 1 heterozygous) and 1 with Tangier's disease; the remaining cases are still under study. Patients with the rare dyslipidemias presented have a high risk of having cardiovascular, neurological complications and/or hepatic steatosis and should therefore be identified as early as possible in order to minimize or prevent the harmful effects of these conditions.*

### \_Introdução

Este artigo é o segundo de uma série de três, dedicados à classificação e diagnóstico de hipolipidemias e elaborados com o objetivo de favorecer o reconhecimento e diagnóstico destas patologias. A primeira parte, já publicada no *Boletim Epidemiológico Observações* (1), versou sobre as síndromes polimalformativas causadas por erros hereditários da biossíntese do colesterol. Nesta segunda parte, são tratadas as formas patológicas de hipolipidemias, com manifestações pós-natais, bem como as formas benignas devidas a alterações do metabolismo das lipoproteínas e outras causas. Por último, na terceira parte irão ser referidas as formas secundárias de hipolipidemias.

Há várias patologias descritas associadas a hipolipidemias, que incluem a: abetalipoproteinemia (ABL), hipobetalipoproteinemia familiar (FHBL) e doença de retenção das quilomicras. Estas hipolipidemias caracterizam-se pela ausência de lipoproteínas contendo apolipoproteína B (apoB) na circula-

ção, incluindo quilomicras, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (2). O fenótipo associado a estas patologias monogénicas é muito semelhante, mas a causa genética de base é na verdade bastante distinta; a ABL é causada por mutações no gene *MTTP* (*microsomal triglyceride transfer protein*), que codifica uma proteína que transfere os triglicéridos para a apoB (2); a FHBL é causada por mutações no gene da *APOB*, que levam à formação de uma proteína truncada (3-5); e a doença de retenção de quilomicras é causada por mutações no gene *SAR1B* (*Secretion Associated Ras Related GTPase 1B*) (2) (tabela 1). A FHBL e a ABL são patologias que se caracterizam por níveis de apoB, colesterol LDL (LDL-C) e sobretudo triglicéridos (TG) inferiores ao percentil 5. Caracterizam-se pela incapacidade de absorver completamente as gorduras provenientes da dieta que se acumulam na parede intestinal e as vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) (3). Os sintomas surgem nos primeiros meses de vida e incluem acantocitose e diarreia com esteatorreia, com conseqüente má progressão ponderal. Os doentes apresentam também esteatose hepática e, como resultado do défice das vitaminas lipossolúveis, neuropatia periférica, ataxia espinocerebelar progressiva e retinite pigmentosa (com nictalopia ou mesmo cegueira) (3). Nos indivíduos com FHBL os sintomas podem ser mais atenuados comparativamente à ABL, mas os fenótipo podem ser variáveis (3). ABL é uma doença autossómica recessiva e a FHBL uma doença autossómica co-dominante (6). A doença de retenção de quilomicras ou doença de Anderson é uma doença autossómica recessiva muito rara, caracterizada pela ausência de quilomicras pós-prandiais e apoproteínaB-48 no plasma dos indivíduos afetados (2). A proteína envolvida (*sarb1b*) é uma pequena GTPase envolvida no transporte vesicular de novas partículas de lipoproteínas do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi (7) (tabela 1). Bioquimicamente caracterizam-se por níveis baixos de LDL, inexistência de quilomicras com TG normais (8). Os primeiros sintomas a aparecer podem ser confundidos com problemas gastrointestinais, como diarreia, vômitos ou distensão abdominal, problemas neurológicos, musculares, oftalmológicos e cardíacos (8). O tratamento precoce com uma dieta pobre em gorduras, suplementada com lípidos essenciais e vitaminas lipossolúveis é fundamental para a prevenção dos sintomas clínicos (8) e

pode retardar a progressão das manifestações. O diagnóstico precoce permite uma qualidade de vida razoável e o aumento da esperança de vida (3,6).

Patologias associadas a baixo HDL também são consideradas hipolipidemias. Estas incluem a doença de Tangier e a deficiência em HDL. A doença de Tangier é uma patologia rara, autossómica recessiva, onde os níveis de colesterol das lipoproteínas de alta densidade (HDL-C) e apoA1 são muito baixos ou mesmo indetetáveis. As manifestações mais comuns são hipertrofia das amígdalas que apresentam cor alaranjada, esplenomegalia e neuropatia periférica. Mais tarde pode ocorrer hepatomegalia, linfadenopatia e opacificação da córnea (9). O defeito celular na doença de Tangier está relacionado com o reduzido efluxo do colesterol celular nos fibroblastos da pele e nos macrófagos (10). Esta doença genética é causada por mutações no gene *ABCA1* (*ATP binding cassette A1 gene*) que codifica para uma proteína transportadora - *ABCA1 transporter* (tabela 1). Já foram descritas mais de 50 mutações no gene *ABCA1* em indivíduos com a doença de Tangier (homozigotos ou heterozigotos compostos) (10). A deficiência em HDL é uma patologia autossómica dominante causada por mutações nos genes *ABCA1* (em heterozigotia) e no gene *APOA1*. Indivíduos com deficiência em HDL apresentam sintomas muito semelhantes aos com a doença de Tangier embora os valores de HDL-C não sejam tão baixos. Estes indivíduos pelo facto de apresentarem valores de HDL-C muito baixo podem ter doença cardiovascular prematura (3).

Há ainda uma forma combinada de hipolipidemia denominada Hipolipidemia Familiar Combinada (FCH), uma patologia autossómica recessiva causada por mutações no gene *ANGPTL3* (*angiopoietin like 3*). Alterações que causam perda de função neste gene originam um aumento da atividade da lipoproteína lípase, podendo diminuir os valores de HDL-C pelo aumento da lípase endotelial. Em condições fisiológicas normais estas duas enzimas são catabolizadas pela ação da *ANGPTL3* (11). O efeito na aterosclerose é desconhecido, no entanto têm sido relatados casos de esteatose hepática (fígado gordo) (3).

Está descrita também uma forma benigna de hipocolesterolemia associada a mutações que originam perda de função do gene *PCSK9* (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*).

Tabela 1: ⚡ Hipolipidemias primárias: fenótipo, genes e prevalência.

Patologia genética	Fenótipo	Genes e hereditariedade	Prevalência
Abetalipoproteinemia (ABL) (OMIM - 200100)	Colesterol total, LDL-C e triglicéridos inferior do percentil 5	<i>MTTP</i> (proteína de transferência microsomal); Hereditariedade – autossômica recessiva	Rara (cerca de 100 casos descritos no mundo)
Hipobetalipoproteinemia familiar (FHBL) (OMIM - 615558)	Colesterol total, LDL-C e triglicéridos inferior do percentil 5	<i>APOB</i> (apolipoproteína B); Hereditariedade – autossômica co-dominante	1/1 000 - 1/3 000
Doença de retenção de quilomicras (OMIM - 246700)	Colesterol total, LDL-C e triglicéridos inferior do percentil 5	<i>SAR1B</i> ( <i>Secretion Associated, Ras Related GTPase 1B</i> ); Hereditariedade – autossômica recessiva	Rara (cerca de 50 casos descritos no mundo)
Deficiência em colesterol HDL-C (OMIM - 604091)	Colesterol HDL-C inferior do percentil 5	<i>ABCA1</i> ( <i>ATP binding cassette A1</i> ) <i>APOA1</i> (apolipoproteína A1); Hereditariedade – autossômica dominante	Desconhecida
Doença de Tangier (OMIM - 205400)	Colesterol HDL-C inferior do percentil 5	<i>ABCA1</i> ( <i>ATP binding cassette A1</i> ); Hereditariedade – autossômica recessiva	Rara (cerca de 100 casos descritos no mundo)
Hipolipidemia familiar combinada (OMIM - 605019)	Colesterol LDL-C e HDL-C inferior do percentil 5	<i>ANGPTL3</i> ( <i>Angiopoietin-Like 3</i> ); Hereditariedade – autossômica recessiva	1/1 000 000

## \_Objetivo

O objetivo deste trabalho é fazer uma revisão das causas moleculares de hipolipidemias e suas consequências clínicas. São também apresentados casos com hipolipidemias raras referenciados à Unidade de Investigação e Desenvolvimento do Departamento de Promoção da Saúde e Doenças não Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, já estudados, ou com estudo em curso no nosso laboratório, descrevendo os dados clínicos e moleculares mais relevantes.

## \_Métodos

No âmbito deste estudo foi determinado o perfil lipídico (CT, LDL-C, HDL-C, TG, apoA1, apoB e Lp(a)) para cada caso índice e familiares, pelos métodos colorimétrico enzimático e imunoturbidimétrico, recorrendo ao autoanalisador COBAS Integra 400 Plus (Roche).

O estudo molecular foi realizado por amplificação de todos os exões e junções exão/intrão, bem como, regiões 5' e 3' UTR de

cada gene indicado na [tabela 1](#), por PCR e sequenciação pelo método de Sanger, ou, mais recentemente, por sequenciação de nova geração (NGS), seguido de sequenciação de Sanger para confirmação do resultado obtido por NGS.

## \_Resultados e discussão

Foi realizado o estudo de 7 casos índice. O fenótipo clínico de cada caso índice encontra-se resumido na [tabela 2](#).

Seis dos 7 casos índice recebidos têm um diagnóstico clínico de ABL ou FHBL. No caso índice I foi possível encontrar a mutação causadora da doença, uma mutação stop em homozigotia no gene *APOB* (p.[(Trp1237\* )]; [(Trp1237\* )]) (12), confirmando o diagnóstico clínico de FHBL. No caso índice VII com possível ABL/FHBL foi identificada uma alteração *frameshift* no gene *APOB* em heterozigotia (p.(Gly1122Valfs\*63)). Esta variante explica o fenótipo de hipolipidemia apresentado pelo doente, fenótipo este menos severo que o apresentado pelo caso I com uma alteração em homozigotia.

Nos casos índice II, III, IV e VI foram sequenciados os genes *APOB*, *MTTP*, *SAR1B*, *ANGPTL3* e *PCSK9* e não foram encontradas variantes que justifiquem o fenótipo. Estes doentes encontram-se ainda em estudo de forma a identificar a causa genética do seu fenótipo. No caso II foi possível obter amostras dos pais e irá ser realizado o estudo do exoma desta família (em trio) de forma a tentar identificar um novo gene responsável pelo fenótipo. O caso índice VI foi referenciado para estudo com um diagnóstico clínico de ABL/FHBL, apresentando com 15 anos de idade, hepatomegalia, esteatose hepática e neuropatia. Os progenitores deste caso índice apresentam fenótipos distintos, a mãe com valores normais de CT, LDL-C, HDL-C e TG, e o pai apresenta valores baixos de CT, LDL-C,

HDL-C e TG, similares ao caso índice. Nesta família, tal como na anterior, só o estudo do exoma poderá levar à identificação da causa do fenótipo apresentado pelo caso índice.

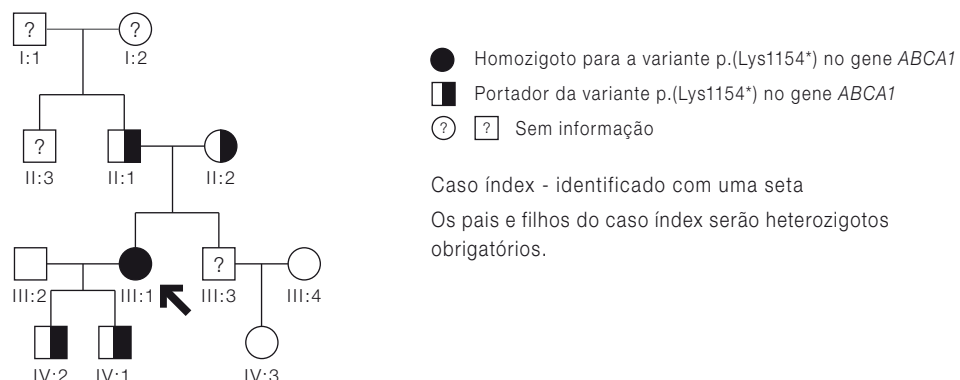
No caso índice V, referenciado com diagnóstico clínico de deficiência em HDL, identificou-se uma mutação stop em homocigotia no gene *ABCA1* (p.[(Lys1154\*)];[(Lys1154\*)]) (tabela 2), associada a doença de Tangier. Ambos os progenitores são heterocigotos para esta variante, assim como os seus dois descendentes. No entanto, não recebemos amostras para a realização de qualquer confirmação laboratorial (figura 1).

Tabela 2: Características clínicas e moleculares dos casos índice apresentados.

ID	Idade	CT	LDL	HDL	TG	Lp(a)	ApoA1	ApoB	Diagnóstico clínico	Diagnóstico molecular
I	16	22	*	24	6	**	**	**	ABL/FHBL	FHBL- gene <i>APOB</i> : c.[3711G>A]; [3711G>A], p.[(Trp1237*); (Trp1237*)]
II	14	24	*	22	5	9,0	49,0	10,0	ABL/FHBL	Em estudo
III	14	83	39	33	53	17	94	34	ABL/FHBL	Em estudo
IV	15	44	15	12	46	8,3	53	21	ABL/FHBL	Em estudo
V	42	73	46	3	158	<8,3	10	91	Doença de Tangier	Doença de Tangier - gene <i>ABCA1</i> : c.[3460A>T];[3460A>T], p.[(Lys1154*)];[(Lys1154*)]
VI	15	91	47	38	31	**	**	40	FHBL	Em estudo
VII	28	69	18	52	13	**	115	15	ABL/FHBL/HFC	FHBL- gene <i>APOB</i> : c.3365_3366del, p.(Gly1122Valfs*63)

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); Lp(a) – lipoproteína (a) (mg/dL); ApoA1 – apolipoproteína A1 (mg/dL); ApoB – apolipoproteína B (mg/dL); ABL - Abetalipoproteinemia; FHBL – hipobetalipoproteinemia familiar; FCH – hipolipidemia familiar combinada; \* impossível determinar por motivos técnicos; \*\* Não determinado.

Figura 1: Caso índice V com diagnóstico molecular de doença de Tangier.



Os doentes com as hipolipidemias raras apresentadas têm um risco acrescido de ter outras manifestações clínicas graves: má progressão ponderal com desnutrição, alterações hematólogicas, oftalmológicas ou neurológicas, esteatose hepática ou mesmo doença cardíaca. Por este motivo, deveriam ser identificados o mais precocemente possível, de forma a minimizar ou prevenir os efeitos nefastos destas condições. A caracterização genética da patologia permite uma melhor e mais personalizada abordagem terapêutica com melhoria do prognóstico do doente, bem como um aconselhamento genético adequado, com identificação de outros familiares em risco.

Em 2013 a Direção-Geral da Saúde publicou a circular normativa n.º 010/2013, onde recomenda que todas as crianças antes dos 10 anos de idade realizem um perfil lipídico. Uma vez que estas dislipidemias manifestam-se na primeira década de vida, se a circular normativa fosse aplicada na sua plenitude, o número de indivíduos identificados precocemente poderia ser maior, aumentando a possibilidade de prevenir as doenças graves associadas a estas patologias.

Sendo a dislipidemia uma das áreas de referência do Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças não Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, e na procura da melhoria constante, foram recentemente implementados quatro painéis de genes associados à dislipidemia, com recurso a sequenciação de nova geração (NGS). Esta nova abordagem permite uma resposta mais rápida e com uma sensibilidade e especificidade mais elevadas a qualquer pedido de diagnóstico molecular na área da dislipidemia (13-15). Esperamos com estes painéis conseguir identificar a mutação causadora da doença nos casos ainda em estudo e em todos os futuros casos que nos sejam referenciados para diagnóstico; caso não seja possível por esta metodologia chegar a um resultado, deverá ser equacionado o estudo do exoma (como será realizado no caso índice II apresentado), como estudo exploratório, para identificação de novos genes. Os respetivos estudos funcionais serão implementados, sempre que possível, para a comprovação do efeito do defeito genético na via metabólica afetada.

## \_Conclusão

As dislipidemias de origem genética raras continuam sub-diagnosticadas em Portugal. A identificação da etiologia de cada dislipidemia é importante para a implementação da correta abordagem terapêutica uma vez que a mesma depende da via metabólica afetada. Habitualmente só são valorizadas e tratadas as situações com hiperlipidemias.

Em relação às doenças que causam hipolipidemias não há muitos casos descritos, talvez por serem muito raras. Os valores de referência apresentados pelos laboratórios são normalmente baseados em valores recomendados pelas sociedades científicas e não apresentam os limites inferiores saudáveis, tornando-se assim difícil o diagnóstico destes casos.

O cumprimento da circular normativa n.º 010/2013 sobre o rastreio da dislipidemia na criança deveria ser incentivado para poder identificar atempadamente crianças com híper e hipolipidemias que requerem aconselhamento e tratamento adequado atempado e prevenir complicações. A reformulação dos boletins de análises, com a introdução de valores com intervalos de valores de referência, iria também ajudar a alertar para valores abaixo dos recomendados, permitindo identificar mais indivíduos em risco.

A caracterização bioquímica e genética determinada no laboratório do INSA enquadra-se num esforço de estratificação do risco associado a cada patologia contribuindo para a implementação de uma medicina mais personalizada.

### Referências bibliográficas:

- (1) Cardoso ML, Alves AC, Bourbon M, Colesterol total, nem oito(enta) nem (duzentos e) oitenta: Parte 1 – Defeitos da biossíntese do colesterol. Boletim Epidemiológico Observações. 2018 janeiro-abril;7(21):12-16. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5548>
- (2) Tarugi P, Aversa M. Hypobetalipoproteinemia: genetics, biochemistry, and clinical spectrum. Adv Clin Chem. 2011;54:81-107.
- (3) Welty FK. Hypobetalipoproteinemia and abetalipoproteinemia. Curr Opin Lipidol. 2014;25(3):161-8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4465983/>
- (4) Schonfeld G, Lin X, Yue P. Familial hypobetalipoproteinemia: genetics and metabolism. Cell Mol Life Sci. 2005;62(12):1372-8.
- (5) Moutzouri E, Elisaf M, Liberopoulos EN. Hypocholesterolemia. Curr Vasc Pharmacol. 2011;9(2):200-12.

artigos breves\_ n. 11

- (6) Wang LR, McIntyre AD, Hegele RA. Complex genetic architecture in severe hypobetalipoproteinemia. *Lipids Health Dis.* 2018;17(1):48.
- (7) Ramasamy I. Update on the molecular biology of dyslipidemias. *Clin Chim Acta.* 2016;454:143-85.
- (8) Ferreira H, Ramos RN, Quan CF, et al. Chylomicron retention disease: a description of a new mutation in a very rare disease. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2018;21(2):134-140. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5915691/>
- (9) Kolovou GD, Mikhailidis DP, Anagnostopoulou KK, et al. Tangier disease four decades of research: a reflection of the importance of HDL. *Curr Med Chem.* 2006;13(7):771-82.
- (10) Genest J, Libby P, Gotto AM. Lipoprotein disorders and cardiovascular disease. IN: Zipes DP, Libby P, Bonow RO, et al. (eds). *Braunwald's Heart disease. a textbook of cardiovascular disease.* 7th ed. Philadelphia, PA; Elsevier Saunders, 2005, p. 1013-33.
- (11) Blanco-Vaca F, Martin-Campos JM, Beteta-Vicente Á, et al. Molecular analysis of APOB, SAR1B, ANGPTL3, and MTTP in patients with primary hypocholesterolemia in a clinical laboratory setting: Evidence supporting polygenicity in mutation-negative patients. *Atherosclerosis.* 2019;283:52-60.
- (12) Di Leo E, Magnolo L, Bertolotti M, et al. Variable phenotypic expression of homozygous familial hypobetalipoproteinemia due to novel APOB gene mutations. *Clin Genet.* 2008;74(3):267-73.
- (13) Johansen CT, Dubé JB, Loyzer MN, et al. LipidSeq: a next-generation clinical resequencing panel for monogenic dyslipidemias. *J Lipid Res.* 2014;55(4):765-72. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3966710/>
- (14) Futema M, Plagnol V, Li K, et al. Whole exome sequencing of familial hypercholesterolemia patients negative for LDLR/APOB/PCSK9 mutations. *J Med Genet.* 2014;51(8):537-44. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC24987033/>
- (15) Alves AC, Benito-Vicente A, Medeiros AM, et al. Further evidence of novel APOB mutations as a cause of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2018;277:448-56.