

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Estudo Molecular de Dislipidemias Familiares

Sara Andreia Paninho Berguete Coelho

Dissertação

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2012

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Estudo Molecular de Dislipidemias Familiares

Sara Andreia Paninho Berguete Coelho

Dissertação

Orientação externa: Doutora Mafalda Bourbon (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge)

Orientação interna: Professora Teresa Rebelo (Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa)

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2012

Toda a criança nascida no novo milénio tem o direito de viver, pelo menos até aos 65 anos de idade, sem sofrer uma doença cardiovascular evitável.

In Carta Europeia Para a Saúde do Coração, 2007

Este trabalho não foi escrito ao abrigo do novo acordo ortográfico.

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projecto PIC/IC/83333/2007, designado por “Estudo clínico e molecular de patologias familiares das lipoproteínas com elevado risco cardiovascular”, financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) e do projecto designado por “*Familial hypercholesterolaemia study - cascade screening of patients with familial hypercholesterolemia in Portugal*”, financiado pela Sociedade Portuguesa de Cardiologia (SPC) 2010-2012.

As referências bibliográficas seguem as regras do *European Heart Journal*.

Agradecimentos

A conclusão bem-sucedida de mais uma etapa da minha vida não seria possível sem a contribuição pessoal de cada um de vós a quem agradeço neste pequeno texto.

Em primeiro lugar quero agradecer à Doutora Mafalda Bourbon que me recebeu prontamente no seu grupo de investigação, proporcionando as condições para a realização do estudo conducente a esta dissertação de mestrado e direccionando-me no melhor caminho de construção de uma dissertação de mestrado. A sua preocupação com o trabalho, a exigência, a procura de novos rumos e o orgulho no trabalho realizado são aspectos que eu valorizo na sua forma de me orientar e que me fizeram acreditar de novo na Ciência.

Agradeço a todas as minhas colegas do Grupo de Investigação Cardiovascular (GIC): Catarina, Ana, Isabel, Flávia e Elisete. À Catarina principalmente pelo constante direccionamento do trabalho e pela partilha de experiência. À Ana que sugeriu sempre formas de ultrapassar obstáculos e partilhou os seus conhecimentos, inclusive na fase final da escrita da dissertação. À Isabel pelos ensinamentos de técnicas laboratoriais preciosas. À Flávia, minha colega de mestrado, com quem compartilhei tantos momentos durante este ano. À Elisete que me deu a oportunidade de passar algo do que aprendi a alguém que chega ao grupo.

Agradeço também aos outros grupos de investigação do Departamento de Promoção de Saúde e Doenças Não Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, NSM e GIMC, onde se incluem as minhas colegas Ana Mateus e Sofia Pinheiro, pela cooperação e ambiente de trabalho vivido.

Às restantes pessoas que trabalham no INSA e que de alguma forma contribuíram para a realização do meu trabalho, nomeadamente os que trabalham na Unidade Laboratorial Integrada e na Unidade de Tecnologia e Inovação.

Não posso deixar de referir os médicos colaboradores do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar que proporcionaram as amostras para a realização do meu trabalho.

Um agradecimento à Professora Teresa Rebelo pela prontidão com que sempre respondeu às minhas necessidades e pela compreensão demonstrada durante a sua orientação interna.

À FCUL, a instituição que me formou e que me proporcionou uma nova busca pelo conhecimento. A descoberta do Mestrado em Biologia Humana e Ambiente, coordenado pela Professora Deodália Dias, sempre atenciosa com os seus alunos, revelou-se um desafio que agradeço ter encontrado.

Agradeço aos meus amigos os conselhos constantes.

O último agradecimento é dirigido à minha família, à Marta, pelo seu instinto protector, e, acima de tudo, aos meus pais, que me transmitiram os valores que me definem e que me proporcionaram as condições para tentar voar mais uma vez.

Resumo

A hipercolesterolemia familiar (FH) é uma dislipidemia de transmissão autossômica dominante que se caracteriza por níveis elevados de colesterol no plasma e aparecimento prematuro de aterosclerose e de doença cardiovascular. Mutações nos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9* são causa de FH. A dislipidemia familiar combinada (FCHL) é uma hiperlipidemia poligénica também relacionada com a ocorrência de DCV prematura. O seu fenótipo tem sido associado a alterações nos genes *LPL*, *APOC2*, *APOC3*, *APOA4* e *APOA5*.

O objectivo deste trabalho consistiu na caracterização clínica e molecular de indivíduos com suspeita clínica de dislipidemia familiar, nomeadamente FH. Foi também objectivo do estudo a avaliação dos critérios clínicos da FH.

A amostra de estudo consistiu em 40 casos-índice (crianças e adultos de ambos os sexos) referenciados ao INSA por suspeita clínica de FH. A caracterização bioquímica permitiu avaliar o fenótipo do doente e inferir sobre a aplicação de critérios de diagnóstico clínico de FH. A caracterização molecular incluiu a pesquisa de alterações nos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*, recorrendo às metodologias de dHPLC, sequenciação automática e MLPA. Em 5 doentes que apresentavam também TG elevados foi efectuada a pesquisa de alterações nos genes *LPL*, *APOC2*, *APOC3*, *APOA4* e *APOA5*, por sequenciação automática dos mesmos.

O estudo molecular dos 40 casos-índice estudados identificou 15 (37,5%) indivíduos com FH. Em 31-39% dos 609 casos-índice portugueses já estudados no EPGH, o diagnóstico clínico resultante da aplicação dos 2 critérios clínicos de FH aplicados não coincide com os resultados do estudo molecular. Relativamente à FCHL, o estudo molecular somente identificou alterações que estão descritas como polimorfismos.

A identificação precoce de casos-índice com dislipidemia familiar e dos seus familiares em risco pode aumentar a qualidade e a esperança de vida destes indivíduos, por aplicação de uma orientação terapêutica adequada, que possa possibilitar a redução da incidência de doenças cardiovasculares prematuras.

Palavras-chave: doença cardiovascular, dislipidemia, hipercolesterolemia familiar, dislipidemia familiar combinada.

Abstract

Familial hypercholesterolaemia (FH) is an autosomal dominant disorder that is characterized by increased levels of cholesterol and premature arteriosclerosis and cardiovascular disease. Mutations in *LDLR*, *APOB* and *PCSK9* genes are responsible for FH. Familial combined hyperlipidaemia (FCHL) is a polygenic disorder also related with the presence of premature cardiovascular disease. The phenotype of FCHL has been associated with defects in the *LPL*, *APOC2*, *APOC3*, *APOA4* and *APOA5* genes.

The aim of this work was the clinical and molecular characterization of patients with a clinical diagnosis of familial dyslipidaemia, particularly FH. Another purpose of this study was the evaluation of the clinical criteria for FH.

The sample was composed of 40 index patients (adults and children of both sexes), referred to INSA with clinical diagnosis of FH. The biochemical characterization allowed the evaluation of the phenotype of the patient and made possible the inference of the application of clinical diagnostic criteria of FH. The molecular characterization included the search for defects in *LDLR*, *APOB* and *PCSK9* genes, using the techniques of dHPLC, automated sequencing and MLPA. In 5 of these patients that also presented high levels of TG, the search for defects in *LPL*, *APOC2*, *APOC3*, *APOA4* and *APOA5* genes was done by automated sequencing.

The molecular study of the 40 index patients had identified 15 (37,5%) patients with an alteration in one of the three genes associated with FH. In 31-39% of the total 609 Portuguese index patients that had already been studied by PFHS, the clinical diagnosis obtained from the application of the clinical criteria didn't match with the results from the molecular study. The molecular study of genes associated with FCHL had just identified genetic defects that are referred as polymorphisms.

An early identification of index patients with familial dyslipidaemia and of relatives at risk can increase the quality of life and the life expectancy, by the application of an adequate therapy that can help to reduce the incidence of premature cardiovascular diseases.

Key words: cardiovascular disease, dyslipidaemia, familial hypercholesterolaemia, familial combined hyperlipidaemia.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice de figuras	vi
Índice de tabelas	vii
Lista de abreviaturas	ix
Capítulo 1. Introdução.....	1
1.1. Doença cardiovascular	1
1.1.1. Aterosclerose.....	2
1.2. Lípidos	4
1.2.1. Lipoproteínas	5
1.2.1.1. Apolipoproteínas.....	6
1.2.1.2. Metabolismo das lipoproteínas	8
1.2.2. Colesterol.....	12
1.2.3. Triglicéridos.....	13
1.3. Dislipidemia	13
1.3.1. Dislipidemias familiares	14
1.3.1.1. Hipercolesterolemia familiar	15
1.3.1.1.1. Critérios de diagnóstico clínico	16
1.3.1.1.2. Estudo molecular	18
1.3.1.2. Dislipidemia familiar combinada.....	21
1.3.1.2.1. Estudo molecular.....	22
1.3.1.3. Terapêutica para as dislipidemias familiares	24
1.4 Objectivos	26
Capítulo 2. Materiais e métodos	27
2.1. Amostra de estudo	27
2.2. Caracterização bioquímica	28
2.2.1. Quantificação de lípidos e apolipoproteínas	28
2.3. Aplicação de critérios para o diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar	29
2.4. Caracterização molecular.....	29
2.4.1. Extração de DNA	30
2.4.2. Amplificação de DNA	31
2.4.3. Pesquisa de alterações nos genes de interesse.....	33
2.4.3.1. Cromatografia líquida de elevada performance desnaturante (dHPLC).....	33
2.4.3.2. Sequenciação automática.....	34
2.4.3.3. Análise de grandes rearranjos no gene do receptor das lipoproteínas de baixa densidade por <i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i> (MLPA)	36

Capítulo 3. Resultados	38
3.1 Caracterização bioquímica	38
3.2. Estudo molecular de genes causadores de hipercolesterolemia familiar	40
3.2.1. Gene <i>LDLR</i>	43
3.2.2. Gene <i>APOB</i>	51
3.2.3. Gene <i>PCSK9</i>	53
3.3. Diagnóstico clínico versus diagnóstico molecular de hipercolesterolemia familiar	53
3.4. Estudo molecular de genes associados ao fenótipo de dislipidemia familiar combinada	60
3.4.1. Gene <i>LPL</i>	60
3.4.2. Gene <i>APOC2</i>	60
3.4.3. Gene <i>APOC3</i>	60
3.4.4. Gene <i>APOA4</i>	61
3.4.5. Gene <i>APOA5</i>	62
Capítulo 4. Discussão	64
4.1 Hipercolesterolemia familiar	64
4.1.1. Diagnóstico genético de hipercolesterolemia familiar	66
4.1.2. Casos-índice sem nenhuma alteração nos genes em estudo	74
4.1.3. Comparação entre diagnóstico clínico e diagnóstico molecular da hipercolesterolemia familiar	75
4.2. Dislipidemia familiar combinada	78
4.2.1. Estudo molecular	78
Capítulo 5. Considerações finais e perspectivas futuras	81
Referências bibliográficas	83
Anexos	91
Anexo A – Inquérito clínico de um caso-índice do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar	91
Anexo B – Inquérito clínico de um familiar do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar	92
Anexo C – Especificações associadas às determinações bioquímicas realizadas no Daytona	93
Anexo D – Preparação de soluções	94
Anexo E – Condições da técnica de amplificação de DNA	96
Anexo F – Condições específicas da técnica de cromatografia líquida de elevada performance desnaturante (dHPLC)	103
Anexo G – Condições das técnicas de purificação e sequenciação de DNA	104
Anexo H – Especificações da técnica de <i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i> (MLPA)	105
Anexo I – Caracterização bioquímica e clínica da amostra	106

Índice de figuras

Figura 1.1. Evolução da mortalidade registada a nível mundial	2
Figura 1.2. Marcadores de inflamação e de instabilidade da placa aterosclerótica.....	3
Figura 1.3. Representação da estrutura de um dos tipos de lipoproteínas, as LDL (lipoproteínas de baixa densidade).....	5
Figura 1.4. Lipoproteínas e transporte lipídico.....	8
Figura 1.5. Via do receptor das lipoproteínas de baixa densidade.....	11
Figura 1.6. Colesterol.....	12
Figura 1.7. Triglicéridos.....	13
Figura 1.8. Esquema representativo do gene <i>LDLR</i>	19
Figura 1.9. Esquema representativo do gene <i>APOB</i>	20
Figura 1.10. Esquema representativo dos domínios da proteína PCSK9	21
Figura 2. 1. Etapas da reacção em cadeia da polimerase	32
Figura 2.2. Representação gráfica da análise por dHPLC (<i>denaturing high performance liquid chromatography</i>)	34
Figura 2.3. Sequenciação automática.....	35
Figura 2.4. Técnica de MLPA (<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>).....	36
Figura 3.1. Caso-índice 11311.....	44
Figura 3.2. Caso-índice 11215.....	45
Figura 3.3. Caso-índice 11326.....	46
Figura 3.4. Caso-índice 12026.....	47
Figura 3.5. Caso-índice 12040.....	48
Figura 3.6. Caso-índice 11230.....	52
Figura 3.7. Comparação entre a avaliação dos critérios de diagnóstico de hipercolesterolemia familiar e os resultados do estudo molecular do grupo pediátrico.....	58
Figura 3.8. Comparação entre a avaliação dos critérios de diagnóstico de hipercolesterolemia familiar e os resultados do estudo molecular do grupo de adultos	59

Índice de tabelas

Tabela 1.1. Características das lipoproteínas humanas presentes no plasma	6
Tabela 1.2. Critérios desenvolvidos pelo <i>Simon Broome Register Group</i> para o diagnóstico de hipercolesterolemia familiar heterozigótica	16
Tabela 1.3. Critérios desenvolvidos pelo programa holandês <i>Dutch MEDPED</i> para o diagnóstico de hipercolesterolemia familiar heterozigótica.....	17
Tabela 3.1. Características da amostra em estudo	39
Tabela 3.2. Determinações bioquímicas realizadas	39
Tabela 3.3. Caracterização molecular do grupo pediátrico.....	41
Tabela 3.4. Caracterização molecular do grupo de adultos	42
Tabela 3.5. Distribuição dos casos-índice com e sem mutação pelos grupos amostrais de estudo	42
Tabela 3.6. Avaliação de alterações não descritas no gene <i>LDLR</i>	50
Tabela 3.7. Avaliação, <i>in silico</i> , de alterações não descritas no gene <i>LDLR</i>	51
Tabela 3.8. Comparação entre os diagnósticos clínico e molecular de FH para o grupo pediátrico	53
Tabela 3.9. Comparação entre os diagnósticos clínico e molecular de FH para o grupo de adultos	54
Tabela 3.10. Avaliação da amostra de 609 casos-índice do EPHF segundo os critérios de diagnóstico clínico para a hipercolesterolemia familiar.....	55
Tabela 3.11. Comparação entre os diagnósticos clínico e molecular de FH para a amostra total de 236 crianças estudadas no EPHF	56
Tabela 3.12. Comparação entre os diagnósticos clínico e molecular de FH para a amostra total de 373 adultos estudados no EPHF.....	57
Tabela 3.13. Estudo molecular do gene <i>LPL</i>	60
Tabela 3.14. Estudo molecular do gene <i>APOC3</i>	61
Tabela 3.15. Estudo molecular do gene <i>APOA4</i>	62
Tabela 3.16. Estudo molecular do gene <i>APOA5</i>	63
Tabela C.1. Soluções de trabalho utilizadas para as determinações bioquímicas efectuadas no aparelho Daytona (Randox) e intervalos de referência recomendados pelo fabricante	93
Tabela E.1. <i>Primers</i> utilizados nas reacções de PCR e sequenciação do gene <i>LDLR</i>	96
Tabela E.2. <i>Primers</i> utilizados nas reacções de PCR e sequenciação do gene <i>APOB</i>	97
Tabela E.3. Programa utilizado nas reacções de PCR dos genes <i>LDLR</i> e <i>APOB</i>	97
Tabela E.4. <i>Primers</i> utilizados nas reacções de PCR e sequenciação do gene <i>PCSK9</i>	98
Tabela E.5. Programa utilizado nas reacções de PCR do gene <i>PCSK9</i>	98
Tabela E.6. <i>Primers</i> utilizados nas reacções de PCR e sequenciação do gene <i>LPL</i>	99
Tabela E.7. Programa utilizado nas reacções de PCR do gene <i>LPL</i>	99
Tabela E.8. <i>Primers</i> utilizados nas reacções de PCR e sequenciação do gene <i>APOC2</i>	100
Tabela E.9. Programa utilizado nas reacções de PCR do gene <i>APOC2</i>	100
Tabela E.10. <i>Primers</i> utilizados nas reacções de PCR e sequenciação do gene <i>APOC3</i>	100
Tabela E.11. Programa utilizado nas reacções de PCR do gene <i>APOC3</i>	101
Tabela E.12. <i>Primers</i> utilizados nas reacções de PCR e sequenciação do gene <i>APOA4</i>	101
Tabela E.13. Programa utilizado nas reacções de PCR do gene <i>APOA4</i>	101
Tabela E.14. <i>Primers</i> utilizados nas reacções de PCR e sequenciação do gene <i>APOA5</i>	102
Tabela E.15. Programa utilizado nas reacções de PCR do gene <i>APOA5</i>	102

Tabela F.1. Temperaturas utilizadas na cromatografia líquida de alta performance desnaturante (dHPLC).....	103
Tabela G.1. Programa utilizado na purificação de todos os genes em estudo	104
Tabela G.2. Programa utilizado na sequenciação de todos os genes em estudo	104
Tabela H.1.Mistura de sondas (<i>SALSA MLPA probemix P062-C2 LDLR</i> ; MRC-Holland) utilizada na técnica de <i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i> (MLPA).....	105
Tabela I.1. Caracterização bioquímica dos casos-índice que constituem o grupo pediátrico....	106
Tabela I.2. Caracterização clínica dos casos-índice que constituem o grupo de adultos	107
Tabela I.3. Determinações bioquímicas realizadas no aparelho Daytona, efectuadas nos casos-índice que constituem o grupo pediátrico	109
Tabela I.4. Determinações bioquímicas realizadas no aparelho Daytona, efectuadas nos casos-índice que constituem o grupo de adultos	109

Lista de abreviaturas

- Abs** absorvância
ACAT acil-CoA:colesterol aciltransferase
apo apolipoproteína
ARH hipercolesterolemia autossômica recessiva (*autosomal recessive hypercholesterolaemia*)
AVC acidente vascular cerebral
CAD doença arterial coronária (*coronary artery disease*)
c-HDL colesterol associado às HDL
c-LDL colesterol associado às LDL
c-sdLDL colesterol associado às *small dense low density lipoproteins*
CT colesterol total
c-VLDL colesterol associado às VLDL
Da Dalton
dATP desoxiadenosina trifosfato
DCV doença cardiovascular
dCTP desoxicitidina trifosfato
ddNTP didesoxirribonucleótido trifosfato
dGTP desoxiguanosina trifosfato
dHPLC cromatografia líquida de alta performance desnaturante (*denaturing high performance liquid chromatography*)
dL decilitro
DMP Dutch MEDPED
DMSO dimetilsulfóxido
DNA ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
dNTP desoxirribonucleótido trifosfato
dTTP desoxitimidina trifosfato
EAM enfarte agudo de miocárdio
EDTA ácido etilendiaminotetracético
EGF factor de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor*)
FCHL dislipidemia familiar combinada (*familial combined hyperlipidaemia*)
FCT Fundação para a Ciência e Tecnologia
FDB deficiência familiar em apolipoproteína B (*familial defective apoB*)
FH hipercolesterolemia familiar (*familial hypercholesterolaemia*)
g grama
HDL lipoproteína de elevada densidade (*high density lipoprotein*)
HeFH hipercolesterolemia familiar heterozigótica (*heterozygous familial hypercholesterolaemia*)
HIV vírus da imunodeficiência adquirida (*human immunodeficiency virus*)
HMG-CoA redutase 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase
IDL lipoproteína de densidade intermédia (*intermediate density lipoprotein*)
INSA Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
Kb kilobase
kg quilograma
L litro
LCAT lecitina:colesterol aciltransferase
LDL lipoproteína de baixa densidade (*low density lipoprotein*)

LDLR receptor das lipoproteínas de baixa densidade (*low density lipoprotein receptor*)
LDLRAP1 proteína 1 adaptadora do receptor das lipoproteínas de baixa densidade (*low density receptor adaptor protein 1*)
Lp(a) lipoproteína (a)
LPL lipoproteína lipase
m metro
MEDPED *Make Early Diagnosis to Prevent Early Death*
mg miligrama
mM milimolar
mmol milimole
mL mililitro
MLPA *multiplex ligation-dependent probe amplification*
mRNA ácido ribonucleico mensageiro
NCBI *National Center for Biotechnology Information*
ng nanograma
nm nanómetro
OLS hidratos de carbono tipo O (*O-linked sugars*)
PAD doença arterial periférica (*peripheral artery disease*)
pb pares de bases
PCR reacção em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)
PCSK9 pró-proteína convertase subtilisina/quexina 9 (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*)
pmol picomole
PolyPhen-2 *polymorphism phenotyping v2*
RNA ácido ribonucleico
rpm rotações por minuto
SAP *shrimp alkaline phosphatase*
SBRG *Simon Broome Register Group*
SDS dodecil sulfato de sódio
sdLDL *small dense low density lipoprotein*
SIDA síndrome da imunodeficiência adquirida
SIFT *Sorting Intolerant From Tolerant*
SPC Sociedade Portuguesa de Cardiologia
TG triglicéridos
TM transmembranar
TNFRSF1B *tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B*
U unidade de actividade enzimática
ULI unidade laboratorial integrada
USF1 *Upstream Transcription Factor 1*
UTI unidade de tecnologia e inovação
V Volt
VLDL lipoproteína de muito baixa densidade (*very low density lipoprotein*)
°C grau Célsius
µL microlitro
% (m/v) percentagem em termos de razão massa/volume

Capítulo 1. Introdução

1.1. Doença cardiovascular

A nível mundial, a doença cardiovascular (DCV) é responsável pela morte anual de cerca de 17 milhões de pessoas, encontrando-se, actualmente, associada a aproximadamente 29% do total de mortes registadas a nível mundial.^{1,2} A DCV afecta todo o globo, sendo a causa de cerca de 50% das mortes que ocorrem nos países desenvolvidos e de 28% das mortes que ocorrem nos países em vias de desenvolvimento.³ Na Europa, os óbitos por DCV representam 50% da mortalidade total e 30% destas mortes ocorrem antes dos 65 anos, considerando-se que esta doença é uma das principais causas de morte prematura ao nível dos países europeus.^{4,5} Em Portugal, a DCV constitui a principal causa de morte, sendo as doenças do aparelho circulatório umas das principais causas de morbilidade, invalidez e mortalidade.^{5,6}

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera que a DCV consegue ser, isoladamente, a causa maioritária de mortalidade global e prevê que esta doença continue a dominar as tendências de mortalidade no futuro.⁷

A DCV inclui um vasto conjunto de patologias, onde se inserem as doenças do músculo cardíaco e do sistema vascular. As principais entidades clínicas associadas à morbilidade e mortalidade da DCV são a doença arterial coronária (CAD, *coronary artery disease*), o acidente vascular cerebral (AVC) isquémico e a doença arterial periférica (PAD, *peripheral artery disease*).^{3,8}

Na figura 1.1 é possível observar uma estimativa da evolução da mortalidade por DCV e dum aumento da incidência das doenças crónicas em relação às doenças infecciosas.⁹ Uma projecção para 2030 indica que as doenças não transmissíveis irão contribuir para mais de $\frac{3}{4}$ das mortes que ocorrerão a nível mundial e que o número de mortes que serão causadas por DCV, nos países em vias de desenvolvimento, será superior ao das mortes que serão causadas conjuntamente por doenças infecciosas, incluindo a SIDA, a tuberculose e a malária.^{9,10}

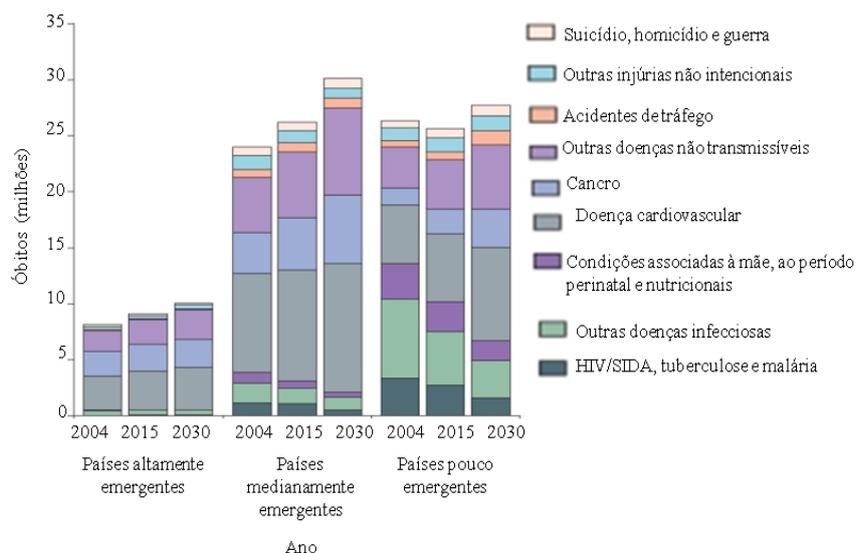


Figura 1.1. Evolução da mortalidade registrada a nível mundial. A mortalidade por doença cardiovascular tem tendência a aumentar, a nível global. Em 2030, nos países medianamente e pouco emergentes, o número de óbitos por doença cardiovascular será superior ao dos óbitos que serão causados conjuntamente por doenças infecciosas, incluindo a SIDA, a tuberculose e a malária.⁹ (Adaptado)

Apesar da DCV ser considerada um problema mundial, a morbidade e a mortalidade associadas a esta doença podem ser reduzidas através de intervenções que se direccionem para os seus factores de risco.²

O risco de desenvolvimento de DCV depende de um vasto conjunto de factores de risco, que se classificam segundo três categorias: factores biológicos, como por exemplo, a hipertensão, a hipercolesterolemia (níveis elevados de colesterol no sangue), a hiperglicemia (níveis elevados de glucose no sangue) e a obesidade; factores associados ao estilo de vida, como por exemplo, o tabagismo, a dieta, o consumo excessivo de álcool e o sedentarismo; outros factores determinantes que, por sua vez, podem ser divididos em factores fixos, como a idade, o sexo, a genética e a etnia e em factores modificáveis, como os rendimentos, a educação e as condições socio-económicas.^{3,4,8} No entanto, há que ter em conta que o perfil de risco cardiovascular difere ao longo do tempo e é específico da população em causa, pelo que as estratégias de intervenção e de prevenção têm de ser adaptadas a cada população.¹⁰

1.1.1. Aterosclerose

A aterosclerose, uma doença sistémica caracterizada pela deposição de lípidos sobre a parede das artérias, está na base da maior parte das formas de DCV.¹¹

A placa aterosclerótica foi primeiramente identificada como lesão fundamental da aterosclerose por Virchow, em 1856.¹² Esta placa contém uma superfície fibrosa constituída por colagénio e células do músculo liso, sob a qual se encontra uma massa

desorganizada de lípidos, detritos celulares, fibrina e outras proteínas plasmáticas.¹² A placa aterosclerótica desenvolve-se através de diferentes fases (figura 1.2), sendo que no início começa por ocorrer uma lesão primária, que pode evoluir para uma lesão intermédia e desencadear uma lesão mais complexa e agravada.^{13,14}

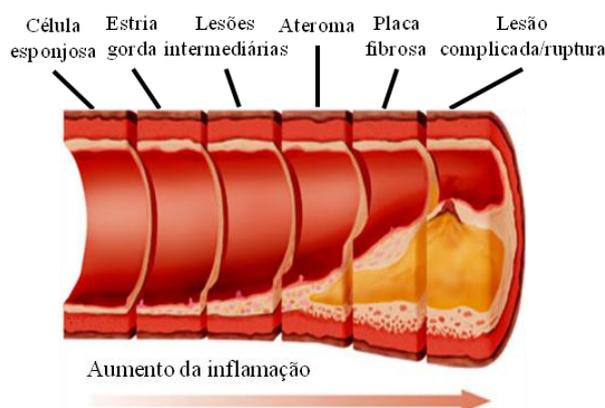


Figura 1.2. Marcadores de inflamação e de instabilidade da placa aterosclerótica. O aumento da inflamação e da deposição de lípidos aumenta à medida que a placa aterosclerótica se desenvolve, sendo caracterizado pela presença de marcadores associados a cada uma das fases do desenvolvimento da placa.¹⁴ (Adaptado)

A aterosclerose inicia-se pelo depósito de lípidos, nomeadamente de c-LDL, colesterol associado às lipoproteínas de baixa densidade (LDL, *low density lipoprotein*), na parede das artérias.^{12,13} A acumulação de partículas de LDL na íntima arterial leva a modificações oxidativas da LDL por acção de produtos metabólicos, radicais livres de oxigénio e enzimas produzidas por células vasculares (macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas).^{12,13,15}

As partículas oxidadas são citotóxicas para as células endoteliais, resultando em lesões.¹⁶ Adicionalmente, a oxidação das partículas de LDL atrai mais monócitos e expande a resposta inflamatória, estimulando a diferenciação dos monócitos em macrófagos.¹⁶ Os macrófagos fagocitam as LDL oxidadas, transformando-as em células esponjosas.^{12,13,16} A deposição de células esponjosas forma as estrias lipídicas que caracterizam a lesão primária da aterosclerose.^{12,13} A lesão pode evoluir à medida que ocorre a progressiva acumulação de tecido conjuntivo, células musculares lisas, lipídios e células espumosas, formando-se a placa característica da aterosclerose.^{12,13,15}

A aterosclerose é uma doença essencialmente assintomática até à ocorrência de dor associada ao desenvolvimento de angina de peito ou a outras complicações mais graves, como obstrução total dos vasos, enfarte agudo do miocárdio (EAM) ou AVC isquémico.^{11,12} A progressão da lesão pode provocar a obstrução dos vasos sanguíneos e desencadear isquemia, ficando o músculo cardíaco privado de oxigénio, ou pode levar à ruptura da placa, formando um trombo.¹⁵ Quando o trombo se forma no interior de uma

artéria coronária ocorre uma trombose coronária, uma doença isquêmica cardíaca que representa a causa mais comum de EAM.¹⁵ A artéria afectada pode encontrar-se noutra parte do corpo, como por exemplo no cérebro, onde a obstrução de uma artéria desencadeia um AVC isquémico.¹⁶

Tal como a DCV, a aterosclerose é uma patologia multifactorial, uma vez que se encontra, também, associada a vários factores de risco, tais como dislipidemia, hipertensão e tabagismo.¹² Em 1938, Thannhauser e Magendantz foram dos primeiros investigadores a relacionar a aterosclerose e também o aparecimento de xantomias (acumulações de lípidos) com a ocorrência de elevados níveis de colesterol no soro.¹²

Apesar da ocorrência de avanços significativos no âmbito da aterosclerose, esta patologia prevalece como a maior causa de morbilidade e mortalidade em sociedades industrializadas.¹¹

A etiologia da DCV e da sua causa subjacente, a aterosclerose, são complexas, uma vez que englobam várias influências genéticas e ambientais. A elevada influência de factores genéticos sobre estas patologias torna relevante a realização de estudos na área da genética cardiovascular.¹⁷

A genética cardiovascular inclui o estudo da influência dos factores genéticos sobre a DCV. A pesquisa nesta área pode contribuir para um maior conhecimento da DCV, uma vez que a genética é um dos factores que define o risco cardiovascular do indivíduo.^{10,18,19} A investigação ao nível desta área tem cada vez mais impacto na definição do diagnóstico e prognóstico de certas doenças, pelo que pode auxiliar aquando da escolha da terapêutica que deverá ser prescrita, sendo também importante ao nível da prevenção de desenvolvimento prematuro de DCV.^{19,20}

1.2. Lípidos

Os lípidos são um grupo quimicamente diverso de compostos que têm em comum o facto de serem insolúveis em água. As suas funções biológicas são igualmente diversas, sendo reconhecidos como principais reservas energéticas de vários organismos, componentes estruturais de membranas biológicas, precursores de outras substâncias. No entanto, apesar de serem nutrientes indispensáveis para o organismo humano, têm sido realizados, nas últimas décadas, diversos estudos que associam o excesso de lípidos ao desenvolvimento da aterosclerose e ao aumento do risco de ocorrência de DCV. Já no século XXI, um estudo denominado *INTERHEART* confirmou a relação entre níveis anormais de lípidos no sangue e risco de desenvolvimento de DCV, em todas as regiões do globo.^{10,21-23}

1.2.1. Lipoproteínas

As células podem obter ácidos gordos a partir da ingestão de lípidos na dieta, da utilização de lípidos armazenados, do transporte lipídico entre órgãos, da conversão de hidratos de carbono em lípidos. Assim, um metabolismo lipídico que permita um eficaz catabolismo de lípidos é essencial para a obtenção de ácidos gordos, que podem, depois, intervir em vias de obtenção de energia.²²

Os lípidos presentes no plasma podem resultar de uma de duas origens, a endógena ou a exógena. Os lípidos de origem endógena são sintetizados no fígado e os de origem exógena provêm da dieta, sendo absorvidos pelo intestino e transportados depois para o fígado. Como os lípidos são insolúveis em água, o seu transporte é efectuado através de complexos macromoleculares, as lipoproteínas.^{21,22,24}

As lipoproteínas são partículas esféricas que consistem em lípidos e proteínas associados de forma não covalente. A sua estrutura do tipo micelar é constituída por um centro de lípidos apolares (triglicéridos e ésteres de colesterol) e lípidos de maior polaridade (parte polar dos fosfolípidos e colesterol livre) orientados para a superfície. A heteroproteína localizada à superfície da estrutura globular denomina-se apolipoproteína (apo). As diferentes combinações de lípidos e proteínas produzem lipoproteínas de diferentes densidades. Na figura 1.3 pode observar-se a estrutura molecular das LDL, um tipo de lipoproteínas.^{21,22,24}

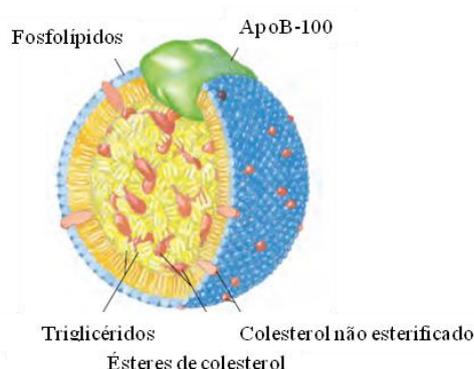


Figura 1.3. Representação da estrutura de um dos tipos de lipoproteínas, as LDL (lipoproteínas de baixa densidade). Os triglicéridos e os ésteres de colesterol encontram-se orientados para o centro da estrutura e a parte polar dos fosfolípidos e o colesterol não esterificado estão orientados para a superfície, tal como o ligando deste tipo de lipoproteínas, a apolipoproteínaB-100.²² (Adaptado)

As lipoproteínas plasmáticas dividem-se em seis principais classes de acordo com o seu tamanho, densidade, composição lipídica e proteica, tal como se observa na tabela 1.1.^{21,24,25}

Tabela 1.1. Características das lipoproteínas humanas presentes no plasma.²⁴ (Adaptado)

Variável	Classe de lipoproteínas					
	Quilomicras	VLDL	IDL	LDL	HDL	Lp(a)
Densidade (g/mL)	<0,95	0,95-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,210	1,040-1,130
Peso molecular (Da)	0,4-30 ($\times 10^9$)	5-10 ($\times 10^6$)	3,9-4,8 ($\times 10^6$)	2,75 $\times 10^6$	1,8-3,6 ($\times 10^5$)	2,9-3,7 ($\times 10^6$)
Diâmetro (nm)	>70	25-75	22-24	19-23	4-10	25-30
Razão lípido:proteína	99:1	90:10	85:15	80:20	50:50	75:25-64:36
Principais lípidos transportados	TG exógenos	TG endógenos	TG endógenos, ésteres de colesterol	ésteres de colesterol	fosfolípidos	ésteres de colesterol, fosfolípidos
Principais apolipoproteínas	apoA-I apoB-48 apoC-I apoC-II apoC-III	apoB-100 apoC-I apoC-II apoC-III apoE	apoB-100 apoE	apoB-100	apoA-I apoA-II	apo(a) apoB-100

Abreviaturas: VLDL, lipoproteínas de muito baixa densidade; IDL, lipoproteínas de densidade intermédia; LDL, lipoproteínas de baixa densidade; HDL, lipoproteínas de elevada densidade; Lp(a), lipoproteína (a); g, grama; mL, mililitro; Da, Dalton; nm, nanómetro; TG, triglicéridos; apo, apolipoproteína.

A separação das lipoproteínas por ultracentrifugação divide-as, por ordem crescente de densidade, em quilomicras, VLDL, lipoproteínas de densidade intermédia (IDL, *intermediate density lipoprotein*), LDL e HDL. A lipoproteína(a), Lp(a), representa uma classe distinta de lipoproteínas e encontra-se estruturalmente relacionada com as LDL, havendo evidências que a consideram um factor de risco independente para a ocorrência de DCV.^{21,24,25}

As LDL estão associadas a um elevado risco cardiovascular e o c-LDL continua a ser o alvo primário da terapia para a prevenção de DCV. Por outro lado, a heterogeneidade das partículas de LDL e o risco de aterosclerose cada vez mais reconhecido de outras partículas lipoproteicas e de apolipoproteínas requer atenção, uma vez que podem funcionar como alvo de intervenções terapêuticas. Por exemplo, as sub-fracções mais pequenas e mais densas das LDL, denominadas *small dense LDL* (sdLDL) são, actualmente, reconhecidas como partículas altamente aterogénicas.^{25,26}

1.2.1.1. Apolipoproteínas

As apolipoproteínas, constituintes das lipoproteínas, funcionam como ligandos de determinados receptores e enzimas.^{21,22} Na tabela 1.1 é possível observar que cada classe de lipoproteínas é caracterizada por uma razão lípido:proteína específica e pelo tipo de apolipoproteína presente, sendo que as LDL são as únicas lipoproteínas que possuem apenas um tipo de apo, a apoB-100.²⁴

A apoA-I é uma proteína sintetizada no fígado e, também, em menor extensão, no intestino.^{24,27} Esta proteína desempenha um papel importante na homeostase celular do colesterol, na medida em que é o cofactor da enzima lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) que intervém na formação de ésteres de colesterol, permitindo,

assim, o transporte de colesterol no plasma.^{24,28} Ao funcionar como cofactor da enzima LCAT, a apoA-I actua ao nível da regulação do transporte reverso do colesterol, desde os tecidos extracelulares até ao fígado, podendo ter um carácter protector contra a aterosclerose.²⁸

As funções da apoA-II ainda não estão totalmente esclarecidas, havendo estudos que sugerem o seu envolvimento no metabolismo de triglicéridos (TG) humanos e que mostram uma associação directa entre os níveis plasmáticos de apoA-II e de TG. Para além disso, algumas evidências sugerem que a apoA-II poderá inibir a activação da LCAT pela apoA-I.^{24,29}

A apoB existe em duas isoformas, a apoB-100 e a apoB-48. A apoB-100 é sintetizada no fígado e é a constituinte das VLDL, das IDL e única proteína das LDL. Como é o único ligando das LDL e pode ser reconhecido pelo receptor das LDL, tem um papel fundamental na internalização de partículas de LDL e na sua consequente remoção do plasma. A apoB-48, que resulta de uma modificação pós-transcricional do mRNA da apoB-100, é a maior constituinte das quilomicras e é sintetizada no intestino.^{24,30}

A apoC-I, a apoC-II e a apoC-III estão presentes nas quilomicras, nas VLDL e nas IDL. A apoC-I parece estar envolvida na activação da enzima LCAT. A apoC-II, por seu lado, actua como cofactor da enzima lipoproteína lipase (LPL), que catalisa a hidrólise dos TG das lipoproteínas, sendo importante no metabolismo das lipoproteínas ricas em TG. Apesar da função metabólica da apoC-III ainda não estar esclarecida, há evidências de que poderá participar na regulação das enzimas LCAT e LPL, activando a primeira e inibindo a segunda.^{24,31}

A apoE, constituinte das quilomicras, VLDL e IDL, é uma glicoproteína importante ao nível do metabolismo das quilomicras e VLDL remanescentes, regulando a internalização de lipoproteínas no fígado. A apoE pode existir em três isoformas, E₂, E₃ e E₄. A apoE₂ apresenta uma menor afinidade para o receptor das LDL do que as restantes isoformas, o que tem como consequência uma remoção retardada das quilomicras e VLDL remanescentes. A apoE₄ pode ligar-se de forma mais eficiente ao receptor das LDL, competindo com a apoB pela ligação a este receptor, o que resulta numa remoção preferencial das quilomicras e VLDL remanescentes que contêm esta isoforma, relativamente às que contêm outras isoformas da apoE e, também, às LDL que contêm apoB. Assim, pela remoção preferencial das VLDL, a presença da isoforma apoE₄ leva a uma diminuição da remoção de LDL e, consequentemente, a um aumento dos níveis de LDL no plasma do indivíduo, o que contribui para o desenvolvimento de aterosclerose.^{24,32-35}

1.2.1.2. Metabolismo das lipoproteínas

O metabolismo dos lípidos e das lipoproteínas é uma via bioquímica complexa, constituída por diversas etapas (figura 1.4).^{22,36}

As vias metabólicas em que as lipoproteínas participam para realizar o transporte de lípidos dividem-se, geralmente, em: a) via exógena, que transporta lípidos absorvidos através da dieta; b) via endógena, que transporta lípidos de origem hepática; c) via intracelular do receptor das lipoproteínas de baixa densidade; d) via do transporte reverso de colesterol.^{20,24}

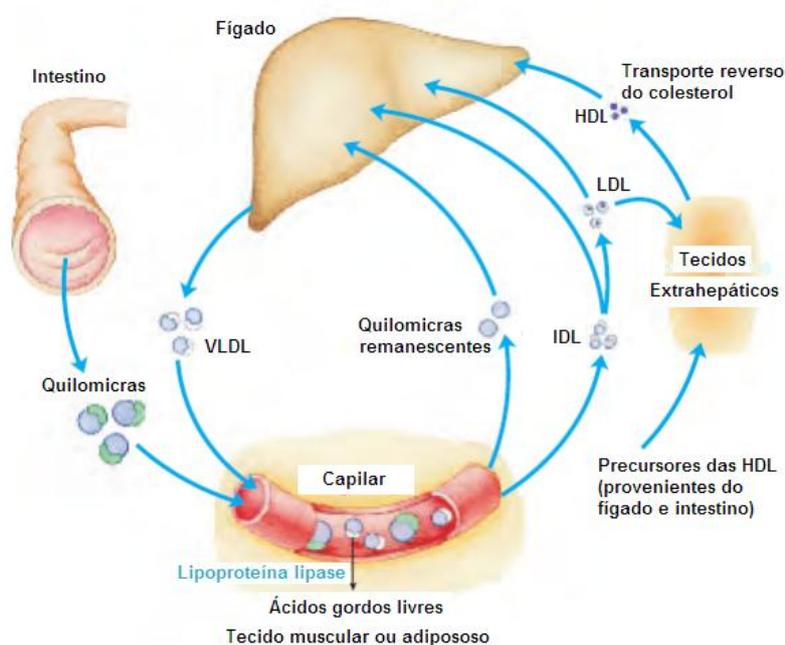


Figura 1.4. Lipoproteínas e transporte lipídico. Os lípidos são transportados através da circulação sanguínea por lipoproteínas. Os lípidos da dieta são internalizados pelas quilomicras, sendo a maior parte dos triglicéridos libertada pela lipoproteína lipase para o tecido muscular ou adiposo, durante o transporte através dos capilares. O colesterol circula continuamente entre o fígado e os tecidos circundantes, por acção das lipoproteínas. Enquanto as LDL conseguem transportar o colesterol do fígado para os tecidos extrahepáticos, as HDL transportam o colesterol novamente para o fígado. Abreviaturas: HDL, lipoproteínas de elevada densidade; IDL, lipoproteínas de densidade intermédia; LDL, lipoproteínas de baixa densidade; VLDL, lipoproteínas de muito baixa densidade.²²(Adaptado)

Os lípidos são transportados através da circulação sanguínea por lipoproteínas. Os lípidos da dieta são absorvidos no intestino e internalizados pelas quilomicras, sendo os TG hidrolisados em ácidos gordos e glicerol, pela lipoproteína lipase, durante o transporte através dos capilares do tecido adiposo. Os ácidos gordos livres são utilizados para o metabolismo energético ou são esterificados, formando lipoproteínas que são exportadas pelo hepatócito e utilizadas por outros órgãos, e o glicerol pode ser reutilizado pelo fígado.^{21,22,24}

Os lípidos endógenos são incorporados no tecido muscular ou adiposo pelas VLDL. A extração de lípidos das VLDL, acompanhada da perda de algumas apolipoproteínas, converte gradualmente algumas destas lipoproteínas em LDL, que entregam o colesterol aos tecidos extrahepáticos ou de volta ao fígado. O excesso de colesterol nos tecidos extrahepáticos é transportado de volta ao fígado pelas HDL. O fígado é capaz de captar LDL, VLDL remanescentes, quilomicras remanescentes e HDL, através de endocitose mediada por receptores, e metaboliza o colesterol, convertendo-o em ácidos biliares ou em ésteres de colesterol.^{21,22,24}

a) Via exógena

O colesterol e os TG exógenos, provenientes da dieta, são absorvidos através das células da mucosa intestinal e integrados em grandes lipoproteínas, as quilomicras. Estas partículas recém-formadas são constituídas essencialmente por TG, apoB-48 e apolipoproteínas A mas ao entrarem em circulação incorporam apolipoproteínas C e E das HDL. A apoC-II, presente à superfície das quilomicras, permite a activação da enzima LPL que se encontra à superfície das células endoteliais, ocorrendo a hidrólise dos TG em ácidos gordos e glicerol.^{21,22,24,37}

Os ácidos gordos podem ser utilizados como fonte de energia de células musculares ou ser armazenados nas células adiposas. Algumas moléculas de fosfolípidos e de apolipoproteínas A são transferidas das quilomicras para as HDL. As partículas recém-formadas, as quilomicras remanescentes, constituídas maioritariamente por proteínas e colesterol, podem ser reconhecidas por receptores hepáticos específicos e internalizadas por endocitose, sendo os seus componentes hidrolisados nos lisossomas. O colesterol libertado é transformado em ácidos biliares, incorporado noutras lipoproteínas recém-formadas ou armazenado sob a forma de ésteres de colesterol.^{21,22,24,37}

b) Via endógena

Os hepatócitos sintetizam TG e colesterol a partir de hidratos de carbono e ácidos gordos, através da activação da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase). Estas moléculas de colesterol e de TG de origem endógena podem ser incorporadas em vesículas do complexo de Golgi, que são transportadas por exocitose para o espaço extracelular, sendo, assim, introduzidas na circulação sob a forma de VLDL. Estas lipoproteínas contêm apoB-100, apoE e pequenas quantidades de apolipoproteínas C na sua superfície. Tal como acontece com as quilomicras da via exógena, também as VLDL da via endógena adquirem apolipoproteínas C adicionais a partir das HDL circulantes.^{21,22,24,37}

A apoC-II presente à superfície das VLDL activa a enzima LPL nas células endoteliais, ocorrendo a hidrólise dos TG das VLDL. A hidrólise transfere as apolipoproteínas C novamente para as HDL, transformando as VLDL em VLDL remanescentes. Algumas destas partículas remanescentes são captadas por receptores hepáticos e outras são convertidas em partículas mais pequenas e densas, as IDL. As IDL podem ligar-se a receptores hepáticos específicos e serem removidas da circulação ou podem sofrer novas hidrólises, em que os restantes TG e todas as apolipoproteínas, com excepção da apoB-100, são transferidas para outras lipoproteínas, ocorrendo a transformação das IDL em LDL.^{21,22,24,37}

c) Via intracelular do receptor das lipoproteínas de baixa densidade

O c-LDL é removido do plasma por um receptor celular específico presente na superfície hepática, o receptor das LDL (LDLR, *low density lipoprotein receptor*) (figura 1.5).^{21,22,24,37}

O LDLR reconhece a apoB-100 à superfície da partícula de LDL. A ligação da LDL ao receptor permite a sua internalização por endocitose, através de uma vesícula de claterina. Posteriormente, a membrana de claterina dissocia-se e formam-se endossomas. A diminuição do pH do endossoma permite a dissociação entre a partícula de LDL e o seu receptor, sendo o LDLR reciclado de volta para a superfície celular, onde pode iniciar um novo ciclo de endocitose. A partícula de LDL migra para um lisossoma, onde a apoB-100 é degradada em pequenos péptidos e aminoácidos e os ésteres de colesterol são hidrolisados em colesterol, que fica disponível para as funções de síntese de membranas celulares, hormonas esteróides e ácidos biliares. Os níveis de colesterol são auto-regulados pelo hepatócito. Por exemplo, o excesso de colesterol dentro do hepatócito leva a: diminuição da síntese de colesterol endógeno, por inibição da enzima HMG-CoA redutase; aumento da formação de ésteres de colesterol, por activação da enzima acil-CoA:colesterol aciltransferase (ACAT); inibição da síntese de novos receptores de LDL através da supressão da transcrição do seu gene.^{21,22,24,37}

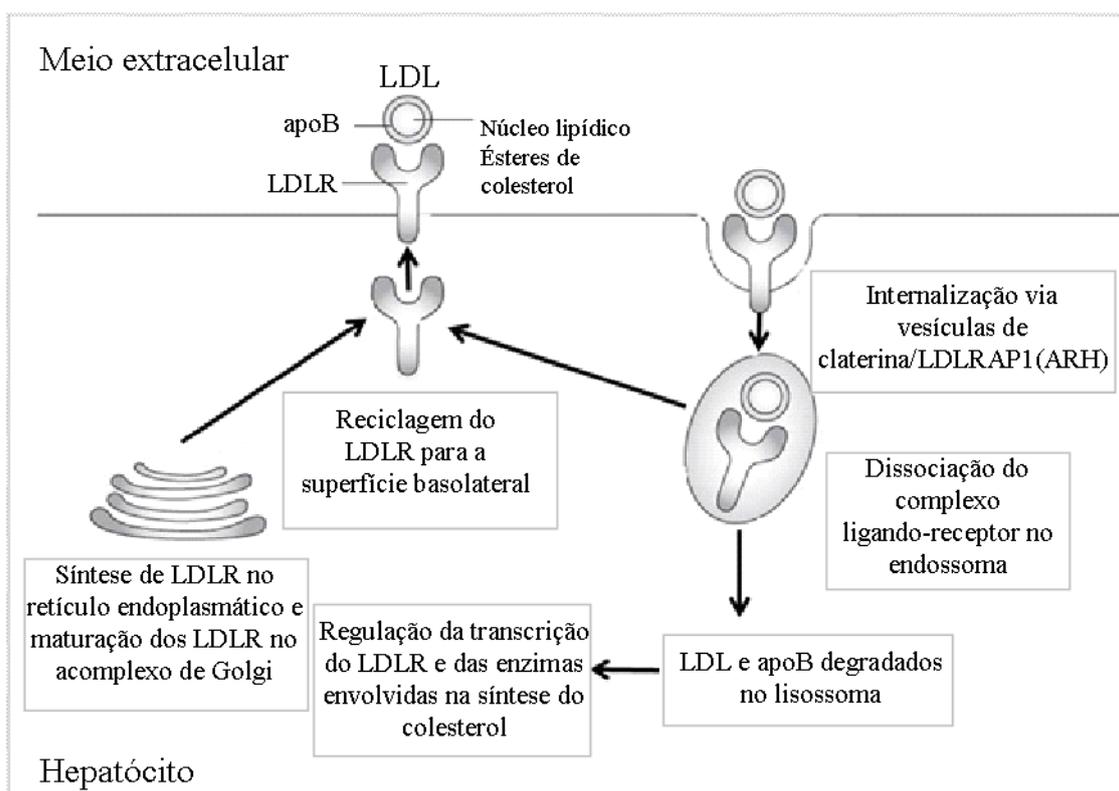


Figura 1.5. Via do receptor das lipoproteínas de baixa densidade. O receptor das LDL é uma glicoproteína sintetizada no retículo endoplasmático e processada no complexo de Golgi, que produz a proteína madura. Na superfície da célula, o receptor liga-se especificamente à apolipoproteína B da LDL e o complexo receptor-ligando é depois internalizado por endocitose. O complexo é transportado para os endossomas, onde o meio ácido causa a sua dissociação. O receptor é reciclado para a superfície celular enquanto a partícula LDL é degradada no lisossoma. A acumulação de colesterol livre, resultante da hidrólise dos ésteres de colesterol no núcleo das LDL, inibe a transcrição dos genes do receptor das LDL e das enzimas envolvidas na síntese do colesterol, sendo a via do receptor das LDL uma forma de manter a homeostase intracelular do colesterol. Abreviaturas: apoB, apolipoproteína B; LDL, lipoproteínas de baixa densidade; LDLR, receptor das LDL. ³⁸ (Adaptado)

d) Via do transporte reverso de colesterol

O colesterol livre que se encontra nas células extra-hepáticas pode ser transferido para as HDL, sendo esterificado através da acção da enzima LCAT, que tem como cofactor a apoA-I. Os ésteres de colesterol podem ser transferidos das HDL para lipoproteínas constituídas por apoB-100, por acção da proteína de transferência de ésteres de colesterol. O colesterol das HDL é reduzido por permuta com TG contidos nas lipoproteínas ricas em TG (quilomicras, VLDL e remanescentes). As partículas de HDL são posteriormente captadas por receptores hepáticos (*scavenger receptor*), que removem o conteúdo em colesterol destas lipoproteínas, iniciando o seu processo de excreção pela bÍlis. O mecanismo de transporte reverso do colesterol através das HDL

permite, então, a remoção do colesterol das células e, conseqüentemente, diminui o risco de progressão do processo aterosclerótico.^{21,22,24,37}

1.2.2. Colesterol

O colesterol (3-hidroxi-5,6-colesteno), cuja estrutura se encontra na figura 1.6, é o esterol mais abundante nos tecidos animais.^{21,22}

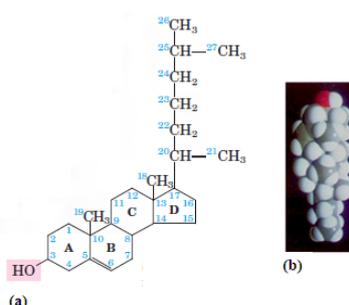


Figura 1.6. Colesterol. (a) Fórmula estrutural.²² (Adaptado) (b) Modelo espacial.²¹ (Adaptado)

Em termos de funcionalidade biológica, o colesterol é o componente maioritário das membranas plasmáticas animais, é precursor metabólico de hormonas esteróides, substâncias que regulam um grande número de funções biológicas, entre as quais se encontram o desenvolvimento sexual e o metabolismo de hidratos de carbono, e é constituinte das lipoproteínas do plasma sanguíneo, principalmente sob a forma de ésteres de colesterol.^{21,22}

Quando a quantidade de colesterol sintetizado e de colesterol obtido directamente na dieta excede a quantidade requerida para as suas funções biológicas, esta molécula acumula-se nos vasos sanguíneos, formando-se as já referidas placas ateroscleróticas.^{10,22,39}

A Sociedade Europeia de Cardiologia recomenda que o valor de colesterol total (CT) permaneça abaixo de 190 mg/dL e que o valor de c-LDL seja inferior a 115 mg/dL.⁴⁰ No entanto, para indivíduos com elevado risco cardiovascular, como é o caso de doentes com dislipidemias familiares, é recomendado que os níveis de c-LDL permaneçam abaixo de 100 mg/dL.^{8,40} Como o risco cardiovascular está também relacionado com a proporção entre o c-LDL e o c-HDL, colesterol associado às lipoproteínas de elevada densidade (HDL, *high density lipoprotein*), recomendam-se, também, limites relativamente às HDL, as lipoproteínas com carácter anti-aterogénico, sendo aconselhável que os níveis de c-HDL sejam superiores a 45 mg/dL para o sexo feminino e a 40 mg/dL para o sexo masculino.⁴⁰

1.2.3. Triglicéridos

Os lípidos que se encontram nos animais e nas plantas consistem em grande parte em misturas de TG. Os TG são triésteres de ácidos gordos e glicerol (figura 1.7), sendo moléculas apolares, hidrófobas e insolúveis em água. Nos vertebrados, estes compostos são armazenados em células especializadas, os adipócitos, que contêm lipases, enzimas que catalisam a hidrólise de TG armazenados e possibilitam a libertação de ácidos gordos que podem ser encaminhados para locais onde são necessários. Em certos animais, os TG funcionam não só como reservas energéticas mas também como uma protecção relativamente às baixas temperaturas.^{21,22}

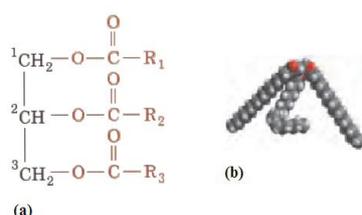


Figura 1.7. Triglicéridos. (a) Fórmula estrutural geral.²¹ (Adaptado) (b) Modelo espacial de um triglicérido.²² (Adaptado)

A presença de elevados níveis de TG, por associação com outros factores de risco de desenvolvimento prematuro de aterosclerose e DCV, como obesidade e diabetes tipo 2, contribui para um aumento do risco cardiovascular.^{41,42} Alguns estudos revelam a possibilidade dos níveis elevados de TG funcionarem como um factor de risco independente para a DCV.⁴²⁻⁴⁵ Assim, a detecção de elevados níveis de TG pode ser útil para a identificação de indivíduos com maior risco cardiovascular.^{41,42}

No que diz respeito aos TG, a Sociedade Europeia de Cardiologia recomenda que os seus valores permaneçam abaixo de 150 mg/dL.⁸ A associação entre a hipertrigliceridemia (elevados níveis plasmáticos de TG) e a ocorrência de DCV releva o facto da determinação da causa da hipertrigliceridemia ser importante para a prevenção e redução do risco cardiovascular.^{8,43,46-48}

1.3. Dislipidemia

O metabolismo lipídico pode ser perturbado de várias formas, o que leva a alterações nos níveis ou nas funções das lipoproteínas plasmáticas. Estas perturbações, de forma independente ou em interacção com outros factores de risco cardiovascular, podem contribuir para o desenvolvimento da aterosclerose.⁸

A dislipidemia inclui um vasto conjunto de patologias lipídicas, algumas das quais com grande relevância em termos de risco cardiovascular. Estas patologias podem

ter uma origem genética, sendo denominadas de dislipidemias primárias ou familiares, ou estar relacionadas com a ocorrência de outras doenças (diabetes, doenças hepáticas), sendo denominadas de dislipidemias secundárias. A interação entre as predisposições genéticas e os factores ambientais, como o sedentarismo, a dieta, ou a utilização de certos medicamentos, origina a denominada dislipidemia ambiental.^{8,38}

1.3.1. Dislipidemias familiares

Ao longo dos anos, têm sido descritas várias anomalias de carácter hereditário, relacionadas com o metabolismo das lipoproteínas. A caracterização clínica da dislipidemia e o estudo molecular dos genes que lhe estão associados são importantes para o diagnóstico de indivíduos com elevado risco cardiovascular e, também, para a compreensão das vias metabólicas das lipoproteínas, sendo desafios principais da genética cardiovascular. No entanto, é essencial ter presente que a ocorrência de interações entre os factores genéticos e ambientais contribui para uma variedade de fenótipos de dislipidemia.^{13,49}

A dislipidemia familiar pode ser de origem monogénica, quando um único gene é responsável pelo seu fenótipo, ou poligénica, quando o seu fenótipo resulta da interação entre diversos genes.¹³

A hipercolesterolemia de origem monogénica constitui uma dislipidemia familiar que apresenta quatro diagnósticos possíveis: hipercolesterolemia familiar (FH, *familial hypercholesterolaemia*); deficiência familiar em apoB (FDB, *familial defective apoB*); hipercolesterolemia autossómica dominante ou FH3; hipercolesterolemia autossómica recessiva (ARH, *autosomal recessive hypercholesterolaemia*). As três primeiras patologias apresentam uma transmissão autossómica dominante e são englobadas na designação de hipercolesterolemia familiar (FH), por apresentarem fenótipos semelhantes, podendo ser identificadas através do estudo molecular dos genes associados a cada uma. A ARH é uma dislipidemia familiar monogénica de transmissão autossómica recessiva, estando associada a alterações no gene *LDLRAP1* (Gene ID NCBI: 26119; NM_015627.2) que codifica para a proteína 1 adaptadora do receptor das LDL (*LDLRAP1*).^{13,38,49}

Quando o fenótipo indica a presença de hipertrigliceridemia, um diagnóstico possível é a existência de uma deficiência familiar em LPL (FLLD, *familial lipoprotein lipase deficiency*), uma patologia de causa monogénica e de transmissão autossómica recessiva.⁵⁰

A existência de um fenótipo variável em membros de uma mesma família, verificando-se hipercolesterolemia e/ou hipertrigliceridemia, pode ser indicativa da presença de uma dislipidemia familiar combinada (FCHL, *familial combined hyperlipidaemia*), uma patologia de origem poligénica.⁸

1.3.1.1. Hipercolesterolemia familiar

A hipercolesterolemia familiar (FH) é uma dislipidemia familiar, de transmissão autossômica dominante, sendo a dislipidemia monogénica mais comum e com estudos comprovados de associação à ocorrência de DCV prematura.^{8,37}

A FH é clinicamente caracterizada por (1) elevadas concentrações de LDL, a lipoproteína transportadora de grande parte do colesterol no plasma humano; (2) depósitos de colesterol derivado das LDL na pele ou tendões, sob a forma de xantomas, ou nas artérias, em ateromas; (3) história familiar de hipercolesterolemia e de DCV prematura.³⁷

A prevalência heterozigótica da FH é de 1/500 na maioria das populações, significando que em Portugal devem existir cerca de 20000 indivíduos com esta patologia.^{37,38,51} Os indivíduos heterozigotos apresentam um valor de colesterol no plasma 2 a 3 vezes mais elevado do que o de indivíduos normolipidémicos.³⁷ Os xantomas nos tendões e a aterosclerose coronária desenvolvem-se a partir da terceira ou quarta década de vida destes indivíduos.³⁷

A forma homozigótica da FH apresenta uma prevalência de 1/1 milhão.³⁷ Os indivíduos homozigotos têm uma hipercolesterolemia severa, que pode ir dos 650 aos 1000 mg/dL.³⁷ Os xantomas cutâneos aparecem logo nos primeiros 4 anos de vida e a doença coronária inicia-se na infância, causando frequentemente a morte por enfarte cardíaco antes dos 20 anos de idade, se estes doentes não forem tratados adequadamente.³⁷

A principal causa de FH consiste em mutações no gene do receptor das LDL plasmáticas. Os heterozigotos têm um alelo normal e um alelo mutante no *locus* do LDLR, o que faz com que as suas células sejam capazes de se ligar e de internalizar cerca de metade das partículas de LDL, quando comparadas com células de indivíduos normais. Os homozigotos possuem uma mutação nos dois alelos no *locus* do LDLR e, então, as suas células mostram uma incapacidade total ou quase total de ligação ou internalização de LDL. Alguns indivíduos herdam dois alelos mutantes diferentes, sendo denominados de heterozigotos compostos.³⁷

A elevada incidência de DCV prematura (<55 anos para os homens e <65 anos para as mulheres) em doentes com FH e a redução da esperança de vida de várias famílias em que esta doença se encontra presente são dois aspectos que contribuíram para que a FH fosse considerada um problema mundial de saúde pública.⁵² Cerca de 85% dos homens e de 50% das mulheres irão sofrer um evento coronário antes de atingirem os 65 anos, se não forem diagnosticados e sujeitos a um tratamento adequado.⁵²

1.3.1.1.1. Critérios de diagnóstico clínico

Ao longo dos anos têm sido estabelecidos vários conjuntos de critérios para o diagnóstico clínico de FH mas ainda não existe um critério clínico preditivo de FH nem um consenso internacional no que diz respeito ao desenvolvimento de um único conjunto de critérios clínicos.^{53,54}

Os dois conjuntos de critérios de diagnóstico clínico de FH mais aplicados a nível mundial são o proposto pelo grupo inglês SBRG (*Simon Broome Register Group*)^{55,56} e o aplicado pelo programa holandês *Dutch MEDPED*⁵⁷. As especificações de cada um destes critérios de diagnóstico encontram-se, respectivamente, nas tabelas 1.2 e 1.3.

Tabela 1.2. Critérios desenvolvidos pelo *Simon Broome Register Group* para o diagnóstico de hipercolesterolemia familiar heterozigótica^{55,56,58} (Adaptado)

	Critério
Determinações bioquímicas	A. CT>290 mg/dL (>7.5 mmol/L) ou c-LDL>190 mg/dL (>4.9 mmol/L) num adulto ou CT>260 mg/dL (>4.0 mmol/L) ou c-LDL>155 mg/dL (>4.0 mmol/L) numa criança menor de 16 anos
Sinais Físicos	B. Xantomas tendinosos no caso-índice ou em algum familiar em primeiro* ou segundo grau**
História familiar	C. Enfarte agudo do miocárdio em familiar em primeiro* ou segundo grau** com menos de 50 anos ou em familiar em primeiro grau* com menos de 60 anos
	D. CT>290 mg/dL (>7.5 mmol/L) num familiar em primeiro* ou segundo grau**
Estudo molecular	E. Evidência genética de mutação no gene <i>LDLR</i> ou no gene <i>APOB</i>
Diagnóstico: HeFH confirmada (<i>Definite HeFH</i>) → A+B ou E HeFH provável (<i>Probable HeFH</i>) → A+C ou A+D	

*, familiar em primeiro grau: pais, filhos, irmãos; **, familiar em segundo grau: avós, netos, sobrinhos, sobrinhas, tios, tias, meios-irmãos. Abreviaturas: CT, colesterol total; c-LDL, colesterol associado às lipoproteínas de baixa densidade; HeFH, hipercolesterolemia familiar heterozigótica.

Tabela 1.3. Critérios desenvolvidos pelo programa holandês *Dutch* MEDPED para o diagnóstico de hipercolesterolemia familiar heterozigótica^{57,58} (Adaptado)

Critério	Score	
História familiar	Doença coronária ou vascular prematura ^(a) num familiar em primeiro grau ^(b) do indivíduo em estudo	1
	c-LDL > percentil 95 num familiar em primeiro grau ^(b) , maior de 18 anos, do indivíduo em estudo	1
	c-LDL > percentil 95 num familiar em primeiro grau ^(b) , menor de 18 anos, do indivíduo em estudo	2
	Xantomas tendinosos ou <i>arcus cornealis</i> num familiar em primeiro grau ^(b) do indivíduo em estudo	2
História clínica do indivíduo	Doença arterial coronária prematura ^(a) no indivíduo em estudo	2
	Doença vascular cerebral ou periférica prematura ^(a) no indivíduo em estudo	1
	Xantomas tendinosos no indivíduo em estudo	6
	<i>Arcus cornealis</i> num indivíduo em estudo menor de 45 anos	4
Determinações bioquímicas	c-LDL \geq 330 mg/dL (>8,5 mmol/L) no indivíduo em estudo	8
	c-LDL no intervalo 250-329 mg/dL (6,5-8,4 mmol/L) no indivíduo em estudo	5
	c-LDL no intervalo 190-249 mg/dL (5,0-6,4 mmol/L) no indivíduo em estudo	3
	c-LDL no intervalo 155-189 mg/dL (4,0-4,9 mmol/L) no indivíduo em estudo	1
Estudo molecular	Mutação no gene <i>LDLR</i> ou noutro gene associado à HeFH	8
Diagnóstico:		
HeFH confirmada (<i>Definite HeFH</i>)		>8
HeFH provável (<i>Probable HeFH</i>)		6-8
HeFH possível (<i>Possible HeFH</i>)		3-5

^(a) Doença prematura refere-se à ocorrência em homens menores de 55 anos e em mulheres menores de 60 anos; ^(b) Familiar em primeiro grau: pais, filhos, irmãos; Abreviaturas: c-LDL, colesterol associado às lipoproteínas de baixa densidade; HeFH, hipercolesterolemia familiar heterozigótica.

Os critérios de diagnóstico de FH requerem geralmente uma combinação de especificações associadas à história clínica do indivíduo, a sinais físicos, a marcadores bioquímicos e à história familiar.⁵⁸ O diagnóstico clínico baseia-se, na maior parte das vezes, na presença de níveis elevados de colesterol total ou de c-LDL, na história familiar de hipercolesterolemia, especialmente em crianças, na deposição de colesterol em tecidos extravasculares, sob a forma de xantomas nos tendões ou de *arcus cornealis* (acumulação de gordura na córnea), e na história pessoal e familiar de DCV prematura.⁵² Os níveis de TG de doentes com FH permanecem dentro dos valores recomendados, embora alguns destes doentes tenham um aumento de TG, explicado por interacções entre vários genes ou por factores ambientais (álcool, obesidade, diabetes).⁵²

Os dois conjuntos de critérios presentes nas tabelas 1.2 e 1.3 utilizam várias especificações clínicas, bioquímicas e moleculares, e os seus valores preditivo positivo

e negativo dependem em parte da forma de selecção do recrutamento dos indivíduos a rastrear.^{58,59} Os critérios desenvolvidos pelo SBRG (tabela 1.2) apresentam dois diagnósticos de HeFH, provável e confirmada. Segundo os critérios do SBRG, o diagnóstico de HeFH confirmada requer a identificação de uma mutação patogénica ou a presença de xantomias. Embora os xantomias sejam característicos de HeFH, existem vários doentes com FH que não os apresentam.⁵⁸ Em Portugal, a presença de xantomias em doentes com FH é rara.⁶⁰ Os critérios propostos pelo DMP (tabela 1.3) atribuem um *score* a cada uma das especificações consideradas, sendo o diagnóstico final classificado como FH heterozigótica (HeFH) possível, provável ou confirmada e dado em função do *score* total do indivíduo.⁵⁸ Um estudo realizado por Damgaard *et al.*, em 2005, revelou que ambos os conjuntos de critérios podem ser úteis em termos de diagnóstico clínico.⁶¹

A vantagem da aplicação de critérios para o diagnóstico de FH é o baixo custo associado, uma vez que depende unicamente da aquisição de informações clínicas, de um exame físico e de determinações lipídicas. No entanto, o diagnóstico clínico não consegue fazer a distinção entre indivíduos com a forma mais comum de FH, resultante de alterações no gene que codifica para o LDLR, e indivíduos com alterações noutros genes ou com hipercolesterolemia de origem não genética.⁵⁴ Para além disso, este tipo de diagnóstico pode rejeitar uma proporção considerável de doentes com FH, principalmente os que têm um fenótipo menos severo e os que pertencem à população pediátrica, em que o fenótipo pode ser menos acentuado.^{52,53}

1.3.1.1.2. Estudo molecular

Nos anos 80, Goldstein e Brown descobriram a base molecular da FH, tendo em 1985 ganho o prémio Nobel da Medicina pelos seus estudos acerca da regulação do metabolismo do colesterol, onde descobriram que a causa da FH era a ausência total ou parcial de receptores das LDL funcionais.⁶² Desde esta data, a FH tem sido alvo de vários estudos, tendo sido associada à presença de mutações no gene *LDLR* e, também, nos genes *APOB* e, mais recentemente, *PCSK9*.⁵⁹

A principal causa de FH é a presença de alterações no gene *LDLR* (Gene ID NCBI: 3949; NM_000527.4) que se encontra no braço curto do cromossoma 19 (localização citogenética: 19p13.2), tem cerca de 45 kb e compreende 18 exões e 17 intrões.³⁷ Este gene codifica para uma proteína, o receptor das LDL, que se pode associar ao ligando apoB, presente nas partículas de LDL.^{37,38} Este complexo receptor-LDL consegue ser internalizado pelo hepatócito, ocorrendo a sua dissociação no endossoma.^{37,38} O receptor fica novamente apto para se ligar a uma nova partícula de LDL.³⁸

Os 18 exões do gene *LDLR* codificam para uma proteína de 860 aminoácidos (839 aminoácidos na forma madura, já sem o péptido sinal), constituída por cinco

domínios estruturais (figura 1.8).^{37,38} O exão 1 do gene codifica os 21 aminoácidos que constituem o péptido sinal, cuja função é direccionar os receptores sintetizados nos ribossomas para a membrana do retículo endoplasmático, local onde a proteína se torna madura.³⁷ Os exões 2 a 6 codificam a sequência de aminoácidos que constituem o domínio de ligação do receptor ao seu ligando.³⁷ Os exões 7 a 14 codificam para o domínio semelhante à molécula precursora do factor de crescimento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*), actuando ao nível da reciclagem do receptor e do posicionamento do domínio de ligação relativamente ao ligando.³⁷ O exão 15 codifica para o domínio de cadeias de hidratos de carbono de glicosilação tipo O (OLS, *O-linked sugar chains domain*).³⁷ O exão 16 e a região 5' do exão 17 codificam para o domínio transmembranar da proteína, responsável pelo posicionamento do receptor na membrana celular.³⁷ O restante exão 17 e a região 5' do exão 18 codificam para o domínio citoplasmático da proteína, importante ao nível da internalização do receptor nas vesículas de claterina.³⁷

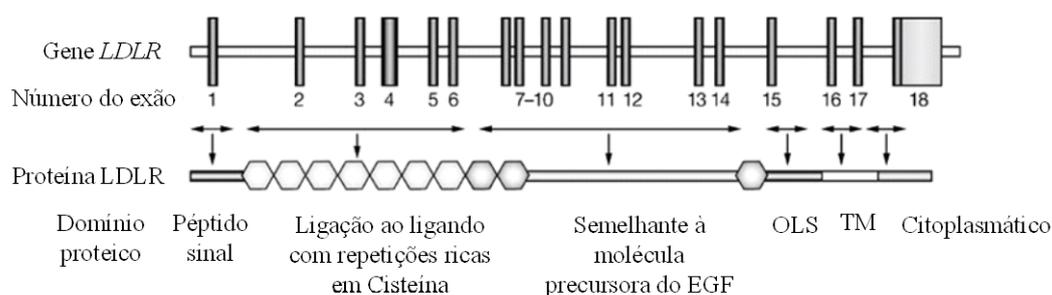


Figura 1.8. Esquema representativo do gene *LDLR*. O gene *LDLR* apresenta 18 exões que codificam para o receptor das LDL. Cada exão ou grupo de exões codifica para os diferentes domínios proteicos, sendo que a proteína madura contém 5 domínios estruturais: o exão 1 codifica um péptido sinal de 21 aminoácidos, que é clivado da proteína madura, durante a sua passagem pelo retículo endoplasmático; os exões 2 a 6 codificam para o domínio de ligação do receptor ao ligando; os exões 7 a 14 codificam para o domínio semelhante à molécula precursora do EGF; o exão 15 codifica para o domínio de cadeias de hidratos de carbono de glicosilação tipo O; o exão 16 e a região 5' do exão 17 codificam para o domínio transmembranar; parte do exão 17 e a região 5' do exão 18 codificam para o domínio citoplasmático que contém a região peptídica necessária à internalização do receptor. Abreviaturas: EGF, factor de crescimento epidérmico; LDLR, receptor das lipoproteínas de baixa densidade; OLS, cadeias de hidratos de carbono de glicosilação tipo O (*O-linked sugar chains domain*); TM, transmembranar.³⁸ (Adaptado)

Encontram-se descritas cerca de 1500 mutações no gene *LDLR*.^{63,64} Em indivíduos com FH, foram identificados vários tipos diferentes de mutações neste gene, incluindo grandes rearranjos, codões stop prematuros, substituições de um único aminoácido, mutações na região promotora que afectam a transcrição do gene e mutações que afectam o processo de *splicing* do RNA pré mensageiro (pré-mRNA).^{38,65,66} As diversas mutações estendem-se a todos os 18 exões do gene e ao promotor.^{38,65-67} As alterações no gene *LDLR* podem resultar na síntese de um receptor

LDLR não funcional ou com a funcionalidade alterada, o que se traduz num aumento dos valores de colesterol.^{38,68}

A deficiência familiar em apoB (FDB) é outra forma de FH, estando associada a alterações no gene *APOB* (Gene ID NCBI: 338; NM_000384.2), que se encontra no braço curto do cromossoma 2, na localização 2p24-p23.^{68,69} Este gene, constituído por 29 exões (figura 1.9), codifica para as duas isoformas da apoB, a apoB-48 e a apoB-100.^{13,68}



Figura 1.9. Esquema representativo do gene *APOB*. O gene *APOB* tem 29 exões e codifica para a apolipoproteína B. Os exões 26 e 29 constituem a parte do gene que codifica para a zona de ligação ao receptor das lipoproteínas de baixa densidade.⁷⁰ (Adaptado)

A FDB apresenta uma prevalência entre 1/200 e 1/1250, dependendo da população em estudo.⁵⁹ Como a apoB-100 é o único ligando da LDL, sendo responsável pela ligação desta lipoproteína ao seu receptor, a existência de mutações no gene *APOB*, na região de ligação ao receptor das LDL, pode traduzir-se numa apolipoproteína à qual este receptor não se consegue ligar. Esta região proteica é codificada pelos exões 26 e 29, sendo neles que reside o estudo molecular do *APOB* em indivíduos com suspeita clínica de FH. Assim, esta outra forma de FH leva, também, a uma acumulação de colesterol no plasma, estando associada às consequências clínicas já referidas.^{59,68}

Em 1989, Soria *et al.* identificaram pela primeira vez uma mutação no gene *APOB* em indivíduos sem qualquer mutação no gene *LDLR*.⁷¹ A mutação resultou na alteração do resíduo de Arg3527 por uma Glutamina. Borén *et al.*, revelaram num estudo publicado em 2001 que o resíduo Trp4396 interacciona com os resíduos de Arginina (Arg3507, Arg3527 e Arg3558) na estrutura tridimensional da apoB que envolve a LDL. Esta interacção é essencial para a ligação LDL-receptor.⁷² A mutação identificada por Soria *et al.* é a causa mais comum de FDB, sendo que, na Europa, 2-5% dos doentes com FH são heterozigotos para este alelo patogénico.^{38,59}

Em 2004 foi descoberto por Abifadel *et al.* um terceiro gene associado ao fenótipo de FH, o *PCSK9* (Gene ID NCBI: 255738; NM_174936.3).⁷³ Este gene encontra-se no braço curto do cromossoma 1 (localização citogenética: 1p32.3) e contém 12 exões.⁷⁴ Este gene codifica para uma proteína que pertence a uma subfamília das pró-proteína convertases, a pró-proteína convertase subtilisina/quexina tipo 9 (*PCSK9*, *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) (figura 1.10).

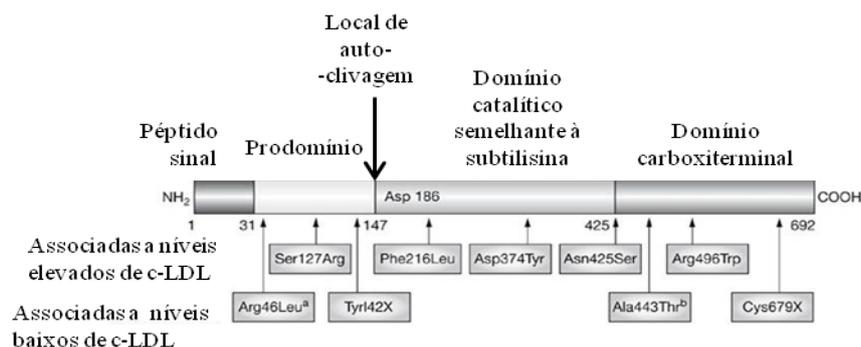


Figura 1.10. Esquema representativo dos domínios da proteína PCSK9. O gene *PCSK9* codifica para a proteína com o mesmo nome. Algumas alterações no gene *PCSK9* estão associadas a níveis elevados de c-LDL enquanto outras encontram-se associadas a níveis baixos. Abreviaturas: c-LDL, colesterol associado às lipoproteínas de baixa densidade; PCSK9, pró-proteína convertase subtilisina/quexina tipo 9.³⁸ (Adaptado)

O mecanismo pelo qual as mutações no gene *PCSK9* causam hipercolesterolemia ainda não se encontra totalmente esclarecido.³⁸ Este gene é regulado por esteróis, o que indica o seu envolvimento no metabolismo do colesterol.³⁸

Estudos realizados revelaram que a expressão do gene *PCSK9*, nas formas normal e mutante, é capaz de reduzir os níveis do receptor de LDL, em hepatócitos de ratinho.^{38,75} Esta evidência levou à descoberta de que duas mutações de perda de função deste gene, que levam à formação de uma proteína truncada, estão associadas a níveis plasmáticos de LDL mais baixos do que os verificados em indivíduos normolipidémicos e a uma protecção contra a doença coronária prematura.^{38,76} Então, o gene *PCSK9* na sua forma normal aumenta a degradação do receptor das LDL e quando possui mutações de perda de função (*loss-of-function mutations*) existe uma diminuição desta degradação.³⁸ Por outro lado, existem mutações associadas a um ganho de função (*gain-of-function mutations*), em que se verifica um aumento dos níveis de LDL.^{38,77}

Os estudos relativos ao *PCSK9*, um gene altamente polimórfico, encontram-se focados em compreender o mecanismo que se encontra na base das mutações de ganho de função e em pesquisar variantes que influenciem os níveis de c-LDL.³⁸ A inibição ou repressão da expressão do *PCSK9* apresenta-se como um importante alvo da indústria farmacêutica.^{38,77}

1.3.1.2. Dislipidemia familiar combinada

A dislipidemia familiar combinada (FCHL) é uma hiperlipidemia que apresenta uma prevalência elevada de 1/200 e que representa uma importante causa de CAD prematura.^{78,79}

A FCHL é caracterizada por níveis elevados de c-LDL e/ou de TG.⁸ Em 1983, Brunzell *et al.* reportaram que o fenótipo lipídico desta doença é variável, verificando

que existe uma variação do fenótipo ao longo da vida do indivíduo.⁸⁰ Esta variação deve-se ao facto desta dislipidemia ser considerada uma doença complexa, cujo fenótipo é determinado por interacções entre vários genes e factores ambientais.^{8,80}

A FCHL é uma doença de carácter genético mas numa família podem existir indivíduos com fenótipos diferentes.^{8,81} Para além disso, o fenótipo desta patologia apresenta semelhanças com o de outras doenças, como a diabetes tipo 2.^{8,81}

Embora o diagnóstico clínico seja muito complicado, a combinação de informação acerca dos valores de CT, TG e apoB e de história familiar que indique um familiar directo com fenótipo hiperlipidémico diferente do fenótipo do indivíduo em estudo pode ser utilizada para identificar indivíduos com uma elevada probabilidade de possuírem FCHL.⁸ Determinações de valores de apoB > 120 mg/dL e de TG > 133 mg/dL e presença de DCV prematura são especificações usadas para identificar estes doentes.^{8,81,82}

A investigação sobre os marcadores genéticos que definem a FCHL é importante, na medida em que pode levar a descobertas interessantes que facilitem o diagnóstico desta dislipidemia.⁸

1.3.1.2.1. Estudo molecular

A natureza poligénica da doença foi demonstrada em 1973 por Goldstein *et al.*⁷⁸ Depois de uma extensa procura de genes associados a esta patologia, em 1980 foi publicado um estudo de Wojciechowski *et al.* que referia a associação entre a FCHL e o *cluster APOA1/C3/A4*, presente no cromossoma 11.⁸³ Como a extensão da região que engloba estes 3 genes é relativamente pequena, a rápida análise da sequência levaria ao conhecimento da variante que explicaria a associação desta doença ao *cluster* do cromossoma 11.⁷⁹ No entanto, ao longo destes anos não foi possível descobrir uma alteração funcional que explique esta associação.⁷⁹ Em 2004, foi descrito que o gene *APOA5* (Gene ID NCBI: 116519344; NM_052968.4) também faz parte deste *cluster*, tendo sido indicado como um gene que pode incluir variantes que contribuem para o fenótipo de FCHL.⁸⁴

O *cluster A1/C3/A4/A5* encontra-se na região cromossómica 11q23 e inclui os genes *APOA1* (Gene ID NCBI: 335; NM_000039.1), *APOC3* (Gene ID NCBI: 345; NM_000040.1), *APOA4* (Gene ID NCBI: 337; NM_000482.3) e *APOA5*.⁸⁵ Este *cluster* representa uma das regiões mais bem caracterizadas no genoma humano, estando amplamente estudada a sua associação dinâmica com os lípidos e lipoproteínas do plasma. Todos estes genes codificam para as apolipoproteínas correspondentes.⁸⁵

A lista de marcadores moleculares para o fenótipo da doença tem crescido nos últimos anos, havendo evidências de associação entre mais de 24 regiões, presentes em mais de 13 cromossomas.⁷⁹ Tal como no cromossoma 11, também na maior parte destas

regiões não foram identificadas mutações ou variantes candidatas que possam explicar as associações entre os genes.⁷⁹ Uma importante exceção poderá ser o *locus* associado à FCHL no cromossoma 1, onde foram identificadas variantes no gene *TNFRSF1B* (Gene ID NCBI: 7133; NM_001066.2), que codifica para uma proteína pertencente à superfamília do receptor do factor de necrose tumoral (*TNFRSF1B*, *tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B*) e no gene *USF1* (Gene ID NCBI: 7391; NM_007122.3), que codifica para o factor de transcrição 1 a montante (*USF1*, *upstream transcription factor 1*).^{86,87}

Alguns estudos demonstraram que alguns indivíduos com FCHL apresentavam valores mais baixos de actividade da enzima LPL, pelo que o estudo molecular dos genes *LPL* e *APOC2* (Gene ID NCBI: 344; NM_000483.4) deve fazer parte da pesquisa de alterações associadas a esta dislipidemia.⁸⁸ Tanto a actividade da LPL como os níveis de TG, presentes em doentes com FCHL podem estar associados ao *cluster* já referido.⁸⁸⁻⁹⁰

O gene *LPL* encontra-se no braço curto do cromossoma 8, na localização 8p22, tem cerca de 30 kb e compreende 10 exões que codificam para a enzima lipoproteína lipase.^{68,91} As quilomicras são normalmente eliminadas do plasma por acção da LPL e da apoC-II, que funciona como seu cofactor.⁴² Uma perturbação profunda no catabolismo de quilomicras e VLDL resulta em níveis de TG superiores a cerca de 1330 mg/dL.⁸ Isto ocorre em indivíduos que são homozigotos ou heterozigotos compostos para uma mutação no gene *LPL*.⁸ As alterações no *LPL* podem conduzir a uma perda quase total ou parcial da funcionalidade da enzima LPL.^{68,92} Assim, um indivíduo heterozigoto para alterações no *LPL* apresenta actividade da LPL reduzida em 50% enquanto um indivíduo homozigoto apresenta uma actividade quase nula da enzima, possuindo a denominada deficiência familiar em LPL (FLLD).^{68,92}

Como a actividade enzimática da LPL é activada pela apoC-II então o gene *APOC2* pode encontrar-se, também associado ao fenótipo de FCHL.^{8,42} Este gene, que se encontra no braço longo do cromossoma 19 (localização citogenética: 19q13.2), apresenta 4 exões e codifica para a proteína apoC-II.^{68,93}

Novos genes que têm sido indicados como estando associados à hipertrigliceridemia podem estar relacionados com a FCHL. Um estudo permitiu a identificação de 41 variantes raras (*missense* e *nonsense* heterozigóticas) nos genes *GPIHBP1* (Gene ID NCBI: 338328; NM_178172.3), *LMF1* (Gene ID NCBI: 64788; NM_022773.2), *CREB3L3* (Gene ID NCBI: 84699; NM_032607.1), *APOC2* e *ZHX3* (Gene ID NCBI: 23051; NM_015035.3) de 413 indivíduos com hipertrigliceridemia.⁹⁴ Este estudo suporta a existência de contribuições de variantes raras nos genes *LMF1*, *CREB3L3* e *APOC2* para a patofisiologia da hipertrigliceridemia.⁹⁴ Os genes *APOC2* e *LMF1* são genes já associados ao metabolismo de TG.⁹⁴⁻⁹⁶ O gene *CREB3L3* foi

recentemente associado ao metabolismo dos TG, funcionando como um factor de transcrição que regula a expressão de cofactores necessários ao metabolismo das lipoproteínas ricas em TG, como a apoC-II, a apoA-V e a apoA-IV.⁹⁴⁻⁹⁷ As variantes no *GPIHBP1* e no *ZHX3* contribuem potencialmente para a susceptibilidade para a hipertrigliceridemia, uma vez que estes genes estão envolvidos na patofisiologia lipoproteica.^{94,97,98}

1.3.1.3. Terapêutica para as dislipidemias familiares

Face a uma hipercolesterolemia ou uma hipertrigliceridemia, deve tentar seguir-se um estilo de vida saudável, onde se inclua a adopção de uma dieta saudável, variada e equilibrada e a prática regular de exercício físico.⁸

Os fármacos que têm sido desenvolvidos como terapêutica associada a dislipidemias familiares actuam ao nível do metabolismo lipídico.^{8,99}

As estatinas são fármacos de primeira linha, indicados para a diminuição dos níveis de colesterol no plasma, sendo amplamente utilizados. O seu mecanismo de acção centra-se na inibição da enzima HMG-CoA redutase que consequentemente leva à inibição da síntese de colesterol no fígado. Como resultado, existe um aumento da expressão do gene *LDLR*, o que se traduz num maior número de receptores capazes de eliminar o c-LDL da circulação.^{20,100} Existem diferentes tipos de estatinas, como por exemplo a atorvastatina, a sinvastatina, a rosuvastatina, a pravastatina, a fluvastatina e a lovastatina. As estatinas diferem na sua absorção, biodisponibilidade, excreção, solubilidade e proteína plasmática a que se ligam.⁸

O ezetimiba é outro fármaco utilizado no tratamento de doentes com dislipidemia familiar. Este fármaco inibe a absorção do colesterol, actuando ao nível dos enterócitos das microvilosidades do intestino, reduzindo os níveis de colesterol no plasma. A redução do fluxo de colesterol do intestino para o fígado conduz a um aumento de expressão dos receptores LDLR para compensar a diminuição de colesterol intracelular. No entanto, existe, também, um efeito compensatório com a produção de colesterol no fígado, efeito que pode ser reduzido através de uma terapêutica de combinação de ezetimiba com estatina, que irá inibir a síntese endógena de colesterol.^{8,20,101}

As estatinas e/ou o ezetimiba não devem ser administradas antes de a criança completar 8 anos, sendo que em idade pediátrica há a hipótese de terapêutica com resinas permutadoras de aniões. As resinas apresentam um efeito sequestrador de ácidos biliares que impede que estes voltem ao fígado, aumentando a sua excreção através das fezes. Este tratamento é também utilizado em indivíduos intolerantes a outros fármacos.^{8,13}

A LDL aferese consiste na remoção de c-LDL do plasma, com a aplicação de um método de circulação extracorporeal, semelhante a uma diálise. Esta terapêutica pode ser aplicada a indivíduos que sofrem de hipercolesterolemia severa, como por exemplo os homozigotos para a FH, ou a doentes intolerantes às estatinas.^{102,103}

No que diz respeito a dislipidemias familiares que conduzem a hipertrigliceridemia, os fibratos devem ser uma opção. O seu mecanismo de acção estimula a oxidação dos ácidos gordos, reduzindo os níveis de TG e ácidos gordos no plasma.^{42,104}

Outro fármaco utilizado nestes doentes é o ácido nicotínico ou niacina que reduz os níveis de CT, TG, c-LDL e também as partículas de sdLDL. O ácido nicotínico ou Vitamina B3 é uma das principais vitaminas do complexo B, participando na síntese de algumas hormonas esteróides. A sua acção de modelação de lípidos é vasta, aumentando o c-HDL em cerca de 25%, dependendo da dose prescrita e os TG em 20-40% numa dose de 2g/dia. Esta dose diária tem um efeito ao nível da Lp(a), conseguindo diminuir os seus valores em mais de 30%. O ácido nicotínico actua no fígado e nos tecidos adiposos. A sua acção no fígado resulta na redução da secreção de partículas de VLDL pela parte deste órgão, o que se reflecte em reduções nas partículas de IDL e LDL. O aumento dos níveis de c-HDL ocorre por estimulação da produção de apoA-I no fígado. Nos adipócitos, a niacina actua na lipólise e na mobilização de ácidos gordos. O ácido nicotínico e os fibratos podem ser combinados com estatinas para uma terapia mais eficaz.^{5,8,60,105,106}

A maioria dos doentes com dislipidemia familiar não recebe o tratamento adequado, sendo necessário implementar estratégias de consciencialização em larga escala, que alertem os doentes e as autoridades de Saúde para a necessidade de prevenção cardiovascular.^{54,60} As medidas terapêuticas são importantes para melhorar a qualidade de vida dos indivíduos com dislipidemia familiar e representam um meio de prevenção contra a ocorrência de DCV, contribuindo para o aumento da esperança de vida das populações. Se o aconselhamento e terapêutica adequados forem aplicados desde cedo, o risco cardiovascular dos doentes jovens com FH pode diminuir e aproximar-se do risco cardiovascular global da população.^{54,60}

1.4 Objectivos

O estudo foi realizado no Grupo de Investigação Cardiovascular do Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

Os objectivos do trabalho desenvolvido foram os seguintes:

1) caracterização bioquímica e molecular de indivíduos portugueses, referenciados ao Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar (EPHF) por suspeita clínica de FH;

2) avaliação de diferentes critérios de diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar por comparação entre a aplicação de critérios de diagnóstico clínico e o resultado do estudo molecular;

Este trabalho pretendeu também contribuir para um melhor conhecimento acerca de patologias lipídicas de carácter genético, nomeadamente da hipercolesterolemia familiar e da dislipidemia familiar combinada.

Capítulo 2. Materiais e métodos

O trabalho desenvolvido foi desenvolvido ao longo de 12 meses, tendo sido realizado no Grupo de Investigação Cardiovascular do Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), com a aprovação da comissão de ética do INSA.

2.1. Amostra de estudo

O material de estudo consistiu numa amostra populacional de 40 indivíduos, constituída por adultos e crianças de ambos os sexos. Estes indivíduos foram referenciados por clínicos, de várias regiões do país, de diferentes especialidades (cardiologia, medicina interna, pediatria, genética médica, endocrinologia), que colaboram no Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar (EPHF). O EPHF foi iniciado em 1999, no INSA, e realiza a caracterização bioquímica e molecular de indivíduos com diagnóstico clínico de Hipercolesterolemia Familiar (FH). A inclusão de um indivíduo no EPHF requer a verificação dos critérios de diagnóstico de FH, sendo que são seguidas as especificações desenvolvidas pelo *Simon Broome Register Group* (SBRG), presentes na tabela 1.2.

Os médicos colaboradores do EPHF referenciam indivíduos por suspeita clínica de FH. Um indivíduo que verifique os critérios de diagnóstico clínico, ao ser incluído no EPHF é denominado de caso-índice (membro da família que apresenta o fenótipo clínico mais severo). Sempre que possível, o médico deve referenciar, também, familiares do caso-índice para posterior estudo familiar, pelo método de *cascade screening* e para verificação da co-segregação de alterações sobre as quais não existe informação quanto à patogenicidade.¹⁰⁷

Para cada um dos 40 casos-índice estudados foram recolhidos, aproximadamente, 7,5 mL de sangue num tubo de soro com gel separador (aproximadamente 5 mL se o caso-índice for uma criança), utilizado em posteriores determinações bioquímicas e, aproximadamente, 8 mL (aproximadamente 5 mL se o caso-índice for uma criança) de sangue em tubo de EDTA, utilizado na extração de DNA. Cada amostra foi identificada com o número do participante e todas as informações mantidas numa base de dados confidencial. Nos Anexos A e B encontram-se os documentos utilizados para a recolha de informação clínica de cada participante.

O EPHF mantém, ainda, uma base confidencial de indivíduos que formam uma amostra representativa de uma população “controlo”. Este painel de normolipidémicos é utilizado para a avaliação da frequência de uma alteração genética não descrita encontrada no decorrer do estudo.¹⁰⁷

2.2. Caracterização bioquímica

Neste trabalho, foram utilizadas diferentes abordagens para a caracterização bioquímica dos participantes.

A partir da amostra de soro de cada caso-índice foi possível determinar certos parâmetros lipídicos. A determinação dos valores de CT (colesterol total), c-LDL (colesterol associado às lipoproteínas de baixa densidade), c-HDL (colesterol associado às lipoproteínas de elevada densidade), TG (triglicéridos), apolipoproteínas apoA-I e apoB e Lp(a) (lipoproteína (a)) foi realizada no laboratório de Química Clínica da Unidade Laboratorial Integrada (ULI) do INSA, através de métodos enzimáticos e colorimétricos, efectuados num auto analisador Cobas Integra 400 Plus (Roche). A quantificação de apoE, apoA-II, apoC-II, apoC-III e do colesterol associado às sdLDL (*small dense low density lipoprotein*) foi realizada no equipamento Daytona (Randox), existente no laboratório de investigação.

2.2.1. Quantificação de lípidos e apolipoproteínas

O equipamento denominado Daytona (Randox) é capaz de fornecer informações sobre o perfil bioquímico de um indivíduo. No que se refere aos 40 casos-índice estudados, este aparelho foi utilizado para se completar o perfil bioquímico dos indivíduos com os valores de apoE, apoA-II, apoC-II, apoC-III e colesterol associado às sdLDL.

A técnica seguiu o protocolo recomendado pelo fabricante (Randox), utilizando-se reagentes específicos para cada parâmetro que se pretendia determinar.

A quantificação das apolipoproteínas é realizada através de imunoenaios turbidimétricos, que permitem a quantificação *in vitro* de lípidos, lipoproteínas e apolipoproteínas, presentes no soro. O método baseia-se na reacção entre a amostra de soro e um anti-soro específico para cada proteína, donde resulta um complexo insolúvel que pode ser medido por turbidimetria a 340 nm. Os resultados são obtidos sob a forma de um relatório onde constam as concentrações (em mg/dL) dos parâmetros do indivíduo em estudo.

A quantificação de colesterol associado às sdLDL seguiu as recomendações do *kit s LDL-EX "SEIKEN"*, em que a adição do reagente 1 decompõe todas as lipoproteínas, excepto as sdLDL, promovendo a degradação enzimática do colesterol. O reagente 2 liberta o colesterol das sdLDL, que entra em reacções enzimáticas, formando-se um produto vermelho-arroxeadado. O aparelho mede, depois, a absorvância a 600 nm deste produto.

O procedimento aconselha o uso de calibradores e de controlos de vários níveis, que conferem precisão e reprodutibilidade ao método.

No Anexo C encontram-se as informações sobre os vários reagentes utilizados e os intervalos de referência para os quais um indivíduo é considerado normolipidêmico.

2.3. Aplicação de critérios para o diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar

Cada um dos 40 casos-índice foi avaliado segundo os critérios desenvolvidos pelo grupo inglês SBRG (tabela 1.2) e segundo os critérios propostos pelo programa holandês *Dutch* MEDPED (tabela 1.3).

A avaliação estendeu-se aos 609 casos-índice já estudados no EPHF, de modo a abranger uma amostra mais representativa.

2.4. Caracterização molecular

A caracterização molecular dos 40 casos-índice iniciou-se pela pesquisa de alterações nos genes associados à FH. O estudo molecular de um caso-índice incluído no EPHF envolve três fases. Na primeira fase pesquisam-se alterações nos 18 exões do *LDLR*, através da combinação das técnicas de cromatografia líquida de elevada performance desnaturante (dHPLC, *denaturing high performance liquid chromatography*) e de sequenciação automática. Esta fase engloba, também, a sequenciação automática de fragmentos do exão 26 e do exão 29 do *APOB*, a região do gene associada à ligação da LDL ao seu receptor. Se não forem identificadas alterações nesta fase, é necessário prosseguir para a segunda fase do estudo molecular, em que se aplica a técnica de *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) para a pesquisa de grandes rearranjos no gene *LDLR*. Quando existe um fenótipo mais severo de FH, realiza-se a técnica de MLPA, mesmo que se tenham encontrado, na primeira fase, alterações nos genes *LDLR* e *APOB*. Se não se encontrarem alterações nas duas primeiras fases, realiza-se a terceira fase da caracterização molecular em que se estuda o terceiro gene associado à FH, o *PCSK9*.

Se nas 3 fases do estudo não se detectar nenhuma alteração que possa ser causadora de FH, então o participante pode passar para o Estudo de Dislipidemias Familiares, onde se estuda a dislipidemia familiar combinada (FCHL). De entre os 40 casos-índice estudados, 5 foram incluídos no Estudo de Dislipidemias Familiares, por apresentarem um fenótipo caracterizado por hipercolesterolemia e/ou hipertrigliceridemia. Então, nestes 5 casos-índice, a caracterização molecular prosseguiu e efectuou-se o estudo dos genes *LPL* e *APOC2*, associados à ocorrência de FCHL, pesquisando-se, também, alterações nos genes *APOC3*, *APOA4* e *APOA5* (*cluster A1/C3/A4/A5*).

A cadeia de procedimentos comum a todos os casos-índice teve início na extração de DNA, prosseguiu para a amplificação, por PCR (reação em cadeia da polimerase), de fragmentos genómicos associados a cada dislipidemia estudada e terminou com a pesquisa de alterações nos genes de interesse.

Em todas as etapas do procedimento foi essencial o conhecimento das regras laboratoriais a cumprir e de cuidados a manter na manipulação de amostras biológicas humanas, de modo a evitar contaminações da amostra e a preservar a segurança do operador.

2.4.1. Extração de DNA

A extração de DNA genómico, realizada a partir de leucócitos de sangue periférico dos participantes, recolhido em tubos de 2,7 mL de EDTA, baseou-se no método descrito por Lahiri & Nurnberger, Jr, em 1991.¹⁰⁸

O primeiro passo deste procedimento consistiu na lise das membranas celulares. A lise dos eritrócitos foi conseguida com a adição de TKM X-100 (1 mL/mL de sangue) e IGEPAL (25 µL/mL sangue; IGEPAL, Sigma) à amostra de sangue total. A mistura foi agitada por inversão até solubilização total e foi centrifugada a 2200 rpm, durante 10 minutos (centrífuga 5810R, Eppendorf). Depois, procedeu-se à lavagem do sedimento, que continha os leucócitos, por adição de TKM1 (1 mL/mL de sangue). Realizou-se uma nova centrifugação, a 1600 rpm, durante 10 minutos (centrífuga 5810R, Eppendorf), e a lavagem foi repetida pelo menos mais uma vez. Ressuspendeu-se o sedimento com TKM2 (160 µL/mL de sangue) e SDS a 10% (10 µL/mL de sangue) para ocorrer a lise dos núcleos dos leucócitos, com libertação do DNA. Em seguida, o procedimento envolveu a desproteínização celular, através da desidratação (hidrólise química por incubação num banho a 55°C, Grant Instruments) e da precipitação das proteínas com NaCl 5 M saturado (60 µL/mL de sangue). Esta precipitação baseia-se no efeito *salting out* que pressupõe que a presença de elevadas concentrações de um sal diminui a solubilidade dos compostos na fase aquosa. Depois, através de uma centrifugação a 13200 rpm, durante 20 minutos, a 4°C (microcentrífuga 5415R, Eppendorf), as proteínas precipitaram, tendo sido recuperado o sobrenadante, que continha DNA genómico em fase aquosa. O último passo consistiu na precipitação do DNA, através da adição de etanol absoluto (2,3 mL/5 mL de sangue; etanol absoluto, Manuel Vieira & C^a, Lda.) ao sobrenadante, tendo a mistura sido agitada, lentamente, por inversão, até terem sido visíveis as fibrilhas de DNA. O DNA precipitado foi retirado com uma ansa, a qual foi, seguidamente, lavada em etanol a 70% (Manuel Vieira & C^a, Lda.), para que fossem removidos os sais. A ansa com o DNA foi deixada a secar à temperatura ambiente e por fim procedeu-se à rehidratação do DNA em 150 µL de tampão TE (TE 10 mM; pH 8,0; Ambion).

O DNA extraído foi colocado num agitador (Alfagene), a 400-450 rpm, à temperatura ambiente, durante cerca de 12 horas.

O DNA de cada um dos 40 casos-índice foi depois submetido a uma análise qualitativa e quantitativa. A análise qualitativa permitiu detectar a presença de DNA na amostra resultante da técnica de extração e avaliar se existia degradação da amostra extraída. Esta análise foi realizada através de uma electroforese em gel de agarose.

Na técnica de electroforese, as partículas são separadas em função da sua razão carga/massa. Assim, quando a amostra resultante da extração de DNA é aplicada num gel de agarose e sujeita a um campo eléctrico, migra em direcção ao eléctrodo positivo, devido à presença de grupos fosfato no DNA, dando-se a migração apenas de acordo com a respectiva massa. Para a realização da electroforese, preparou-se um gel de agarose a 1% (m/v), misturando agarose (Lonza) e tampão TBE 1× (solução preparada por diluição da solução stock de TBE 10×; Lonza). Após arrefecimento do gel, adicionou-se *SYBR[®] Safe* (Invitrogen), um corante que possibilita a posterior visualização das bandas. As amostras a aplicar no gel foram preparadas por adição de 5 µL de água estéril bidestilada, 5 µL de solução de deposição e 1 µL do DNA extraído. Para além das amostras, aplicou-se 3 µL do marcador de peso molecular (PUC, Fermentas). A migração electroforética foi efectuada em tampão TBE 1×, a uma voltagem de 90 V (tina de electroforese Biorad e fonte de voltagem Bio-Rad Power Pac 3000). Depois da electroforese, o gel foi visualizado através de um transiluminador (*Safe ImagerTM*, Invitrogen) e de um sistema de fotografia digital (Nikon).

A análise quantitativa de DNA foi feita com recurso ao equipamento NanoDrop (Thermo Scientific NanoDrop 1000 Spectrophotometer), sendo colocado 1 µL da amostra de DNA extraído no aparelho. Este aparelho mede a absorvância da amostra a 260 nm (comprimento de onda de absorvância máxima dos ácidos nucleicos), dando informação sobre a concentração de DNA da amostra (em ng/µL). O aparelho dá também informação sobre a existência de possível contaminação proteica (razão Abs 260/Abs 280) ou orgânica (razão Abs 260/230).

As informações relativas à preparação de soluções utilizadas nesta etapa do procedimento encontram-se no Anexo D.

2.4.2. Amplificação de DNA

A caracterização molecular de cada um dos 40 casos-índice prosseguiu com a amplificação do DNA presente nas regiões de interesse que constituem os principais genes associados às dislipidemias familiares estudadas, através da técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*).

A PCR é uma técnica de Biologia Molecular que permite a replicação rápida, *in vitro*, do DNA, de modo a que seja possível a amplificação em milhões de vezes de quantidades mínimas de material genético. O objectivo da PCR é a replicação da sequência de interesse (normalmente com tamanho entre 100 e 600 pares de bases). Para a sua aplicação é necessário conhecer as sequências que flanqueiam a região de DNA a estudar, de modo a desenhar os *primers* (oligonucleótidos de iniciação), sequências de DNA em cadeia simples, constituídas por cerca de 18-25 nucleótidos complementares a essas regiões flanqueadoras da cadeia alvo.

A tecnologia de PCR decorre de acordo com o princípio natural de replicação do DNA, sendo constituída por três passos (desnaturação, hibridação ou *annealing*, extensão) que se repetem ciclicamente durante um número específico de vezes (figura 2.1).

A amplificação do DNA de regiões de interesse de genes associados à FH (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9*) e à FCHL (*LPL*, *APOC2*, *APOC3*, *APOA4*, *APOA5*) exigiu a aplicação de uma reacção PCR optimizada para cada região e, também, para a enzima polimerase utilizada.

Os exões do *LDLR* (excepto o exão 3), os exões 26 e 29 do *APOB*, os exões 2, 3, 4+5, 6, 7 e 9 do *PCSK9*, os 10 exões do *LPL*, os exões 2, 3 e 4 do *APOC2*, os exões 2, 3 e 4 do *APOC3*, os 3 exões do *APOA4* e os 3 exões do *APOA5* foram amplificados através de reacções de PCR em que se utilizou a enzima *GoTaq*[®] *DNA Polymerase* (Promega), tendo-se preparado misturas de reacção PCR com: 0,2 mM de cada dNTP (a partir de soluções stock de dATP, dGTP, dCTP e dTTP a 100 mM; Bionline); tampão de reacção *Colorless Go Taq*[®] *Reaction Buffer* 1× (a partir da solução stock *Colorless Go Taq*[®] *Reaction Buffer* 5×; Promega); 0,5-3 mM de Mg²⁺ (a partir da solução stock MgCl₂ 25 mM; Promega); 20 pmol de cada *primer*, um *forward* e um *reverse*, (Invitrogen); 1,25 U de *GoTaq*[®] *DNA Polymerase* (a partir da solução stock *GoTaq*[®] *DNA Polymerase* 5 U/μL; Promega); 1 μL da amostra de DNA com concentração de cerca de 100 ng/μL (usou-se um controlo negativo da técnica de PCR que consistiu num tubo ao qual não se adicionou DNA); água estéril bidestilada para perfazer 25 μL de volume final.

O exão 3 do *LDLR* e os exões 1, 8, 10, 11 e 12 do *PCSK9* foram amplificados por reacções de PCR em que se utilizou a enzima *Platinum*[®] *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), tendo-se preparado misturas de reacção PCR com: 0,2 mM de cada dNTP (a partir de soluções stock de dATP, dGTP, dCTP e dTTP a 100 mM;

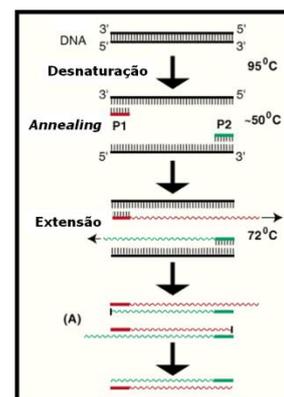


Figura 2.1. Etapas da reacção em cadeia da polimerase. A reacção divide-se em 3 passos (desnaturação, *annealing*, extensão) e permite a amplificação de DNA. P1 e P2 representam os *primers*.¹⁰⁹ (Adaptado)

Bioline); tampão de reacção PCR *Rxn Buffer* 10× (Invitrogen); 0,75-1,5 mM de Mg^{2+} (a partir da solução stock $MgCl_2$ 50 mM; Invitrogen); 20 pmol de cada *primer*, um *forward* e um *reverse*, (Invitrogen); 0,8 U de *Platinum[®] Taq DNA Polymerase* (a partir da solução stock *Platinum[®] Taq DNA Polymerase* 5 U/ μ L; Invitrogen); 1 μ L da amostra de DNA com concentração de cerca de 100 ng/ μ L (usou-se um controlo negativo da técnica de PCR que consistiu num tubo ao qual não se adicionou DNA); água estéril bidestilada para perfazer 25 μ L de volume final. Em algumas reacções de amplificação de exões do gene *PCSK9* adicionou-se ainda um adjuvante da PCR, o dimetilsulfóxido (DMSO).

Os tubos com a mistura reaccional foram colocados num termociclador (TProfessional basic gradient, Biometra). As condições específicas de cada PCR encontram-se no Anexo E.

Os fragmentos dos produtos de PCR foram visualizados através da realização de uma electroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v). Neste caso, as amostras a aplicar no gel foram preparadas através da adição de 4 μ L de solução de deposição a 6 μ L do produto de PCR, procedendo-se a uma migração electroforética a 80 V.

Os produtos de PCR foram armazenados a 4°C até posterior utilização.

2.4.3. Pesquisa de alterações nos genes de interesse

A pesquisa de alterações nos fragmentos genéticos foi efectuada através da combinação de técnicas complementares – dHPLC, sequenciação automática e MLPA.

2.4.3.1. Cromatografia líquida de elevada performance desnaturante (dHPLC)

Os exões 3, 4, 5, 9 e 17 do gene *LDLR*, associado à FH, foram analisados através de cromatografia líquida de elevada performance desnaturante (dHPLC).

A existência de uma alteração genética num produto de PCR provoca uma combinação alterada entre as cadeias de DNA, quando a amostra é submetida a uma desnaturação, formando-se heteroduplexes, ou seja, moléculas de DNA compostas por uma cadeia alterada e uma cadeia não alterada. A procura de alterações por dHPLC baseia-se, então, na formação de heteroduplexes, aquando da hibridação das cadeias de DNA, por aplicação de uma rampa de controlo da temperatura que permite a descida progressiva (1°C/minuto) da temperatura de 96°C para 35°C. As cadeias formadas apresentam diferentes tempos de retenção quando sujeitas a uma cromatografia líquida de fase reversa, sendo as heteroduplexes eluídas depois das suas correspondentes homoduplexes (figura 2.2).

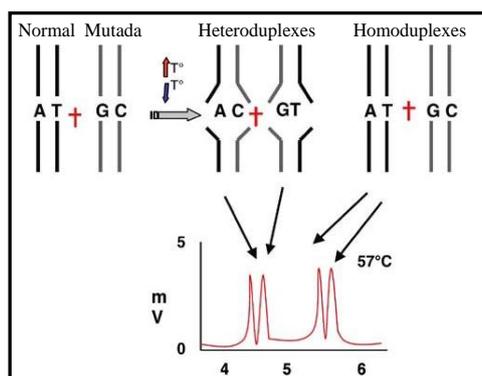


Figura 2.2. Representação gráfica da análise por dHPLC (*denaturing high performance liquid chromatography*). As cadeias de DNA são desnaturadas e novamente emparelhadas, formando heteroduplexes, que podem ser distinguidos dos homoduplexes por esta técnica.¹¹⁰ (Adaptado)

Um volume de 10 μL da amostra de produto de PCR a analisar, assim como de amostras de produtos de PCR de dois controlos normais (sem alteração) e de dois controlos positivos (para confirmação da etapa de desnaturação), foram entregues à Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) do INSA, onde foi efectuada a técnica de dHPLC. Após ocorrer a desnaturação, as amostras foram aplicadas numa coluna C18 de fase reversa com empacotamento não poroso de polistireno/divinilbenzeno (DNASepTM; Trangenomics). As heteroduplexes foram eluídas através de um gradiente linear entre o eluente A (0,1 M de acetato de trietilamina, pH 7,0; Trangenomics) e o eluente B (0,1 M de acetato de trietilamina, pH 7,0 contendo 250 M de acetonitrilo; Sigma), num fluxo constante de 0,9 mL/min. O DNA foi detectado a 260 nm, sendo que as concentrações inicial e final do eluente B foram ajustadas a cada fragmento, de modo a obter um tempo de retenção de 3-5 minutos. A temperatura de análise, que corresponde à temperatura para a qual 80% do DNA está desnaturado, determinando a sensibilidade do método, foi detectada pelo programa utilizado (Wavemaker Software; Trangenomics). A informação acerca da temperatura de análise e das concentrações de eluente B encontram-se no Anexo F.

As amostras do produto de PCR correspondentes aos heteroduplexes que foram detectados por dHPLC, através da observação de um perfil de eluição alterado em relação ao dos controlos normais, foram posteriormente submetidas a sequenciação automática para confirmação da presença de alteração.

2.4.3.2. Sequenciação automática

A sequenciação automática de DNA foi aplicada para pesquisa directa em alguns fragmentos de interesse amplificados por PCR ou para confirmação de resultados obtidos por dHPLC aplicado no estudo molecular do gene *LDLR*.

A automatização da sequenciação de DNA consiste numa variação do método de sequenciação de Sanger, que tem como base a síntese enzimática de uma cadeia de DNA complementar à cadeia em análise, a partir da adição de *primers* marcados radioativamente e de didesoxirribonucleótidos (ddNTPs). A tecnologia de sequenciação automática de DNA permite a obtenção de sequências de DNA com milhares de nucleótidos, em poucas horas, sendo que cada tipo de ddNTP é marcado com uma molécula fluorescente de cor diferente (figura 2.3).

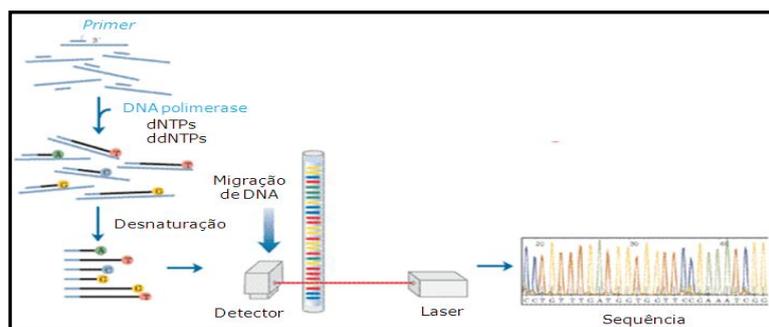


Figura 2.3. Sequenciação automática. Cada tipo de ddNTP usado no método de sequenciação de Sanger pode ligar-se a uma molécula fluorescente que fornece uma cor particular a todos os fragmentos que terminam num tipo de nucleótido. Os fragmentos de DNA são separados por tamanho numa electroforese capilar, sendo que os do mesmo tamanho dão origem a um pico. A cor associada a cada pico é detectada através de um laser e a sequência de DNA consiste na sequência de cores dos picos detectados pelo detector. Abreviaturas: dNTPs, desoxirribonucleótidos trifosfato; ddNTPs, didesoxirribonucleótidos trifosfato.²¹ (Adaptado)

Antes de se proceder à sequenciação deve realizar-se uma etapa de purificação dos produtos de PCR, de modo a eliminar o excesso de *primers* e de dNTPs resultantes da PCR. Esta purificação realizou-se através de uma digestão enzimática, por utilização de um produto comercial denominado ExoSAP-IT[®] (Usb) que conjuga duas enzimas hidrolíticas, a exonuclease I e a *shrimp alkaline phosphatase* (SAP). Um tubo com 2,5 μ L do produto de PCR e 1 μ L de EXOSAP-IT foi colocado no termociclador (TProfessional basic gradient, Biometra). As condições da purificação encontram-se esquematizadas no Anexo G. Os produtos da purificação foram armazenados a 4°C até posterior utilização.

A sequenciação foi preparada de acordo com as instruções indicadas no *kit Big Dye[®]* utilizado (*kit Big Dye[®] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems)). A cada tubo de reacção, adicionou-se 2 μ L de *Big Dye[®]*, 1 μ L de *primer* adequado à sequenciação do fragmento que se pretendia analisar, 1 μ L do produto da purificação e água estéril bidestilada para perfazer o volume final de 10 μ L. O tubo foi inserido num termociclador (TProfessional basic gradient, Biometra) com o programa adequado à sequenciação. As condições da reacção de sequenciação encontram-se no Anexo G. As amostras foram, depois, retiradas do termociclador e entregues à UTI do

INSA, onde se procedeu à etapa final da sua sequenciação, (3100 *Genetic Analyser*, Applied Biosystems)

As sequências obtidas foram analisadas através do *software Staden Package* e comparadas com as sequências de referência dos genes estudados.

2.4.3.3. Análise de grandes rearranjos no gene do receptor das lipoproteínas de baixa densidade por *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA)

A técnica de MLPA permitiu a pesquisa de grandes rearranjos (deleções ou duplicações de um ou mais exões) no gene *LDLR*. Este é um método simples de detecção de alterações no número de cópias numa única reacção de PCR, utilizando um único par de *primers*.

Na técnica de MLPA não são as sequências alvo que são amplificadas mas as sondas de MLPA que hibridam com a sequência alvo. A reacção de MLPA pode ser dividida em quatro passos principais: reacção de desnaturação do DNA; hibridação das sondas; reacção de ligação das sondas; reacção de PCR para amplificação das sondas ligadas (Figura 2.4). A reacção desenvolve-se com a utilização de um *kit* para a técnica de MLPA e os produtos resultantes da amplificação com este *kit* podem ser analisados por interpretação dos picos de fluorescência detectados por electroforese capilar, sendo que a comparação do padrão de picos obtido com o padrão de picos das amostras de referência indicará qual a sequência que apresenta diferente número de cópias. A diferença entre as áreas dos picos da amostra em estudo e as áreas dos picos da amostra de referência reflecte a existência de diferentes números de cópias da sequência analisada. Por exemplo, uma deleção de um exão num alelo revela uma diminuição para metade dos picos relativos às sondas específicas para esse exão, quando comparados com os picos que dizem respeito aos outros exões não delectados. Para validar todo o processo de MLPA poderão ser incluídos controlos negativos, sendo assim possível a normalização que permite a posterior análise de amostras.

Neste estudo, a técnica de MLPA foi realizada através do *SALSA[®] MLPA[®] kit* (MRC-Holland), tendo-se seguido o protocolo recomendado por este *kit* (*MLPA[®] DNA*

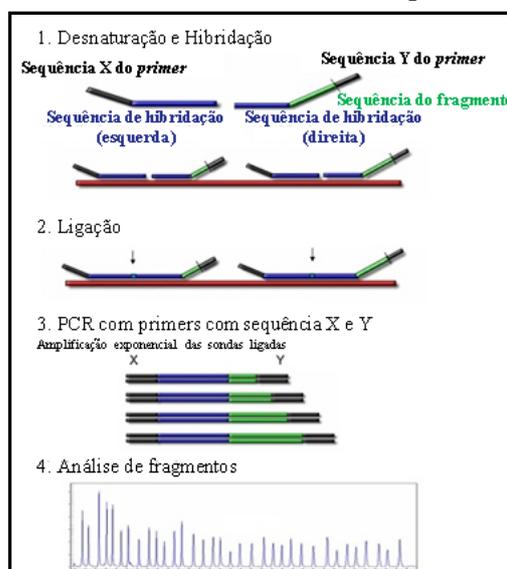


Figura 2.4. Técnica de MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*). A técnica desenvolve-se em quatro etapas, através de um único par de *primers*.¹¹¹ (Adaptado)

protocol version MDP-v002) e utilizado sondas específicas para a detecção de deleções e duplicações no gene *LDLR* (*SALSA MLPA probemix P062-C2 LDLR*; MRC-Holland). A informação relativa às sondas utilizadas encontra-se no Anexo H. Para a desnaturação do DNA colocou-se 2,5 µL de TE (TE 10 mM: pH 8,0; Ambion) num tubo e adicionou-se 2,5 µL de DNA extraído. Em seguida, colocaram-se os tubos num termociclador (TProfessional basic gradient, Biometra) programado para 5 minutos a 98°C e posterior descida da temperatura até 25°C. Entretanto, foi preparada a mistura da reacção de hibridação constituída por *MLPA buffer* (1,5 µL/amostra) e *SALSA MLPA probemix P062-C2 LDLR* (1,5 µL/amostra). Depois da desnaturação do DNA, adicionou-se 3 µL desta mistura ao produto da desnaturação e continuou-se o programa no termociclador (1 minuto a 95°C seguido de uma pausa a 60°C durante 16 a 20 horas). Preparou-se a mistura de reacção de ligação, constituída por água estéril bidestilada (25 µL/amostra), tampão ligase A (3 µL/amostra), tampão ligase B (3 µL/amostra) e enzima ligase-65 (1 µL/amostra). Quando o termociclador atingiu a temperatura de 54°C, adicionou-se 32 µL desta mistura de reacção de ligação ao produto da reacção de hibridação, sem remover os tubos do termociclador, e continuou-se o programa do termociclador (54°C durante 15 minutos, 5 minutos a 98°C, descida da temperatura até aos 20°C. Entretanto, preparou-se a mistura de reacção de PCR, constituída por água estéril bidestilada (7,5 µL/amostra), *SALSA PCR primer mix* (2 µL/amostra) e *SALSA* polimerase (0,5 µL/amostra). Quando o programa de MLPA, no passo da ligação, atingiu os 20°C, retiraram-se os tubos do termociclador e adicionou-se 10 µL desta mistura de reacção de PCR a cada tubo. Os tubos foram novamente colocados no termociclador para ocorrer a reacção de PCR (35 ciclos compostos pelo passo de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, seguido de emparelhamento dos *primers* a 60°C durante 30 segundos, extensão a 72°C durante 1 minuto e extensão final a 72°C durante 20 minutos).

Os produtos da reacção de PCR do MLPA foram entregues à UTI do INSA, onde se completou a técnica, realizando-se uma electroforese capilar.

Os dados resultantes foram analisados através do *Microsoft Office Excel*.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Caracterização bioquímica

Neste trabalho analisaram-se 40 indivíduos, referenciados com diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar (FH), por médicos colaboradores do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar (EPHF) e incluídos como casos-índice deste estudo.

A amostra de 40 casos-índice foi dividida em dois grupos, o grupo pediátrico, constituído por 17 crianças, e o grupo de adultos, constituído por 23 casos-índice com idade igual ou superior a 18 anos.

Em cada um dos dois grupos amostrais estudados, foi feita uma caracterização clínica de cada um dos casos-índice, a partir das suas informações clínicas e da sua história familiar. A caracterização bioquímica incluiu as determinações efectuadas no laboratório de Química Clínica da Unidade Laboratorial Integrada (ULI) do INSA e as quantificações realizadas no auto-analisador Daytona (Randox). Nas tabelas I.1 e I.2, I.3 e I.4 presentes no Anexo I, constam as informações relativas aos 40 indivíduos da amostra.

Em 5 dos 40 casos-índice da amostra com elevados níveis de TG foram adicionalmente estudados genes anteriormente descritos como estando associados à dislipidemia familiar combinada (FCHL). Os 5 casos-índice desta amostra estão sinalizados (*) nas tabelas I.1 a I.4, pertencendo 1 deles ao grupo pediátrico e os restantes 4 ao grupo de adultos.

Nas tabelas 3.1 e 3.2, os 40 casos-índice encontram-se distribuídos pelos dois grupos amostrais (pediátrico e de adultos), sendo apresentadas algumas características gerais da amostra e as médias dos parâmetros bioquímicos determinados neste estudo.

Tabela 3.1. Características da amostra em estudo

	Grupo pediátrico	n	N	Grupo de adultos	n	N
Idade (anos)	11,2±3,6	17	17	41,8±12,0	18	18 ^(b)
Sexo feminino (%)	52,9	9	17	43,5	10	23
Sexo masculino (%)	47,1	8	17	56,5	13	23
IMC (kg/m²)	20,5±4,9	15	15	27,4±4,9	19	19
DCV (%)	0	0	17	26,1	6	23
Diabetes (%)	0	0	16	9,5	2	21
Hipertensão (%)	0	0	16	42,9	9	21
Doenças da tiróide (%)	0	0	16	0	0	21
Em medicação (%)	12,5	2	16	91,3	21	23
Fumador (%)	0	0	16	38,1	8	21
Consumo de álcool (%)	0	0	16	23,8	5	21
Prática de exercício físico^(a) (%)	75	12	16	30,4	7	21

n, frequência absoluta de casos-índice; N, número total de casos-índice sobre os quais se obteve informação; DCV, doença cardiovascular; IMC, índice de massa corporal; (a) A prática de exercício físico é definida a partir da informação sobre o número de vezes, por semana, em que se pratica algum tipo de exercício físico, sendo que no grupo pediátrico a média foi de 3 vezes por semana e no grupo de adultos foi de 4 vezes por semana; (b) Embora só se tivesse informação sobre a idade de 18 casos-índice do grupo de adultos, considerou-se, a partir das árvores genealógicas da família, que os restantes cinco também podiam ser considerados adultos.

Tabela 3.2. Determinações bioquímicas realizadas

Parâmetro bioquímico	Grupo pediátrico	N	Grupo de adultos	N
CT (mg/dL)	283,2±51,1	17	362,6±68,4	20
c-LDL (mg/dL)	208,6±47,3	16	254,9±57,2	17
c-HDL (mg/dL)	61,9±19,2	16	63,0±27,7	18
TG (mg/dL)	103,8±62,7	16	180,2±189,2	19
apoA-I (mg/dL)	149,5±41,6	15	247,5±9,2	2
apoB (mg/dL)	118,1±29,7 ^(a)	15	118,5±16,3 ^(a)	2
Lp(a) (mg/dL)	36,7±42,9	15	97,0±125,9	2
apoE (mg/dL)	3,9 ±1,0	15	4,4±0,1	2
apoA-II (mg/dL)	31,5±6,9	15	40,4±7,8	2
apoC-II (mg/dL)	3,8±1,4	15	8,9±0,7	2
apoC-III (mg/dL)	8,2±2,6	15	15,1±1,1	2
c-sdLDL (mg/dL)	43,7±17,4	15	66,4±28,9	2

Todas as médias foram calculadas a partir de valores com os casos-índice sem medicação; N, número total de casos-índice que contaram para a determinações das médias; CT, colesterol total; mg, miligrama; dL, decilitro; c-LDL, colesterol associado às lipoproteínas de baixa densidade; c-HDL, colesterol associado às lipoproteínas de elevada densidade; TG, triglicéridos; apo, apolipoproteína; Lp(a), lipoproteína (a); c-sdLDL, colesterol associado às *small dense low density lipoproteins*; (a) a maioria das determinações em crianças sem medicação foram realizadas no INSA mas no caso dos adultos, os valores provêm de informação dada pelos médicos, sendo que, por exemplo, para a APOB não existe informação anterior.

3.2. Estudo molecular de genes causadores de hipercolesterolemia familiar

No que diz respeito à presença de FH nos 40 casos-índice estudados, foram pesquisadas alterações nos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*. As diversas alterações detectadas encontram-se registadas nas tabelas 3.3 e 3.4. Na tabela 3.5 é possível observar a distribuição dos casos-índice, com e sem alteração detectada, pelos grupos pediátrico e de adultos. Nesta última tabela, as diversas alterações são separadas, tendo em conta o gene em que foram identificadas. Como no gene *LDLR* foram encontradas alterações de diversos tipos, dividem-se as alterações encontradas da seguinte forma: *missense* (substituição de um nucleótido por outro, com consequente troca de aminoácido); *nonsense* (pequenos e grandes rearranjos do DNA); alteração na região de *splicing* do mRNA; alterações verificadas em homozigotia (presença de dois alelos mutantes iguais) ou heterozigotia composta (presença de dois alelos mutantes diferentes do mesmo gene), tendo sido identificado um heterozigoto composto neste estudo.

Na amostra de 40 casos-índice estudados, foram identificados 15 indivíduos com mutação patogénica e 3 indivíduos com uma alteração não descrita num dos três genes estudados. No grupo pediátrico foram geneticamente identificados 35% (6/17) casos-índice e no grupo de adultos 39% (9/23). Foram detectadas duas alterações não descritas no grupo pediátrico e uma no grupo de adultos. Para além disso, uma criança possui uma alteração sinónima, nunca encontrada na população portuguesa, que está descrita como um polimorfismo mas que é referida porque ainda não foram realizados estudos de avaliação da sua patogenicidade.

Tabela 3.3. Caracterização molecular do grupo pediátrico

Caso- -índice	Alteração (nucleótido)	Localização	Gene	Alteração (proteína)	Tipo de alteração	REF
11215	c.2291T>C	Exão 15	<i>LDLR</i>	p.Ile764Thr	<i>Missense</i>	ND
11258	[Pr_EX2del+ EX8_EX12del]	Deleção de parte do gene	<i>LDLR</i>	-	Grande rearranjo	51
11311	c.1291G>A	Exão 9	<i>LDLR</i>	p.Ala431Thr	<i>Missense</i>	112
11326	c.619_639del	Exão 4	<i>LDLR</i>	p.Gly207_Ser213del	Pequeno rearranjo	53
11349	c.1775G>A	Exão 12	<i>LDLR</i>	p.Gly592Glu	<i>Missense</i>	113
12021	c.90C>T	Exão 2	<i>LDLR</i>	p.Asn30Asn	Sinónima	114
12025	[EX11_EX12del]	Deleção de parte do gene	<i>LDLR</i>	-	Grande rearranjo	115
12026	c.818-2A>G	Intrão 5	<i>LDLR</i>	-	<i>Splicing</i>	116 ^(*)
12037	c.1802A>T	Exão 12	<i>LDLR</i>	p.Asp601Val	<i>Missense</i>	ND

REF, referência bibliográfica de onde a mutação foi descrita; ND, não descrita; (*) foi descrito um grande rearranjo que envolve a deleção destes exões mas não na população portuguesa e, como os limites das deleções não são conhecidos, é possível que este rearranjo português seja diferente do anteriormente descrito.

Tabela 3.4. Caracterização molecular do grupo de adultos

Caso-índice	Alteração (nucleótido)	Localização	Gene	Alteração (proteína)	Tipo de alteração	REF
11230	c.10708G>A	Exão 26	<i>APOB</i>	p.Arg3527Gln	<i>Missense</i>	71
11247	c.1291G>A	Exão 9	<i>LDLR</i>	p.Ala431Thr	<i>Missense</i>	112
11269	[Pr_EX2del+EX8_EX12del]	Deleção de parte do gene	<i>LDLR</i>	-	Grande rearranjo	51
11340	c.666C>G	Exão 4	<i>LDLR</i>	p.Cys222Trp	<i>Missense</i>	ND
11343	c.1291G>A	Exão 9	<i>LDLR</i>	p.Ala431Thr	<i>Missense</i>	112
12010	[EX2_EX3del]	Deleção de parte do gene	<i>LDLR</i>	-	Grande rearranjo	60
12013	c.1291G>A	Exão 9	<i>LDLR</i>	p.Ala431Thr	<i>Missense</i>	112
12040	[c.1216C>T]	Exão 9	<i>LDLR</i>	p.Arg406Trp	<i>Missense</i>	117,118
	[EX8_EX12del]	Deleção de parte do gene	<i>LDLR</i>	-	Grande rearranjo	51
12041	c.2093G>T	Exão 14	<i>LDLR</i>	p.Cys698Phe	<i>Missense</i>	119
12058	c.1775G>A	Exão 12	<i>LDLR</i>	p.Gly592Glu	<i>Missense</i>	113

REF, referência bibliográfica de onde a mutação foi descrita; ND, não descrita.

Tabela 3.5. Distribuição dos casos-índice com e sem mutação pelos grupos amostrais de estudo

		Grupo pediátrico		Grupo de adultos	
		n		n	
Sem mutação		11 (64,71%)		14 (60,87%)	
Com mutação	<i>LDLR missense</i>	6 (35,29%)	2 (11,76%)	9 (39,13%)	5 (21,74%)
	<i>LDLR nonsense</i>		3 (17,65%)		2 (8,69%)
	<i>LDLR splicing</i>		1 (5,88%)		0
	<i>LDLR heterozigoto composto</i>		0		1 (4,35%)
	<i>APOB</i>		0		1 (4,35%)
	<i>PCSK9</i>		0		0
		N=17 (100%)		N=23 (100%)	

n, número de casos-índice; N, número total de casos-índice no grupo estudado.

3.2.1. Gene *LDLR*

Em 14 casos-índice, 6 do grupo pediátrico e 8 do grupo de adultos, foi identificada uma mutação no gene *LDLR*. O estudo detectou, ainda, 3 indivíduos com alterações que não se encontram descritas na literatura.

Em 7 casos-índice foi detectada uma mutação *missense*, uma delas encontrada pela técnica de dHPLC, (*denaturing high performance liquid chromatography*) e confirmada por sequenciação automática (figura 3.1) e as restantes identificadas unicamente com recurso à técnica de sequenciação automática (figura 3.2). As 3 alterações não descritas que foram encontradas tratam-se de alterações *missense*.

A sequenciação permitiu, também, a identificação de um pequeno rearranjo em que ocorre a deleção de 21 nucleótidos (figura 3.3) num caso-índice e de uma alteração no local de *splicing* do mRNA (figura 3.4) noutra participante do estudo. Estas mutações encontram-se descritas.

Pela técnica de MLPA foi possível detectar grandes rearranjos no gene *LDLR*. A alteração [Pr_EX2del+EX8_EX12del] foi encontrada num caso-índice do grupo pediátrico e num caso-índice do grupo de adultos. Esta grande deleção envolve o promotor e 7 exões do gene, tendo sido descrita anteriormente na população portuguesa.⁵¹ Noutra caso-índice do grupo pediátrico detectou-se um grande rearranjo que consiste na deleção de dois exões ([EX11_EX12del]). Apesar duma deleção destes dois exões já ter sido anteriormente descrita, nunca foi encontrada na população portuguesa, sendo que os terminais desta deleção (*endpoints*) e os da já descrita podem ser diferentes.¹¹⁵ Não foi possível identificar estes *endpoints*. Relativamente ao grupo de adultos, foram, ainda, identificados 2 casos-índice com outros grandes rearranjos já descritos na população portuguesa: [EX2_EX3del]⁶⁰ e [EX8_EX12del]⁵¹.

Como já foi referido, um dos casos-índice é um heterozigoto composto verificando-se a presença de dois alelos mutantes diferentes do gene *LDLR* (figura 3.5).

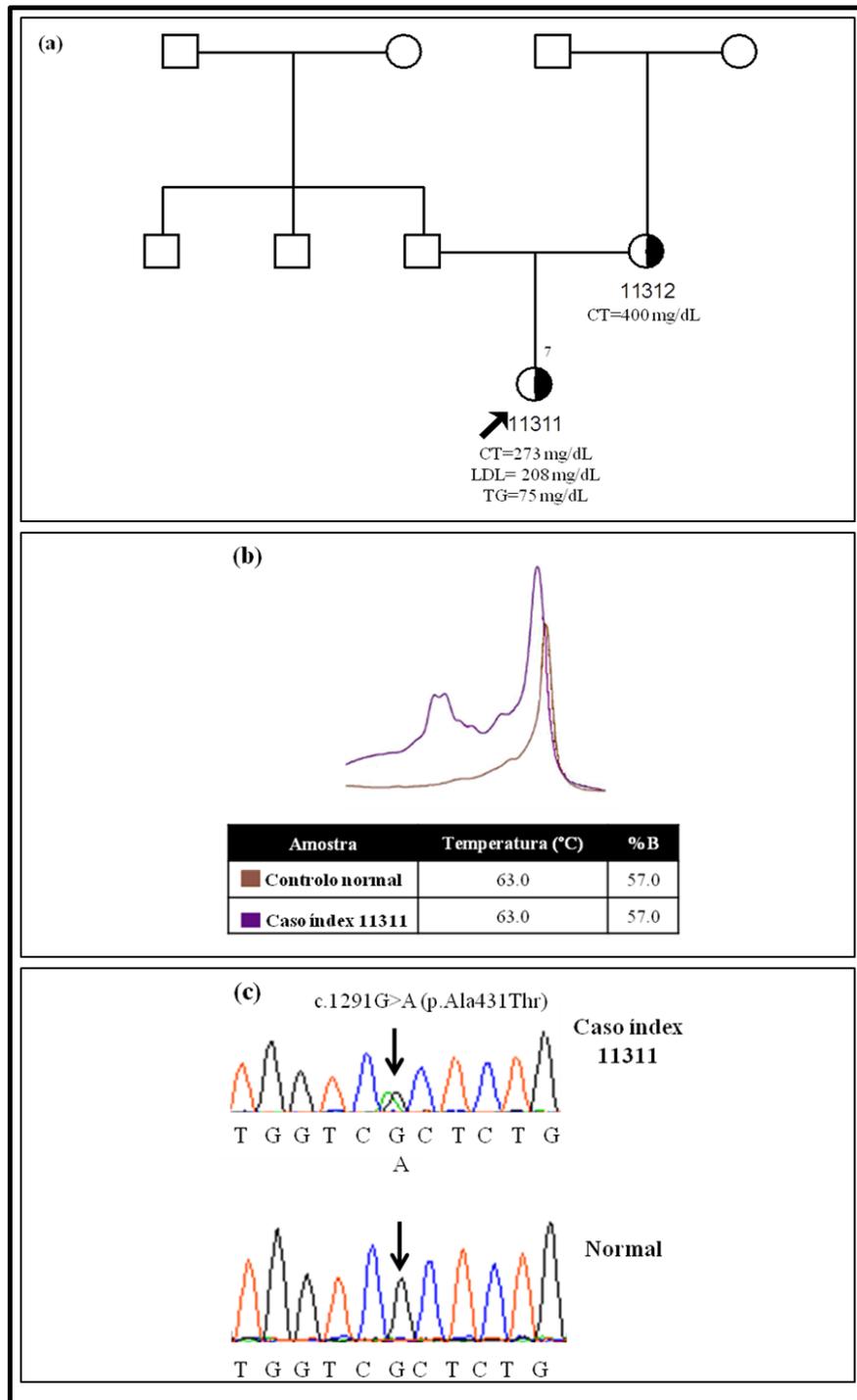


Figura 3.1 Caso-índice 11311. (a) Árvore genealógica. A seta indica o caso-índice. A idade em anos está por cima do símbolo. Os valores de colesterol total (CT), colesterol associado às lipoproteínas de baixa densidade (c-LDL) e triglicéridos (TG) estão indicados por baixo dos símbolos. Os símbolos metade preto representam indivíduos heterozigotos para a mutação c.1291G>A (p.Ala431Thr) e os símbolos a branco representam indivíduos que não foram estudados. (b) Detecção da mutação pela metodologia de dHPLC. O perfil de eluição do caso-índice (a roxo) encontra-se alterado relativamente ao perfil de eluição de um controlo normal (a castanho) (Condições: temperatura de desnaturação de 63,0°C; 57,0% de eluente B). (c) Sequência de parte do exão 9 do gene *LDLR* do caso-índice, onde se observa a alteração G→A na posição c.1291, que resulta na alteração da proteína p.Ala431Thr, comparada com a sequência de um indivíduo normal (as setas indicam o nucleótido onde ocorre esta mutação).

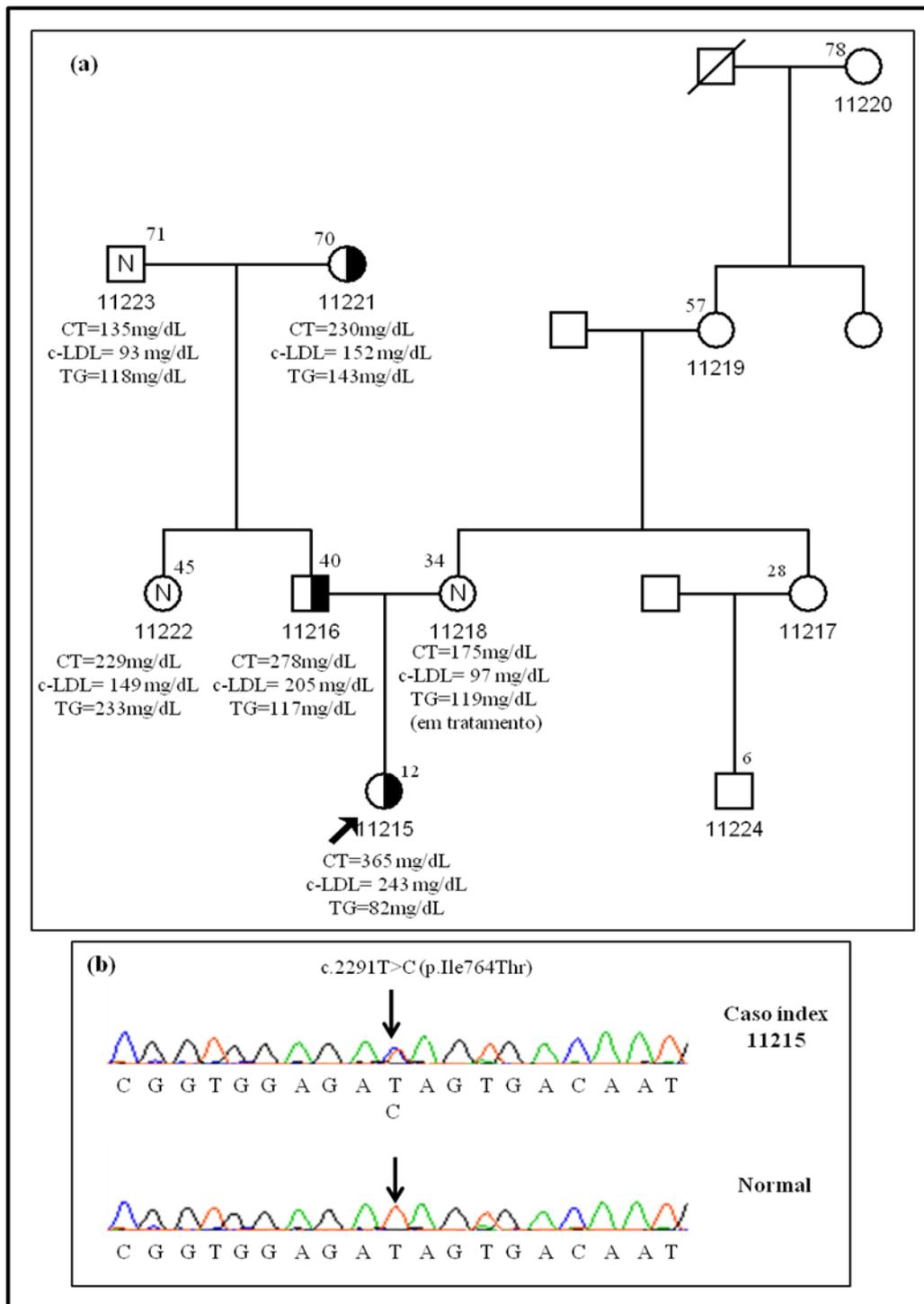


Figura 3.2. Caso-índice 11215. (a) Árvore genealógica. A seta indica o caso-índice. As idades em anos estão por cima dos símbolos. Os valores de colesterol total (CT), colesterol associado às lipoproteínas de baixa densidade (c-LDL) e triglicéridos (TG) estão indicados por baixo dos símbolos. Os símbolos metade preto representam indivíduos heterozigotos para a alteração c.2291T>C (p.Ile764Thr), os símbolos com N representam os indivíduos normais, onde esta alteração não foi encontrada e os símbolos a branco representam indivíduos que não foram estudados. (b) Sequência de parte do exão 15 do gene *LDLR* do caso-índice, onde se observa a alteração T→C na posição c.2291, que resulta na alteração da proteína p.Ile764Thr, comparada com a sequência de um indivíduo normal (as setas indicam o nucleótido onde ocorre esta alteração).

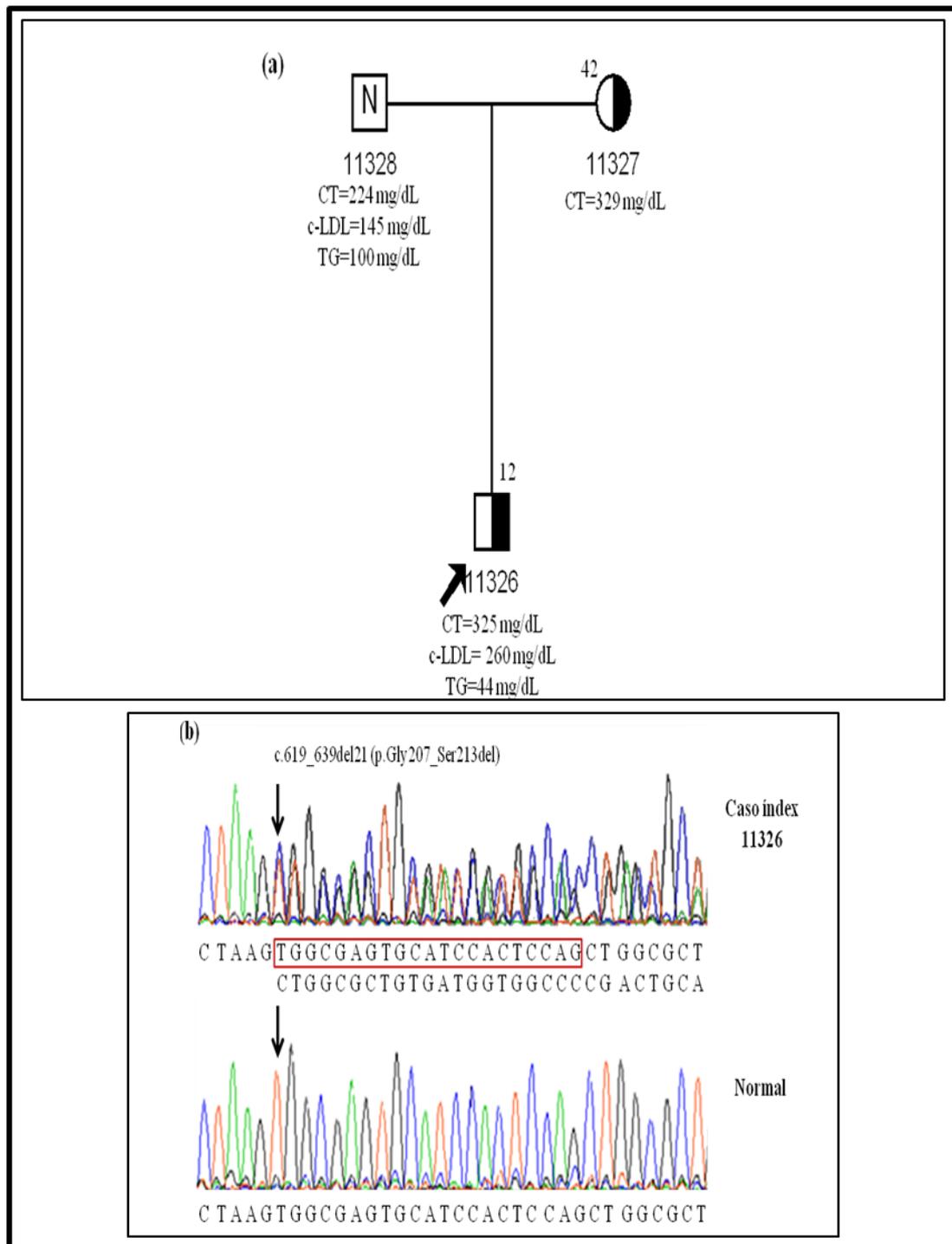


Figura 3.3. Caso-índice 11326. (a) Árvore genealógica. A seta indica o caso-índice. As idades em anos estão por cima dos símbolos. Os valores de colesterol total (CT), colesterol associado às lipoproteínas de baixa densidade (c-LDL) e triglicéridos (TG) estão representados por baixo dos símbolos. Os símbolos metade preto representam indivíduos heterozigotos para a mutação c.619_639del (p.Gly207_Ser213del) e o símbolo com N representa um indivíduo normal, onde esta mutação não foi encontrada. **(b)** Sequência de parte do exão 4 do gene *LDLR* do caso-índice, onde se observa a deleção de 21 nucleótidos, que resulta na mutação c.619_639del (p.Gly207_Ser213del), comparada com a sequência de um indivíduo normal (as setas indicam o nucleótido a partir do qual se inicia esta deleção).

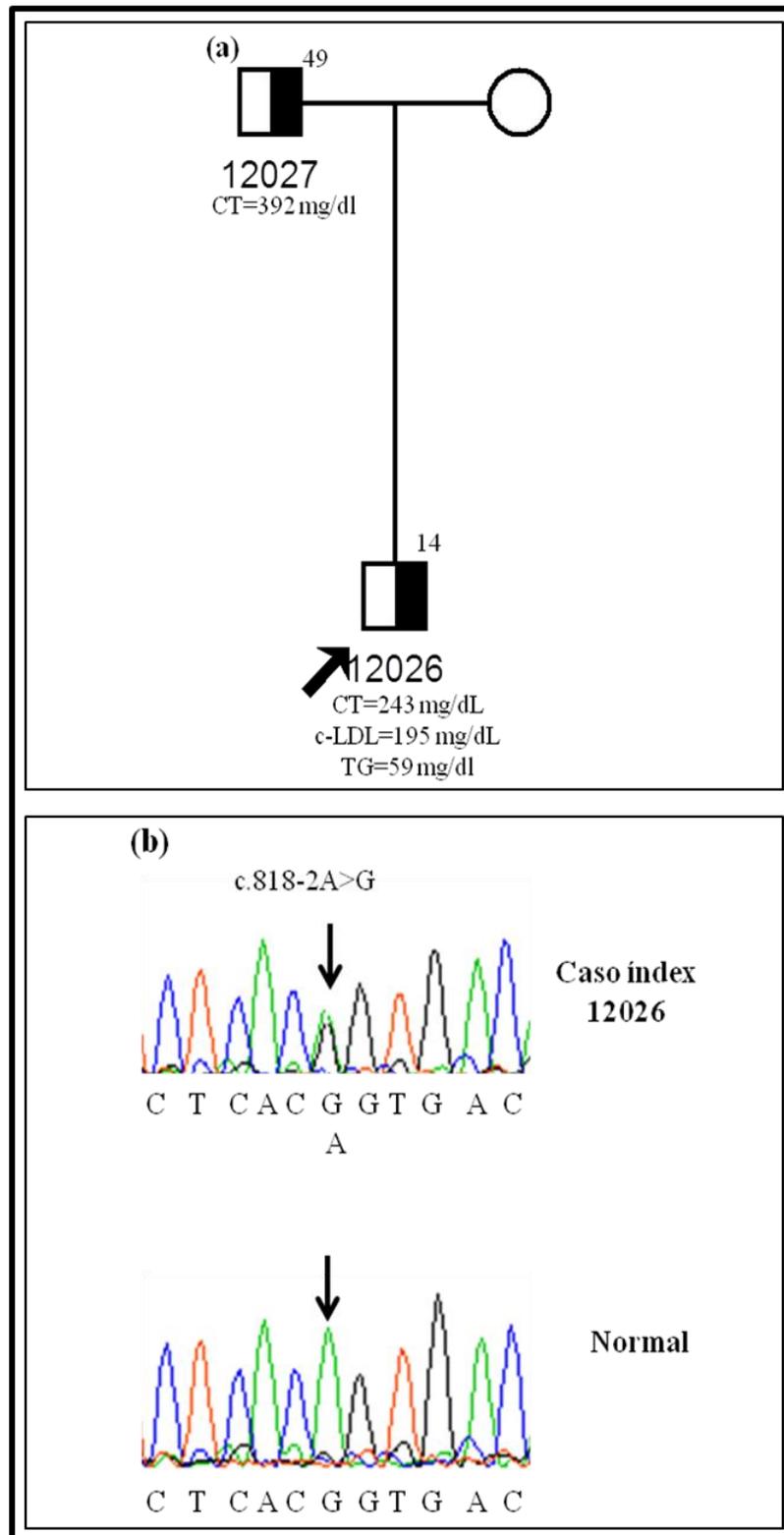


Figura 3.4. Caso-índice 12026. (a) Árvore genealógica. A seta indica o caso-índice. As idades em anos estão por cima dos símbolos. Os valores de colesterol total (CT), colesterol associado às lipoproteínas de baixa densidade (c-LDL) e triglicéridos (TG) estão representados por baixo dos símbolos. Os símbolos metade preto representam indivíduos heterozigotos para a mutação c.818-2A>G e o símbolo a branco representa um indivíduo que não foi estudado. (b) Sequência de parte do intrão 5, observada por sequenciação do exão 6 do gene *LDLR* do caso-índice, onde se observa a mutação A→G na posição c.818-2A>G, comparada com a sequência de um indivíduo normal (as setas indicam o nucleótido onde ocorre esta mutação).

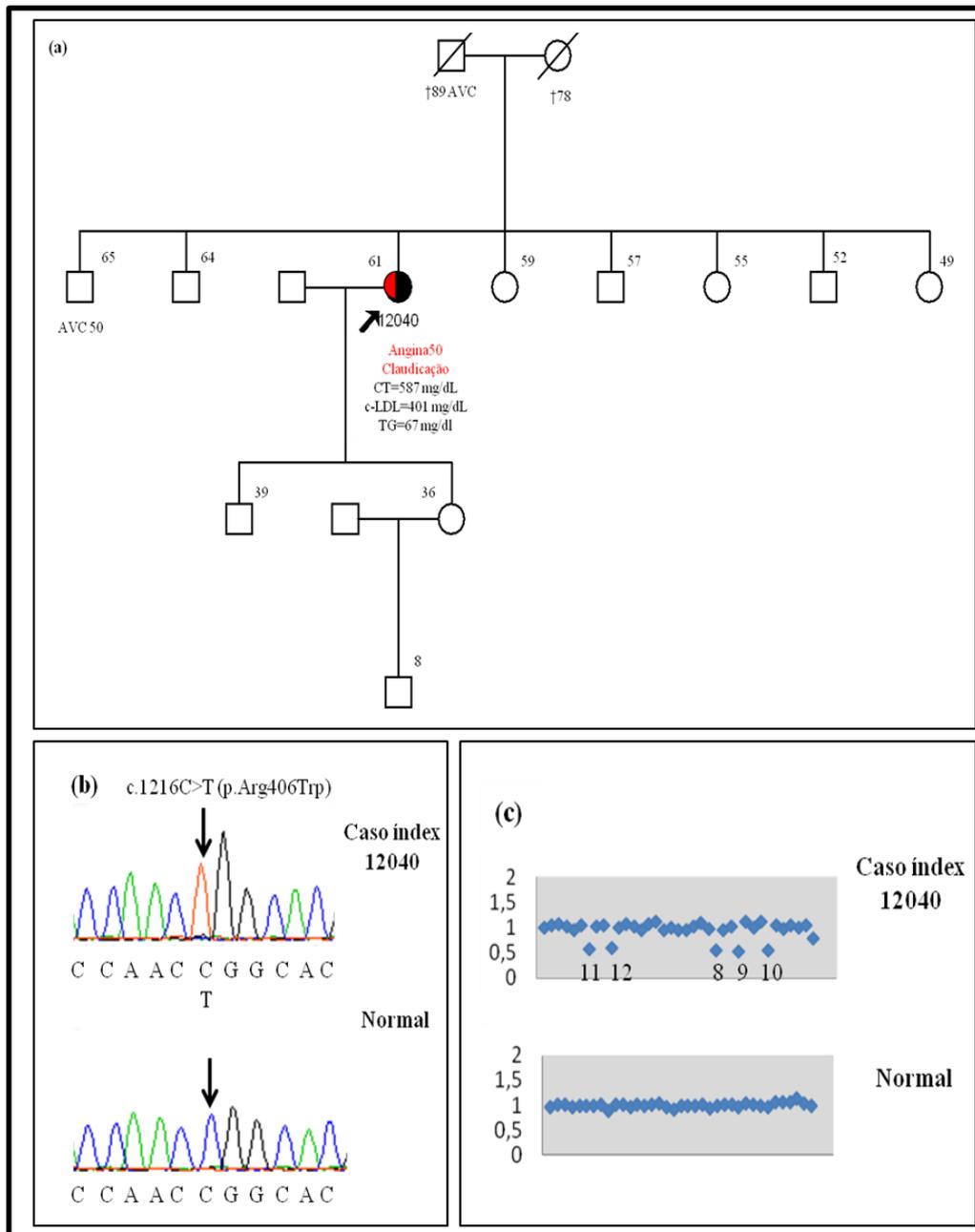


Figura 3.5. Caso-índice 12040. (a) Árvore genealógica. A seta indica o caso-índice. As idades em anos estão por cima dos símbolos. Os valores de colesterol total (CT), colesterol associado às lipoproteínas de baixa densidade (c-LDL) e triglicéridos (TG) e eventos ocorridos (Angina, Claudicação, AVC, †morte) e respectivas idades a que ocorreram estão representados por baixo dos símbolos. O símbolo metade preto e metade vermelho representa um indivíduo heterozigoto composto que apresenta a mutação c.1216C>T (p.Arg406Trp) num alelo e o grande rearranjo EX8_EX12del no outro alelo. Os símbolos a branco representam indivíduos que não foram estudados. (b) Sequência de parte do exão 9 do gene *LDLR* do caso-índice, onde se observa a alteração C→T na posição c.1216, que resulta na alteração na proteína p.Arg406Trp, comparada com a sequência de um indivíduo normal (as setas indicam o nucleótido onde ocorre esta mutação). (c) Detecção por MLPA do grande rearranjo EX8_EX12del do gene *LDLR*. Depois da normalização das alturas relativas de todos os picos em relação às amostras controlo, a altura normal dos picos é aproximadamente 1. Se o gene tem um grande rearranjo, como a deleção encontrada neste caso-índice, as alturas relativas dos picos correspondentes aos exões delectados descem para cerca de 0,5. Os números que indicam os exões delectados encontram-se por baixo dos respectivos pontos.

Como já foi referido, das diferentes alterações encontradas, existem 3 *missense* que ainda não se encontram descritas, pelo que serão necessários estudos adicionais para avaliar o seu efeito e a possibilidade de serem mutações patogénicas.

De acordo com o referido em 1998 por Cotton & Scriver¹⁰⁷, uma mutação ocorre quando existe uma sequência específica de DNA que se encontra alterada em relação à sequência de referência, podendo esta alteração ter um efeito no fenótipo ou representar uma variação neutral (polimorfismo) que não produz efeito. Antes de avaliar se uma alteração pode ser designada de mutação, há que avaliar a presença de: (1) erros que podem ter sido introduzidos pela técnica de PCR, produzindo uma falsa mutação; (2) introdução da variante fenotípica por uma mutação num alelo adjacente ao que se está a considerar; (3) mutações de caracterização ambígua, só esclarecida por análise da expressão, que podem resultar da interpretação de uma alteração no terceiro nucleótido de um codão como sendo silenciosa quando pode criar um novo local de *splicing* ou um mRNA instável, do facto de uma alteração num nucleótido que afecta um aminoácido conservado poder não representar um efeito no fenótipo e de uma alteração que afecta um aminoácido não conservado poder ter um maior efeito, da conclusão de que uma mutação *nonsense* é usualmente patogénica, quando na realidade se afectar o polipéptido a jusante dos domínios necessários para a completa função, pode ter um efeito reduzido.¹⁰⁷

Os seguintes critérios foram sugeridos por Cotton & Scriver para designar uma mutação: (1) informação inicial que inclui o tipo de mutação (mutações em sequências codificantes que geram aparecimento de codões stop a jusante têm elevada probabilidade de causarem modificações no fenótipo), extensão de DNA analisado (a identificação de uma mutação deve especificar a região e a extensão de DNA analisado e o método aplicado, uma vez que o efeito significativo pode resultar de uma mutação presente numa região não avaliada), análise da segregação (se um fenótipo de uma doença de transmissão dominante segrega com a mutação e não segrega na sua ausência então a mutação é compatível com um efeito causador de doença), aminoácido afectado (os aminoácidos conservados no produto polipeptídico do gene têm provavelmente maior importância funcional e as mutações que alteram resíduos conservados e os substituem por outros de diferente carácter físico provavelmente afectam a estrutura e a função do polipéptido), prevalência da mutação (uma alteração que ocorra em menos de 1% dos alelos na população é definida como rara e pode ser patogénica enquanto uma alteração que seja encontrada em maior frequência pode ser um polimorfismo que contribui para a modificação de fenótipo e aparecimento de doença, em particular de doenças complexas); (2) análise da expressão (a análise funcional de um gene mutante, normalmente por expressão de cDNA, é o teste final para confirmar que a mutação é patogénica. Caso não seja possível a sua realização, os outros critérios devem ser adoptados, mas se a mutação for analisada por expressão *in vitro*, os outros critérios

tornam-se redundantes); (3) importância relativa do tipo de mutação (as mutações *missense* são as que preferencialmente produzem o problema da dúvida quanto ao seu efeito).¹⁰⁷

Na tabela 3.6 encontra-se a informação que se refere à aplicação destes critérios às 3 alterações não descritas detectadas neste estudo.

A da alteração, a c.2291T>C (caso-índice 11215, exão 15 do *LDLR*) encontra-se num domínio da proteína que foi descrito como não sendo importante para o funcionamento da mesma,¹²⁰ pelo que os estudos funcionais não são essenciais neste caso. Sendo assim, neste estudo, foi analisado um painel de 100 normolipidémicos onde esta alteração não foi encontrada, podendo considerar-se uma alteração rara, uma vez que alterações com efeito causador de doença são, normalmente, encontradas numa frequência inferior a 1% (alterações raras) enquanto alterações neutrais (polimorfismos) são, geralmente, encontrados numa frequência superior a 1%. Como a alteração não se encontra presente no painel de normolipidémicos então não deverá apresentar um carácter polimórfico.

Tabela 3.6. Avaliação de alterações não descritas no gene *LDLR*

Alteração	c.666C>G p.Cys222Trp (caso-índice 11340)	c.1802A>T p.Asp601Val (caso-índice 12037)	c.2291T>C p.Ile764Thr (caso-índice 11215)
Codão stop prematuro	N	N	N
Extensão de DNA analisado	Todo o gene <i>LDLR</i> , com recurso a dHPLC, sequenciação automática e MLPA		
Co-segregação	Estudo familiar não foi possível	Pai do caso-índice tem a mutação e mãe não tem; Pai e caso-índice com fenótipo mais agressivo do que mãe; necessário estudo de mais familiares	S
Aa afectado	Aa conservado entre espécies	Aa conservado entre espécies	Aa não conservado entre espécies
Prevalência da mutação	-	-	0%
Estudos funcionais	N	N	N
Tipo de alteração	<i>Missense</i>	<i>Missense</i>	<i>Missense</i>

N, não; dHPLC, cromatografia líquida de alta performance desnaturante; MLPA, *multiplex ligation-dependent probe amplification*; S, sim; Aa, aminoácido.

As 3 alterações no gene *LDLR* que ainda não se encontram descritas foram, ainda, avaliadas *in silico*, através das seguintes ferramentas de previsão do efeito de substituições de aminoácidos, disponíveis *online*: Mutation Taster^{121,122}, SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*)¹²³, PolyPhen-2 (*polymorphism phenotyping v2*)¹²⁴ (tabela 3.7). Estas plataformas permitem prever os efeitos da substituição de um determinado aminoácido em termos de alterações na estrutura da proteína ou no seu pH.

Tabela 3.7. Avaliação, *in silico*, de alterações não descritas no gene *LDLR*

Alteração	c.666C>G p.Cys222Trp (caso-índice 11340)	c.1802A>T p.Asp601Val (caso-índice 12037)	c.2291T>C p.Ile764Thr (caso-índice 11215)
Previsão <i>Mutation Taster</i>	<i>Disease causing (0,999(9) probability)</i>	<i>Disease causing (0,997 probability)</i>	<i>Polymorphism (0,9995 probability)</i>
Previsão <i>SIFT</i>	<i>Deleterious (score: 0)</i>	<i>Deleterious (score: 0)</i>	<i>Tolerated (score: 1)</i>
Previsão <i>PolyPhen-2</i>	<i>Probably damaging (score: 1)</i>	<i>Probably damaging (score: 0,976)</i>	<i>Benign (score: 0)</i>

SIFT, *Sorting Intolerant From Tolerant*; PolyPhen-2, *polymorphism phenotyping v2*.

A alteração c.90C>T (p.Asn30Asn), que foi detectada no caso-índice 12021, encontra-se descrita como um polimorfismo mas não apresenta estudo funcionais, pelo que a sua patogénica deve ser investigada.

3.2.2. Gene *APOB*

Na amostra de 40 casos-índice estudados, foi identificado um indivíduo, no grupo de adultos, com uma alteração *missense* no gene *APOB* (figura 3.6), o que representa uma percentagem de 2,5% da amostra total estudada. A alteração detectada, c.10708G>A (p.Arg3527Gln), trata-se de uma alteração *missense* já descrita como estando associada ao fenótipo de FH.⁷¹

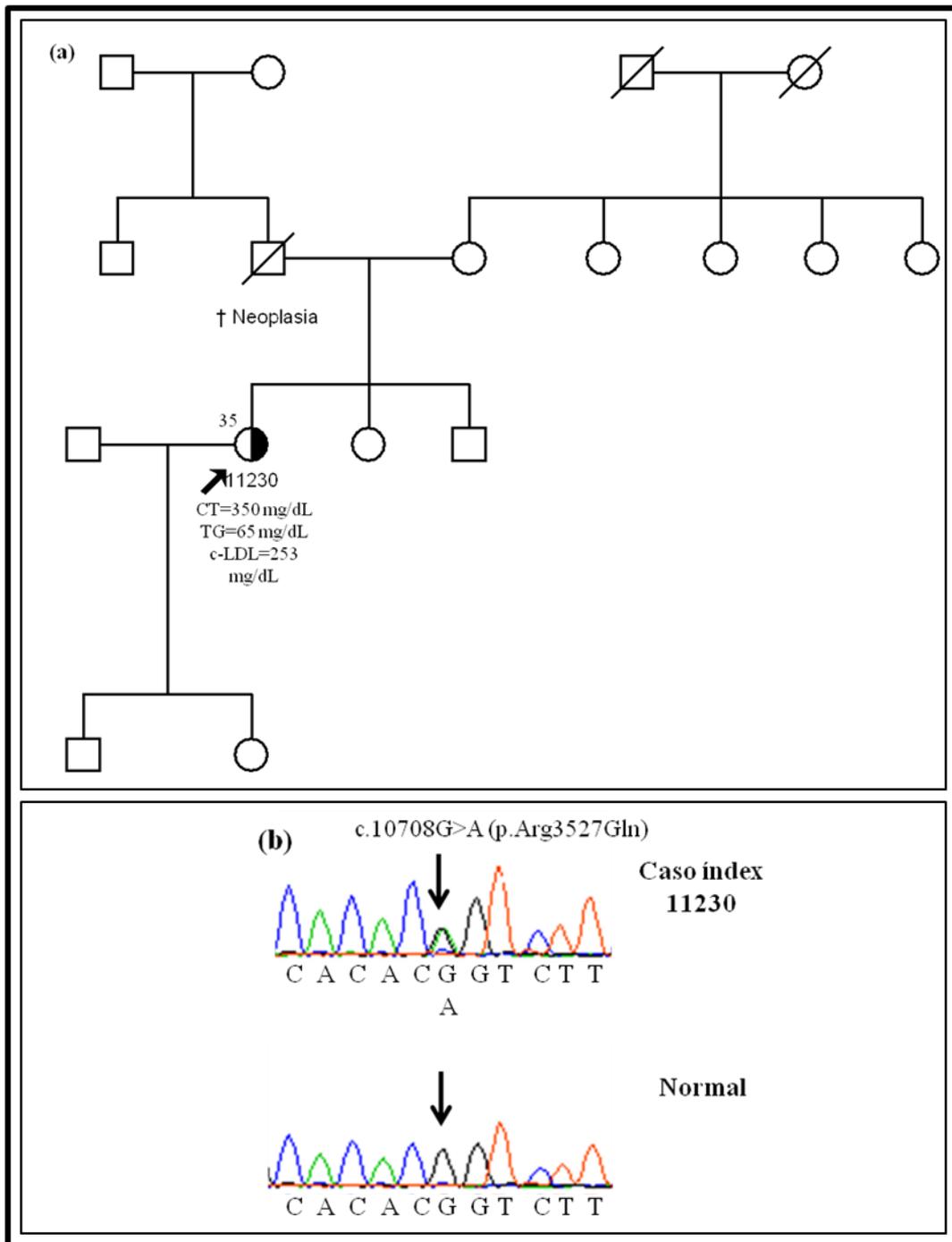


Figura 3.6. Caso-índice 11230. (a) Árvore genealógica. A seta indica o caso-índice. A idade em anos está por cima do símbolo. Os valores de colesterol total (CT), colesterol associado às lipoproteínas de baixa densidade (c-LDL) e triglicéridos (TG) e eventos ocorridos (†morte por Neoplasia) estão representados por baixo dos símbolos. O símbolo metade preto representa um indivíduo heterozigoto para a mutação c.10708G>A (p.Arg3527Gln) e os símbolos a branco representam indivíduos que não foram estudados. (b) Sequência de parte do exão 26 do gene *APOB* do caso-índice, onde se observa a alteração G→A na posição c.10708, que resulta na alteração na proteína p.Arg3527Gln, comparada com a sequência de um indivíduo normal (as setas indicam o nucleótido onde ocorre esta mutação).

3.2.3. Gene *PCSK9*

Na amostra de 40 casos-índice estudados, não foi identificado nenhum indivíduo, com alteração no gene *PCSK9* que possa ser responsável pela doença.

3.3. Diagnóstico clínico versus diagnóstico molecular de hipercolesterolemia familiar

Os 40 casos-índice foram avaliados segundo dois grupos de critérios de diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar heterozigótica (HeFH): os critérios desenvolvidos pelo *Simon Broome Register Group* (critérios SBRG) e os critérios desenvolvidos pelo programa *Dutch MEDPED* (critérios DMP). Depois foi efectuada a comparação entre esta avaliação e os resultados do estudo molecular dos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*. Esta comparação encontra-se nas tabelas 3.8 e 3.9, onde os casos-índice estão distribuídos pelos dois grupos estudados, o pediátrico e o de adultos.

Tabela 3.8. Comparação entre os diagnósticos clínico e molecular de FH para o grupo pediátrico

Caso-índice	Critérios SBRG	Critérios DMP	Alteração molecular
10227	HeFH provável	Diagnóstico negativo	-
11029	Diagnóstico negativo	Diagnóstico negativo	-
11215	HeFH provável	HeFH possível	c.2291T>C (p.Ile764Thr) – <i>LDLR</i> , ND
11225	Diagnóstico negativo	Diagnóstico negativo	-
11228	Diagnóstico negativo	Diagnóstico negativo	-
11258	Diagnóstico negativo	HeFH possível	[Pr_EX2del+ EX8_EX12del] – <i>LDLR</i>
11280	Diagnóstico negativo	Diagnóstico negativo	-
11311	HeFH provável	HeFH possível	c.1291G>A (p.Ala431Thr) – <i>LDLR</i>
11326	HeFH provável	HeFH possível	c.619_639del (p.Gly207_Ser213del) – <i>LDLR</i>
11335	HeFH provável	HeFH possível	-
11349	HeFH provável	HeFH possível	c.1775G>A (p.Gly592Glu) – <i>LDLR</i>
12016	Diagnóstico negativo	Diagnóstico negativo	-
12021	Diagnóstico negativo	Diagnóstico negativo	c.90C>T (p.Asn30Asn) – <i>LDLR</i>
12025	Diagnóstico negativo	HeFH possível	[EX11_EX12del] – <i>LDLR</i>
12026	HeFH provável	HeFH possível	c.818-2A>G – <i>LDLR</i>
12035	Diagnóstico negativo	Diagnóstico negativo	-
12037	Diagnóstico negativo	HeFH possível	c.1802A>T (p.Asp601Val) – <i>LDLR</i> ; ND

SBRG, *Simon Broome Register Group*; DMP, *Dutch MEDPED*, HeFH, hipercolesterolemia heterozigótica; ND, não descrita.

Tabela 3.9. Comparação entre os diagnósticos clínico e molecular de FH para o grupo de adultos

Caso-índex	Crítérios SBRG	Crítérios DMP	Alteração molecular
11035	Diagnóstico negativo	Diagnóstico negativo	-
11230	Diagnóstico negativo	HeFH possível	c.10708G>A (p.Arg3527Gln) – <i>APOB</i>
11242	HeFH provável	HeFH possível	-
11247	Diagnóstico negativo	HeFH possível	c.1291G>A (p.Ala431Thr) – <i>LDLR</i>
11251	HeFH provável	HeFH possível	-
11268	HeFH provável	HeFH possível	-
11269	Diagnóstico negativo	Diagnóstico negativo	[Pr_EX2del+ EX8_EX12del] – <i>LDLR</i>
11305	Diagnóstico negativo	HeFH possível	-
11324	HeFH provável	HeFH possível	-
11325	Diagnóstico negativo	HeFH possível	-
11340	Diagnóstico negativo	HeFH possível	c.666C>G (p.Cys222Trp) – <i>LDLR</i> ; ND
11341	Diagnóstico negativo	HeFH possível	-
11343	Diagnóstico negativo	HeFH possível	c.1291G>A (p.Ala431Thr) – <i>LDLR</i>
11344	Diagnóstico negativo	HeFH possível	-
11346	Diagnóstico negativo	HeFH possível	-
12003	HeFH provável	HeFH confirmada	-
12010	HeFH provável	HeFH provável	[EX2_EX3del] – <i>LDLR</i>
12013	Diagnóstico negativo	HeFH possível	c.1291G>A (p.Ala431Thr) – <i>LDLR</i>
12029	HeFH provável	HeFH provável	-
12040	HeFH provável	HeFH confirmada	[c.1216C>T (p.Arg406Trp)] + [EX8_EX12del] – <i>LDLR</i>
12041	Diagnóstico negativo	HeFH possível	c.2093G>T (p.Cys698Phe) – <i>LDLR</i>
12058	HeFH provável	HeFH possível	c.1775G>A (p.Gly592Glu) – <i>LDLR</i>
12060	Diagnóstico negativo	Diagnóstico negativo	-

SBRG, *Simon Broome Register Group*; DMP, *Dutch MEDPED*, HeFH, hipercolesterolemia heterozigótica; ND, não descrita.

Os dois grupos de critérios de diagnóstico para a HeFH foram, também, aplicados à amostra total de 609 indivíduos, que representava o total de casos-índex, incluídos no EPFH e com o estudo molecular relativo aos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9* já concluído. No total de 609 casos-índex, 236 pertenciam ao grupo pediátrico e 373 ao grupo de adultos, (tabela 3.10).

Tabela 3.10. Avaliação da amostra de 609 casos-índice do EPHF segundo os critérios de diagnóstico clínico para a hipercolesterolemia familiar

Diagnóstico HeFH	Grupo pediátrico		Grupo de adultos	
	Critérios SBRG	Critérios DMP	Critérios SBRG	Critérios DMP
	n	n	n	n
Diagnóstico negativo	133 (56,36%)	119 (50,42%)	204 (54,69%)	109 (29,22%)
HeFH possível	-	88 (37,29%)	-	184 (49,33%)
HeFH provável	103 (43,64%)	25 (10,59%)	159 (42,63%)	50 (13,41%)
HeFH confirmada	0	4 (1,70%)	10 (2,68%)	30 (8,04%)
	N=236 (100%)	N=236 (100%)	N=373 (100%)	N=373

HeFH, hipercolesterolemia familiar heterozigótica; SBRG, *Simon Broome Register Group*; DMP, *Dutch MEDPED*; n, o número de casos-índice; N, número total de casos-índice no grupo (236 no pediátrico e 373 no de adultos).

A caracterização molecular permitiu a comparação entre o diagnóstico clínico efectuado pelos dois conjuntos de critérios e o diagnóstico molecular em que se inferiu sobre a presença de alteração num dos três genes associados com a FH.

Através do estudo molecular dos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9* foi possível identificar 90 casos-índice do grupo pediátrico e 136 casos-índice do grupo de adultos com diagnóstico molecular de FH.

A aplicação dos critérios de diagnóstico clínico identificou casos-índice que foram classificados sem diagnóstico clínico de FH: no grupo pediátrico, 131 de acordo com os critérios SBRG e 118 de acordo com os critérios DMP; no grupo de adultos, 204 de acordo com os critérios SBRG e 110 de acordo com os critérios DMP. No entanto, estes indivíduos foram incluídos no EPHF porque apresentavam um fenótipo cuja severidade deve ser considerada e história familiar de hipercolesterolemia. De facto, nestes grupos de indivíduos com diagnóstico clínico negativo, foram identificados vários casos-índice com mutação patogénica nos genes *LDLR* e *APOB* associados ao aparecimento do fenótipo de FH: de acordo com os critérios SBRG, 26 no grupo pediátrico, representando cerca de 11% das 236 crianças (4% do total de 609 índice) e 44 no grupo de adultos, representando cerca de 12% dos 373 adultos (7% do total de 609 índice); de acordo com os critérios DMP, 21 no grupo pediátrico, representando cerca de 9% das 236 crianças (3% do total de 609 índice) e 18 no grupo de adultos, representando cerca de 5% dos 373 adultos (3% da amostra total de 609 índice) (tabelas 3.11 e 3.12).

Para comparação dos dois grupos de critérios estudados, juntaram-se na mesma classe os casos-índice com diagnóstico provável segundo os critérios SBRG e os

casos-índice com diagnóstico possível ou provável segundo os critérios DMP. Nos dois grupos de estudo, foram identificados casos-índice com diagnóstico possível/provável de HeFH: no grupo pediátrico 103 segundo os critérios SBRG e 113 segundo os critérios DMP; no grupo de adultos 159 segundo os critérios SBRG e 234 segundo os critérios DMP (tabela 3.10).

No grupo de casos-índice com diagnóstico possível/provável de FH, vários foram geneticamente identificados: no grupo pediátrico, 64, representando cerca de 27% das 236 crianças (11% do total de 609 índice), de acordo com os critérios SBRG, e 66, representando cerca de 28% das 236 (11% do total de 607 índice), de acordo com os critérios DMP; no grupo de adultos, 82, representando cerca de 22% dos 373 adultos (13% do total de 609 índice), segundo os critérios SBRG, e 89, representando cerca de 24% dos 373 adultos (15% do total de 609 índice), segundo os critérios DMP (tabelas 3.11 e 3.12).

Todos os casos-índice adultos que foram classificados como tendo diagnóstico clínico de HeFH confirmada segundo os critérios SBRG foram geneticamente identificados com FH (n=10, representando cerca de 3% dos 373 adultos) (tabela 3.12 e figura 3.8). Considerando os indivíduos com classificação de HeFH confirmada segundo os critérios DMP, foi possível identificar a presença de mutação patogénica em 75% das crianças e em 97% dos adultos que obedecem a esta classificação clínica (figuras 3.7 e 3.8).

Nas tabelas 3.11 e 3.12 encontra-se a comparação do diagnóstico clínico e do diagnóstico molecular, tendo em conta qual a alteração identificada no caso-índice.

Tabela 3.11. Comparação entre os diagnósticos clínico e molecular de FH para a amostra total de 236 crianças estudadas no EPHF

		Critérios SBRG			Critérios DMP		
		Diagnóstico negativo	HeFH provável	HeFH confirmada	Diagnóstico negativo	HeFH possível/provável	HeFH confirmada
Diagnóstico molecular negativo		107	39	0	98	47	1
Gene LDLR	Alteração <i>missense</i>	15	34	0	15	33	1
	Alteração <i>nonsense</i>	6	24	0	3	25	2
	Alteração <i>splicing</i>	3	4	0	1	6	0
	Homozigoto ou heterozigoto composto	0	0	0	0	0	0
Gene APOB		2	2	0	2	2	0
Gene PCSK9		0	0	0	0	0	0

SBRG, *Simon Broome Register Group*; DMP, *Dutch MEDPED*; HeFH, hipercolesterolemia familiar heterozigótica.

Tabela 3.12. Comparação entre os diagnósticos clínico e molecular de FH para a amostra total de 373 adultos estudados no EPHF

		Critérios SBRG			Critérios DMP		
		Diagnóstico negativo	HeFH provável	HeFH confirmada	Diagnóstico negativo	HeFH possível/provável	HeFH confirmada
Diagnóstico molecular negativo		160	77	0	91	145	1
Gene LDLR	Alteração missense	31	43	4	15	53	10
	Alteração nonsense	5	17	3	3	14	8
	Alteração splicing	5	11	1	0	13	4
	Homozigoto	1	2	0	0	2	1
	Heterozigoto composto	0	5	0	0	2	3
	Trizigoto	0	0	1	0	0	1
Gene APOB		2	3	0	0	4	1
Gene PCSK9		0	1	1	0	1	1

SBRG, *Simon Broome Register Group*; DMP, *Dutch MEDPED*; HeFH, hipercolesterolemia familiar heterozigótica.

Nas figuras 3.7 e 3.8 é possível observar a percentagem de indivíduos com e sem mutação em cada uma das classificações consideradas nos critérios para o diagnóstico clínico de FH.

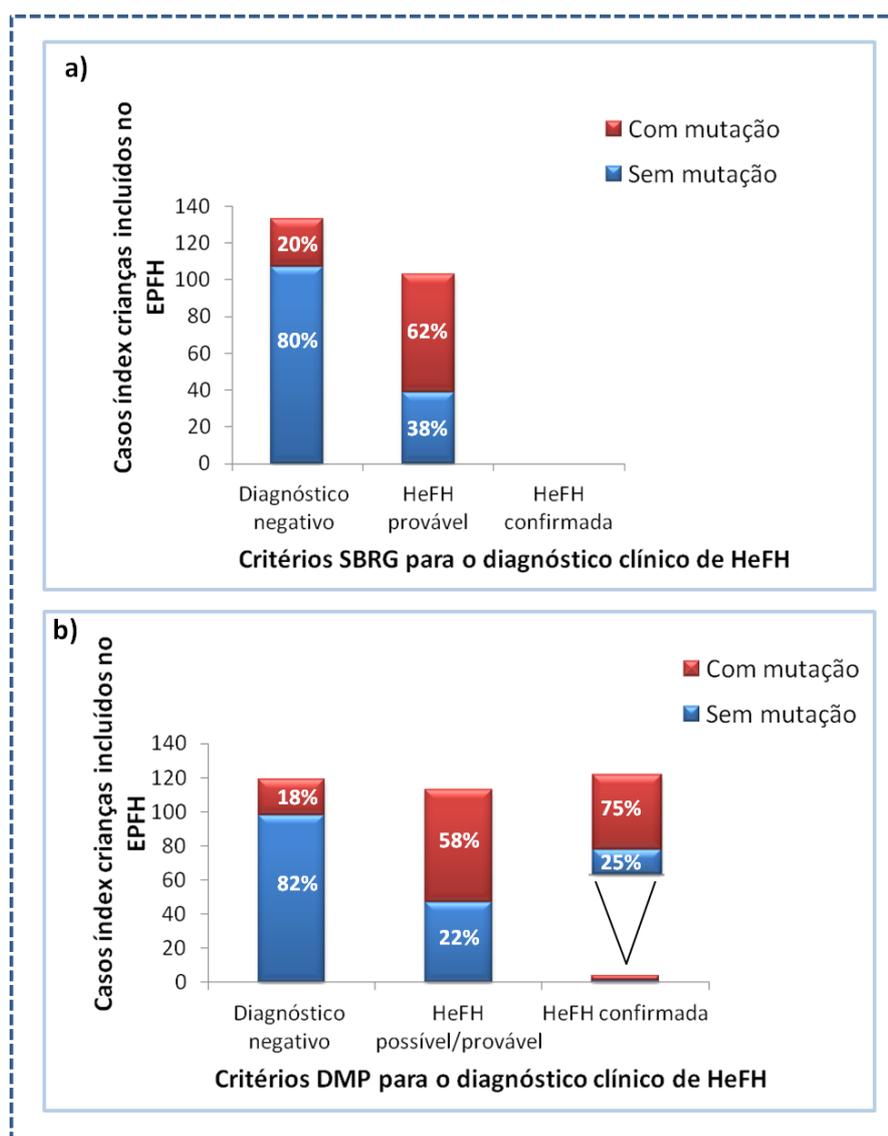


Figura 3.7. Comparação entre a avaliação dos critérios de diagnóstico de hipercolesterolemia familiar e os resultados do estudo molecular do grupo pediátrico. a) Aplicação dos critérios SBRG. b) Aplicação dos critérios DMP. DMP, *Dutch MEDPED*; EPFH, *Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar*; HeFH, hipercolesterolemia familiar heterozigótica; SBRG, *Simon Broome Register Group*.

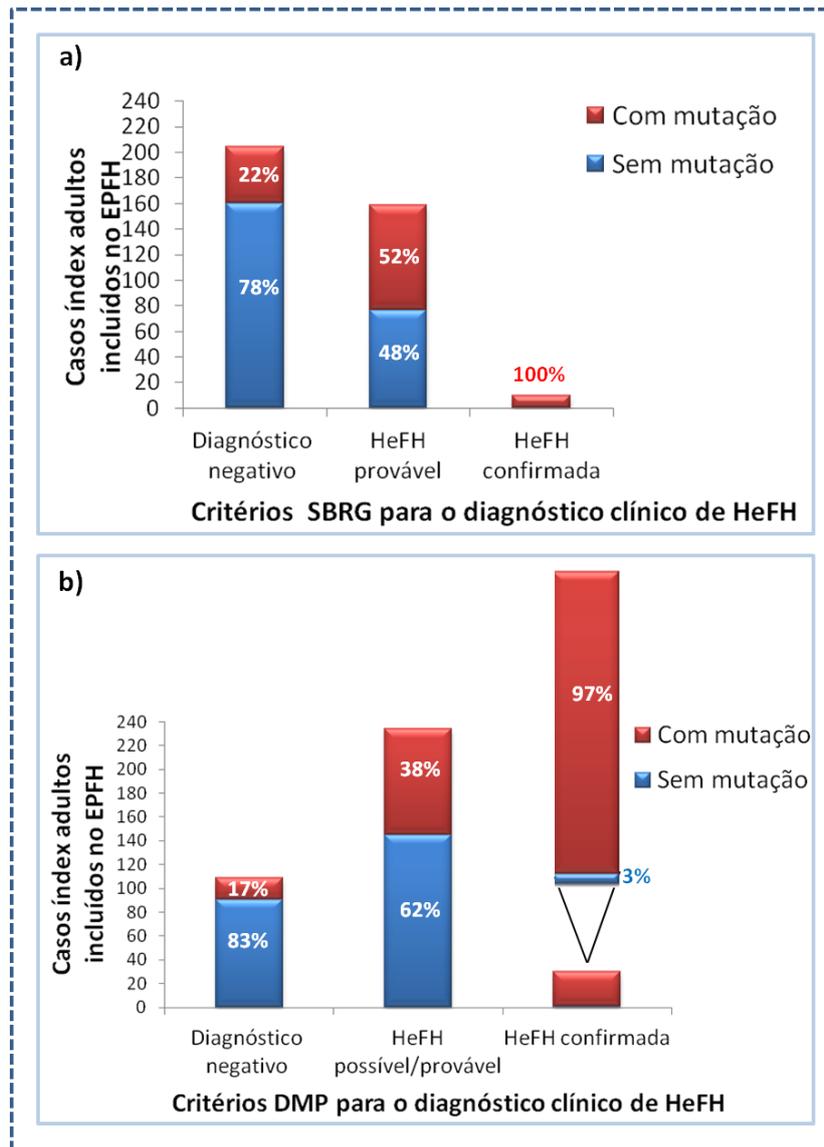


Figura 3.8. Comparação entre a avaliação dos critérios de diagnóstico de hipercolesterolemia familiar e os resultados do estudo molecular do grupo de adultos. a) Aplicação dos critérios SBRG. b) Aplicação dos critérios DMP. DMP, Dutch MEDPED; EPHF, Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar; HeFH, hipercolesterolemia familiar heterozigótica; SBRG, Simon Broome Register Group.

3.4. Estudo molecular de genes associados ao fenótipo de dislipidemia familiar combinada

No que diz respeito à FCHL, efectuou-se o estudo molecular dos genes *LPL*, *APOC2* e dos genes *APOC3*, *APOA4* e *APOA5* do cluster *APOA1/C3/A4/A5*.

3.4.1. Gene *LPL*

Na amostra de 5 casos-índice estudados, 4 foram identificados com alterações no gene *LPL*, o caso-índice do grupo pediátrico e 3 do grupo de adultos.

Na tabela 3.13 encontram-se as alterações detectadas através do estudo molecular do gene *LPL*.

Tabela 3.13. Estudo molecular do gene *LPL*

	Caso-índice	Alteração (nucleótido)	Localização	Gene	Alteração (proteína)	Tipo de alteração	REF
Grupo pediátrico	11280	c.332+73T>G	Intrão 6	<i>LPL</i>	-	<i>Splicing</i>	125
		c.1595C>G	Exão 9	<i>LPL</i>	p.Ser474X	<i>Nonsense</i>	126
Grupo de adultos	11324	c.332+73T>G	Intrão 6	<i>LPL</i>	-	<i>Splicing</i>	125
		c.1313+43T>C	Intrão 7	<i>LPL</i>	-	<i>Splicing</i>	125
		c.1338C>A	Exão 8	<i>LPL</i>	p.Thr388Thr	Sinónima	125
		c.1425+10G>A	3'UTR	<i>LPL</i>	-	<i>Splicing</i>	125
	12029	c.332+73T>G	Intrão 6	<i>LPL</i>	-	<i>Splicing</i>	125
		[c.1313+43T>C+ c.1313+43T>C]	Intrão 7	<i>LPL</i>	-	<i>Splicing</i> (homozigoto)	125
		c.1338C>A	Exão 8	<i>LPL</i>	p.Thr388Thr	Sinónima	125
		c.1595C>G	Exão 9	<i>LPL</i>	p.Ser474X	<i>Nonsense</i>	126
	12060	c.1425+10G>A	3'UTR	<i>LPL</i>	-	Substituição na região 3'UTR	125
		c.579G>A	Exão 3	<i>LPL</i>	p.Val135Val	Sinónima	125
		c.332+73T>G	Intrão 6	<i>LPL</i>	-	<i>Splicing</i>	125

REF, referência bibliográfica de onde a mutação foi descrita; UTR, *untranslated region*.

Todas as alterações encontradas já foram descritas anteriormente e nenhuma foi identificada como causadora de doença.

3.4.2. Gene *APOC2*

Na amostra de 5 casos-índice estudados, não foram identificadas alterações no gene *APOC2*.

3.4.3. Gene *APOC3*

Na tabela 3.14 encontram-se as alterações detectadas através do estudo molecular do gene *APOC3*.

Tabela 3.14. Estudo molecular do gene *APOC3*

	Caso-índice	Alteração (nucleótido)	Localização	Gene	Alteração (proteína)	Tipo de alteração	REF
Grupo pediátrico	11280	[3269G>T + 3269G>T]	3'UTR	<i>APOC3</i>	-	Substituição na região 3'UTR	N
Grupo de adultos	11268	c.102T>C	Exão 3	<i>APOC3</i>	p.Gly34Gly	Sinónima	127
		[3269G>T + 3269G>T]	3'UTR	<i>APOC3</i>	-	Substituição na região 3'UTR	N
	11324	c.102T>C	Exão 3	<i>APOC3</i>	p.Gly34Gly	Sinónima	127
		c.179+62T>A	Intrão 3	<i>APOC3</i>	-	<i>Splicing</i>	127
		3269G>T	3'UTR	<i>APOC3</i>	-	Substituição na região UTR	N
	12029	c.102T>C	Exão 3	<i>APOC3</i>	p.Gly34Gly	Sinónima	127
		3238C>G	3'UTR	<i>APOC3</i>	-	Substituição na região 3'UTR	128
		3269G>T	3'UTR	<i>APOC3</i>	-	Substituição na região 3'UTR	N
	12060	c.102T>C	Exão 3	<i>APOC3</i>	p.Gly34Gly	Sinónima	127
		c.179+57T>A	Intrão 3	<i>APOC3</i>	-	<i>Splicing</i>	127
c.179+62T>A		Intrão 3	<i>APOC3</i>	-	<i>Splicing</i>	127	

REF, referência bibliográfica de onde a mutação foi descrita; UTR, *untranslated region*.

Na amostra de 5 casos-índice estudados, todos foram identificados com alterações no gene *APOC3*.

As alterações já descritas representam polimorfismos e a alteração não descrita ocorre na região 3'UTR, podendo ter um efeito ao nível da regulação gene.

3.4.4. Gene *APOA4*

Na tabela 3.15 encontram-se as alterações encontradas através do estudo molecular do gene *APOA4*.

Tabela 3.15. Estudo molecular do gene *APOA4*

	Caso-índice	Alteração (nucleótido)	Localização	Gene	Alteração (proteína)	Tipo de alteração	REF
Grupo pediátrico	11280	[c.87G>A + c.87G>A]	Exão 2	<i>APOA4</i>	p.Thr29Thr	Sinónima (homozigoto)	129
		[c.222T>C + c.222T>C]	Exão 3	<i>APOA4</i>	p.Gly74Gly	Sinónima (homozigoto)	N
		c.231G>A	Exão 3	<i>APOA4</i>	p.Gln77Gln	Sinónima	N
		[c.440G>A + c.440G>A]	Exão 3	<i>APOA4</i>	p.Ser147Asn	<i>Missense</i> (homozigoto)	129
Grupo de adultos	11268	c.87G>A	Exão 2	<i>APOA4</i>	p.Thr29Thr	Sinónima	129
		c.222T>C	Exão 3	<i>APOA4</i>	p.Gly74Gly	Sinónima	N
		c.231G>A	Exão 3	<i>APOA4</i>	p.Gln77Gln	Sinónima	N
		c.440G>A	Exão 3	<i>APOA4</i>	p.Ser147Asn	<i>Missense</i>	129
	11324	c.87G>A	Exão 2	<i>APOA4</i>	p.Thr29Thr	Sinónima	129
		[c.222T>C + c.222T>C]	Exão 3	<i>APOA4</i>	p.Gly74Gly	Sinónima (homozigoto)	N
		c.231G>A	Exão 3	<i>APOA4</i>	p.Gln77Gln)	Sinónima	N
		c.440G>A	Exão 3	<i>APOA4</i>	p.Ser147Asn	<i>Missense</i>	129
	12029	c.87G>A	Exão 2	<i>APOA4</i>	p.Thr29Thr	Sinónima	129
		[c.222T>C + c.222T>C]	Exão 3	<i>APOA4</i>	p.Gly74Gly	Sinónima (homozigoto)	N
		c.231G>A	Exão 3	<i>APOA4</i>	p.Gln77Gln	Sinónima	N
		c.440G>A	Exão 3	<i>APOA4</i>	p.Ser147Asn	<i>Missense</i>	129
	12060	c.222T>C	Exão 3	<i>APOA4</i>	p.Gly74Gly	Sinónima	N
		c.231G>A	Exão 3	<i>APOA4</i>	p.Gln77Gln	Sinónima	N
		c.440G>A	Exão 3	<i>APOA4</i>	p.Ser147Asn	<i>Missense</i>	129

REF, referência bibliográfica de onde a mutação foi descrita.

Na amostra de 5 casos-índice estudados, todos foram identificados com alterações no gene *APOA4*.

As alterações que foram detectadas e que não se encontram descritas na literatura representam alterações sinónimas. A alteração *missense* c.440G>A (p.Ser147Asn) já foi descrita como um polimorfismo.

3.4.5. Gene *APOA5*

Na tabela 3.16 encontram-se as alterações encontradas através do estudo molecular do gene *APOA5*.

Tabela 3.16. Estudo molecular do gene *APOA5*

	Caso-índice	Alteração (nucleótido)	Localização	Gene	Alteração (proteína)	Tipo de alteração	REF
Grupo pediátrico	11280	[6G>A + 6G>A]	5'UTR	<i>APOA5</i>	-	Substituição na região 5'UTR	N
Grupo de adultos	11268	6G>A	5'UTR	<i>APOA5</i>	-	Substituição na região 5'UTR	N
		c.56C>G	Exão 2	<i>APOA5</i>	p.Ser42Trp	<i>Missense</i>	130
		c.132C>A	Exão 2	<i>APOA5</i>	p.Ile67Ile	Sinónima	131
	11324	[6G>A + 6G>A]	5'UTR	<i>APOA5</i>	-	Substituição na região 5'UTR	N
	12029	6G>A	5'UTR	<i>APOA5</i>	-	Substituição na região 5'UTR	N
12060	[6G>A + 6G>A]	5'UTR	<i>APOA5</i>	-	Substituição na região 5'UTR	N	

REF, referência bibliográfica de onde a mutação foi descrita; UTR, *untranslated region*.

Na amostra de 5 casos-índice estudados, todos foram identificados com alterações no gene *APOA5*.

A única alteração já descrita, detectada neste gene, c.56C>G (p.Ser42Trp), trata-se de uma *missense* que foi considerada um polimorfismo. A alteração não descrita ocorre na região 5'UTR, podendo ter um efeito ao nível da regulação gene.

Capítulo 4. Discussão

A hipercolesterolemia e a hipertrigliceridemia são dois factores independentes que contribuem para o aumento do risco cardiovascular. Como tal, é importante o estudo de doentes que apresentem estes factores.

4.1 Hipercolesterolemia familiar

Neste trabalho estudou-se uma amostra constituída por 40 casos-índice referenciados por suspeita de hipercolesterolemia familiar (FH), 17 crianças e 23 adultos.

No grupo pediátrico, em que a idade média é de aproximadamente 11 anos, existem 2 crianças que já tomam medicação para a hipercolesterolemia. Na verdade, o perfil bioquímico deste grupo (tabela I.1) demonstra já um elevado risco cardiovascular.

No grupo de adultos, em que a idade média é de aproximadamente 42 anos, 1/4 dos indivíduos já sofreu um evento cardiovascular em idade prematura (média de idade do 1º evento é de 47 anos), sendo esta uma característica de doentes com FH. Existem outros factores que aumentam o risco cardiovascular dos adultos estudados, como o valor do índice de massa corporal indicativo de excesso de peso, o facto de 10% possuírem diabetes, 45% serem hipertensos e a prática de estilos de vida menos saudáveis (38% são fumadores, 24% admitem consumir álcool e apenas 30% praticam regularmente exercício físico, com uma média de cerca de 4 vezes por semana). Neste grupo, apenas 2 indivíduos não se encontram em tratamento farmacológico para a hipercolesterolemia, havendo 2 que fazem terapêutica de LDL aferese, adicional à terapêutica com fármacos.

Em termos de presença de xantomas, 2 casos-índice (11343 e 12003) possuem *arcus cornealis* e outro indivíduo (12013) foi referenciado como tendo xantomas mas sem informação sobre o tipo de xantomas. A história familiar revela que não se conhece nenhum familiar dos casos-índice com xantomas. A fraca prevalência de indivíduos com xantomas não deve afastar a hipótese de presença de FH, uma vez que o fenótipo desta doença em Portugal parece ser menos severo do que no resto da Europa, sendo poucos os casos em que ocorrem xantomas.⁶⁰ Na verdade, em Portugal, a percentagem de xantomas tendinosos identificados é reduzida, o que advém do facto destes sinais físicos não serem devidamente diagnosticados em Portugal ou de existir uma menor susceptibilidade dos doentes portugueses para o desenvolvimento de xantomas tendinosos.

Em ambos os grupos existem indivíduos que, apesar de terem sido referenciados ao Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar (EPHF) e estudados como

casos-índice, não reúnem todos os critérios clínicos de diagnóstico para a FH. A análise da aplicação dos critérios de diagnóstico clínico de FH à amostra de 40 casos-índice revelou que 59% das 17 crianças não obedecem aos critérios de diagnóstico clínico de HeFH (hipercolesterolemia familiar heterozigótica) desenvolvidos pelo *Simon Broome Register Group* (critérios SBRG), indicando que a maioria das crianças não reúne estes critérios de diagnóstico. No que se refere aos critérios desenvolvidos pelo programa *Dutch MEDPED* (critérios DMP), 47% das 17 crianças são classificadas com diagnóstico negativo de HeFH, sendo excluídas menos crianças do que com os SBRG. Nos adultos, os critérios SBRG excluem, também, o diagnóstico clínico da maioria dos casos-índice (52% dos 23 adultos) enquanto os critérios DMP já classificam com diagnóstico clínico positivo a maioria dos casos-índice estudados (70% dos 23 adultos).

Quando se estende a aplicação dos dois critérios a todos os casos-índice já incluídos no EPHF, retiram-se conclusões semelhantes. Do total de 609 casos-índice já incluídos no EPHF, 337 não reúnem os critérios SBRG e 228 não reúnem os critérios DMP. Apenas na aplicação dos critérios DMP ao grupo de adultos é que se verificou uma maioria de indivíduos com diagnóstico clínico de HeFH (63%), o que indica que os casos-índice referenciados pelos médicos tendem a não obedecer estritamente aos critérios mais utilizados a nível mundial, o que pode advir da tal presença de um fenótipo menos severo de FH em Portugal. De acordo com os resultados, os critérios SBRG rejeitam mais indivíduos do que os critérios DMP, o que pode dever-se ao facto deste último conjunto de critérios ter por base um sistema numérico, em que as várias características que conferem pontos são cumulativas, formando um *score* total (tabela 1.3). Por exemplo, um indivíduo que apresente um valor de c-LDL (colesterol associado às lipoproteínas de baixa densidade) de 191 mg/dL apresenta um diagnóstico clínico de HeFH possível, segundo os critérios DMP, uma vez que esta informação única acerca do valor de c-LDL corresponde a um *score* de 3 (tabela 1.3). Pelos critérios SBRG, a informação do valor de c-LDL não conduz, por si só, a um diagnóstico positivo de HeFH, sendo necessário ter acesso a outras informações, nem sempre disponíveis, sobre o próprio indivíduo ou sobre a sua história familiar para a obtenção deste diagnóstico positivo (tabela 1.2).

No grupo pediátrico, ambos os conjuntos de critérios classificam a maioria das crianças com diagnóstico negativo, apesar dos critérios SBRG estipularem limites de valores de CT (colesterol total) e de c-LDL distintos para crianças menores de 16 anos e para adultos e dos critérios DMP atribuírem um *score* a familiares do caso-índice em primeiro grau que sejam crianças menores de 18 anos com um valor de c-LDL acima do percentil 95. Estes resultados alertam para a necessidade da elaboração de parâmetros específicos para as crianças, nomeadamente da população portuguesa, e demonstram que o diagnóstico clínico não é suficiente para a identificação de indivíduos com FH.

4.1.1. Diagnóstico genético de hipercolesterolemia familiar

O estudo dos 40 casos-índice incluiu o estudo molecular dos 3 genes associados ao diagnóstico molecular de FH: *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*. Dos 40 casos-índice estudados, 37,5% (n=15) apresentam mutação patogénica num destes genes, 35% (n=14) no gene *LDLR* e apenas 2,5% (n=1) no gene *APOB*. Estes resultados coincidem com o esperado, uma vez que as alterações no gene *LDLR* são a causa genética mais comum de FH e as mutações no gene *APOB* representam aproximadamente 2% de todos os casos com FH já identificados pelo EPHF, sendo uma causa rara de FH em Portugal. Em 13 anos de existência do EPHF apenas foi identificada em 2 casos-índice e num 1 familiar uma mutação no gene *PCSK9*, o que demonstra a raridade desta causa de FH.^{55,59} Nos 18 casos-índice onde foi detectada uma mutação, foram identificados vários tipos de alterações, sendo as *missense* as que se encontram em maior número.

As mutações encontradas nos 15 casos-índice, 6 crianças e 9 adultos, já foram descritas como associadas à FH, pelo que foi identificada a causa genética da hipercolesterolemia destes indivíduos, que representam 37,5% da amostra estudada. No entanto, o grande rearranjo [EX11_EX12del] ainda não tinha sido encontrado em Portugal. A deleção destes dois exões já descrita pode resultar num rearranjo com *endpoints* diferentes dos existentes no rearranjo agora detectado num caso-índice português mas não foi possível fazer esta avaliação.

Em 3 casos-índice (7,5% da amostra) foram detectadas alterações no gene *LDLR* que não se encontram descritas e que não obedecem aos critérios de classificação de mutações com efeito causador de doença, enumerados por Cotton & Scriver (1998).¹⁰⁷ Estas 3 alterações *missense* necessitam de mais estudos que avaliem a sua patogénica, como a avaliação de frequência destas alterações, estudos familiares e estudos funcionais de expressão do gene *LDLR*.

❖ Caso-índice 11215

O caso-índice 11215 é uma menina de 12 anos, cuja informação sobre o seu perfil lipídico indica valores elevados de CT e de c-LDL (365 mg/dL e 243 mg/dL, respectivamente). No entanto, as determinações bioquímicas realizadas no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), no âmbito deste estudo, revelaram uma clara descida destes valores (CT para 195 mg/dL e cLDL para 109 mg/dL) a qual não se sabe se foi devida à toma de medicação, uma vez que não foi disponibilizada informação sobre a existência de terapêutica. A falta de informação clínica é um dos grandes problemas que existem no estudo de doenças genéticas.

Nesta criança foi detectada a alteração c.2291T>C (p.Ile764Thr) no exão 15 do gene *LDLR*, por sequenciação automática. A substituição de uma Timina por uma Citosina na posição c.2291 leva à troca do aminoácido Isoleucina pelo aminoácido

Treonina na posição 764 da proteína. Esta alteração ainda não se encontra descrita pelo que são necessários mais estudos para avaliar a sua patogenicidade. Neste estudo foi avaliada esta alteração em termos dos critérios que devem ser tidos em conta para que uma alteração possa ser considerada patogénica.¹⁰⁷ O aminoácido que é substituído não é um aminoácido conservado entre espécies, falhando a alteração neste critério. No entanto, o estudo familiar revelou a presença desta alteração no pai e na avó desta criança, que apresentam fenótipo de FH, e a ausência nos familiares que não apresentam fenótipo de FH, verificando-se a co-segregação fenótipo/genótipo. O resultado da avaliação de um painel de 100 normolipidémicos revelou que a alteração não se encontrava presente nestes indivíduos, podendo ser considerada rara.

A avaliação *in silico* da previsão do efeito desta alteração revelou que deve tratar-se de um polimorfismo, sendo considerada tolerável e benigna. Este resultado está de acordo com o facto da existência de estudos que indicam que a eliminação do exão 15 do gene *LDLR* não altera a função do receptor das LDL.¹²⁰ No entanto só a realização de mais estudos, nomeadamente de estudos funcionais, poderá confirmar esta previsão.

❖ Caso-índice 11230

No caso-índice 11230, de 35 anos, as determinações bioquímicas no INSA revelaram um perfil lipídico com valores de CT (290 mg/dL) e de c-LDL (224 mg/dL) elevados. Esta doente encontrava-se a realizar terapêutica combinada de estatina e ezetimiba antes da realização destas determinações e, embora os seus valores lipídicos não tenham atingido os valores normais, o valor de CT desceu, sendo o seu valor de 350 mg/dL, antes do tratamento.

Este caso-índice apresenta a mutação mais comum no gene *APOB*, sendo o único indivíduo da amostra de 40 indivíduos identificado com uma alteração neste gene. A mutação identificada, c.10708G>A (p.Arg3527Gln), foi descrita em 1989 por Soria *et al.*⁷¹ e consiste na substituição de uma Glicina por uma Adenina na posição c.10708 do gene *APOB*, o que se traduz na mudança do aminoácido Arginina para o aminoácido Glutamina. As mutações no gene *APOB* causam a deficiência familiar em apolipoproteína B (FDB) e não afectam directamente o receptor das LDL mas sim o ligando, a apolipoproteína B (apoB), reduzindo a afinidade das LDL para o seu receptor. Assim, o fenótipo tem tendência a ser menos severo do que o que advém de mutações no gene *LDLR*, uma vez que a remoção do colesterol pode continuar a efectuar-se através das outras lipoproteínas do plasma que possuem outros ligandos, como por exemplo as IDL. No entanto, a interacção com o ambiente faz com que exista também uma enorme diversidade de fenótipos, pelo que nem sempre se pode tirar correlações lineares entre tipo de mutação e agressividade do fenótipo.

❖ Casos-índice 11247, 11311, 11343 e 12013

O caso-índice 11247 é um adulto de 33 anos que apresentava um valor de CT de 317 mg/dL e um valor de c-LDL de 283 mg/dL, os quais foram reduzidos, respectivamente, para 241 mg/dL e 154 mg/dL, com a toma de estatina.

O caso-índice 11311 é uma menina de 7 anos com 236 mg/dL de CT e 178 mg/dL de c-LDL, que não efectua medicação e que pertence a uma família com história de ocorrência de DCV.

O caso-índice 11343 já apresentou um valor de CT acima de 420 mg/dL que foi reduzido para 219 mg/dL, na presença de terapêutica combinada de estatina e ezetimiba. Em termos de sinais físicos, tinha *arcus cornealis*.

O caso-índice 12013, uma senhora de 36 anos, encontrava-se sob medicação de estatinas quando foi realizada a sua caracterização clínica para este estudo. Apesar de estar sob terapêutica, o seu valor de CT aumentou, continuando acima dos 350 mg/dL, o que pode revelar que o indivíduo não segue a toma da medicação ou que o tipo de estatina ou a dosagem não estão a ser eficazes. A informação clínica acerca deste caso-índice indica a presença de xantomas, não referindo, no entanto, qual o tipo de xantomas presente.

Nestes 4 casos-índice foi detectada a presença da mutação c.1291G>A (p.Ala431Thr), descrita em 1990 por Hobbs *et al.*¹¹² Esta substituição pontual de uma Glicina por uma Adenina na posição c.1291 do gene *LDLR* leva a que a proteína final tenha o aminoácido Treonina em vez da Alanina, na posição 431. Esta mutação foi a mais encontrada neste estudo, o que está de acordo com o facto de ser a mais comum em Portugal, onde representa 13% do total de mutações encontradas.⁵¹

A mutação identificada nestes casos-índice ocorre no exão 9 do gene *LDLR* que integra a região do gene que codifica para o domínio semelhante à molécula precursora do factor de crescimento epidérmico (EGF). Este domínio proteico funciona ao nível do direccionamento do domínio de ligação do receptor relativamente ao ligando e tem um papel essencial na reciclagem do receptor das LDL, uma vez que medeia a dissociação entre o receptor e o ligando, no meio ácido do endossoma. A alteração de um aminoácido de carácter hidrófobo, a Glicina, para outro de carácter polar, a Adenina, faz com que a proteína tenha outro comportamento no meio ácido do endossoma. Estudos funcionais desta mutação, já descritos, revelaram que esta alteração de aminoácido faz com que falhe a libertação do ligando apoB no ambiente ácido do endossoma. Assim, o receptor fica retido intracelularmente e não consegue voltar a dirigir-se para a superfície acabando por ser degradado. Estes estudos funcionais demonstraram que a actividade deste receptor alterado é aproximadamente 20% da actividade do receptor *LDLR* normal.^{112,132,133}

A técnica de dHPLC é utilizada como um método de *screening*, sendo um método complementar à sequenciação, que permite detectar a presença de alguma alteração no exão em estudo. A identificação da mutação detectada tem de ser posteriormente realizada através da sequenciação automática da mesma amostra de DNA. Neste trabalho, a utilização deste método de rastreio permitiu a obtenção de resultados de forma rápida e simples. Para além disso, o método de dHPLC foi bastante útil em termos de pesquisa de alterações no exão 9 do LDLR, uma vez que a detecção de uma alteração neste exão nem sempre estava de acordo com os resultados de sequenciação automática, que não conseguiam revelar a presença da mutação. Este facto alertou para a necessidade de desenho de novos *primers*, representando uma optimização dos métodos que se utilizam no grupo de investigação.^{134,135}

❖ Casos-índice 11258 e 11269

O caso-índice 11258 é uma menina de 4 anos com valores lipídicos que sugerem a presença de FH (CT=333 mg/dL; c-LDL=260 mg/dL).

O caso-índice 11269 é uma jovem de 19 anos que foi estudada pela presença de hipercolesterolemia (CT=356 mg/dL e c-LDL=281 mg/dL) e por a sua mãe de 44 anos já ter sofrido um evento cardiovascular.

Nestes 2 casos-índice foi identificado o grande rearranjo [Pr_EX2del+EX8_EX12del], pela técnica de MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*). Esta técnica identificou a deleção de 7 exões, verificando-se simultaneamente a deleção do promotor do gene *LDLR* e dos exões 1, 2 e 8-12. A deleção do promotor e dos exões 1 e 2 do gene *LDLR* foi primeiramente descrita em 1996 por Garuti *et al.* em estudos na população italiana.¹³⁶ Porém, foi no estudo publicado em 2008 por Bourbon *et al.* que a deleção Pr_EX2del foi identificada pela primeira vez na população portuguesa, em 8 indivíduos da mesma família, que também possuíam a deleção dos exões 8 a 12 do gene *LDLR*, verificando-se o grande rearranjo [Pr_EX2del+EX8_EX12del].⁵¹ Esta grande deleção não permite a formação de uma proteína, uma vez que é delectada a região promotora do gene, necessária para ocorrer a transcrição.

❖ Caso-índice 11326

O caso-índice 11326 é um menino de 12 anos que apresenta um CT de 303 mg/dL e um c-LDL de 229 mg/dL.

Neste caso-índice foi identificada a mutação c.619_639del (p.Gly207_Ser213del) por sequenciação automática do exão 4 do gene *LDLR*. Assim, a causa genética da hipercolesterolemia deste indivíduo resulta da presença desta mutação *in-frame* que, apesar de ser uma deleção, mantém a grelha de leitura que codifica para o receptor das LDL. Esta mutação, descrita em 2008 por Bourbon *et al.*⁵¹, consiste numa deleção de 21

nucleótidos no interior do exão 4, afectando o domínio de ligação do receptor ao seu ligando, um dos domínios mais importantes da proteína.

❖ **Caso-índice 11340**

O caso-índice 11340 trata-se de um indivíduo do sexo masculino que foi referenciado ao EPFH com informação de presença de um valor de 407 mg/dL de CT e de um valor de 294 de c-LDL. A terapêutica combinada de estatina e ezetimiba resultou na redução destes valores para 228 mg/dL e 145 mg/dL, respectivamente.

A sequenciação do exão 4 do gene *LDLR* identificou a alteração c.666C>G (p.Cys222Trp), neste caso-índice. Esta alteração que altera a região do gene que codifica para o domínio proteico de ligação do receptor LDLR ao ligando ainda não se encontra descrita, pelo que tem de ser avaliada segundo os critérios publicados por Cotton & Scriver em 1998 para se determinar se se trata de uma mutação patogénica.¹⁰⁷ A alteração c.666C>G (p.Cys222Trp) consiste na substituição do nucleótido Citosina pelo nucleótido Guanina na posição c.666 do gene *LDLR*, ocorrendo a troca do aminoácido Cisteína pelo aminoácido Triptofano na posição 222 da proteína. A cisteína, o aminoácido de carácter nucleofílico afectado por esta alteração, é conservada entre espécies, sendo substituída por um aminoácido de carácter aromático, o que pode contribuir para que esta alteração tenha um efeito potencialmente patogénico. Como, até à data, não foram enviadas amostras de familiares deste caso-índice, não foi ainda possível realizar o estudo familiar para avaliar a presença desta alteração *missense* e a co-segregação fenótipo/genótipo nesta família.

A avaliação, *in silico*, da previsão do efeito desta alteração revelou que as três plataformas a definem como prejudicial e provavelmente patogénica. No entanto, a patogenicidade desta alteração deve ser avaliada através da realização de estudos funcionais para que se possa inferir sobre a possibilidade de ser considerada uma mutação com efeito causador de FH.

❖ **Casos-índice 11349 e 12058**

O caso-índice 11349 é um jovem de 16 anos que, para além dos valores bioquímicos sem medicação (CT=251 mg/dL e c-LDL=196 mg/dL) que indicam uma possível presença de FH, apresenta história familiar de DCV.

O caso-índice 12058 é um indivíduo do sexo masculino, de 49 anos, que se encontra a realizar tratamento de estatina e ezetimiba para controlo dos níveis lipídicos e como medida de prevenção, uma vez que o seu pai teve um enfarte agudo do miocárdio (EAM) à idade prematura de 48 anos. Nas determinações bioquímicas efectuadas no INSA, este indivíduo revelou um valor de CT de 202 mg/dL e um valor de c-LDL de 139 mg/dL.

Nestes dois indivíduos foi detectada a causa genética da hipercolesterolemia, tendo sido identificada a mutação c.1775G>A (p.Gly592Glu), já descrita como associada à presença de FH. Esta mutação descrita em 1992 por Hobbs *et al.*¹¹³ consiste na substituição de uma Guanina por uma Adenina na posição c.1775 do gene *LDLR*, o que se traduz na troca de um aminoácido Glicina por um Glutamina na posição 592 da proteína. A mutação identificada ocorre no exão 12 do gene *LDLR*, afectando o domínio proteico semelhante à molécula precursora do factor de crescimento epidérmico (EGF). Hobbs *et al.* verificaram que a actividade do receptor das LDL, em caso de heterozigotia composta em que se verifica a presença da mutação c.1775G>A (p.Gly592Glu), é inferior a 5% da actividade normal desta proteína.¹¹³

❖ Caso-índice 12010

O caso-índice 12010 é um adulto de 47 anos que foi referenciado ao EPFH por suspeita clínica de FH por apresentar um valor de CT de 358 mg/dL, sofrer de angina e ter tido um EAM aos 39 anos, tendo sido também submetido a uma angioplastia aos 47 anos. A história familiar revela a presença de hipercolesterolemia e DCV no pai deste caso-índice.

A mutação [EX2_EX3del] foi identificada neste caso-índice, através da pesquisa de rearranjos no gene *LDLR* pela técnica de MLPA. Este rearranjo consiste numa grande deleção dos exões 2 e 3 do gene *LDLR*, tendo já sido encontrado anteriormente em 3 indivíduos portugueses da mesma família, como descrito por Medeiros *et al.* em 2010.⁶⁰ A deleção faz com que parte do domínio de ligação do receptor ao ligando esteja eliminado, o que pode fazer com que a proteína nem chegue à superfície celular, sendo logo degradada.

❖ Caso-índice 12021

O caso-índice 12021 é uma menina de 11 anos que apresenta valores lipídicos elevados (CT=248 mg/dL e c-LDL=174 mg/dL).

Neste caso-índice foi identificada a alteração c.90C>T (p.Asn30Asn) que se trata de uma substituição de uma Citosina por uma Timina no exão 2 do gene *LDLR*, na posição c.90. Esta troca de nucleótido não muda o aminoácido que é traduzido, resultando numa alteração sinónima. Apesar de esta alteração já ter sido descrita em 2002 por Lind *et al.*¹¹⁴ como sendo um polimorfismo, não foram realizados estudos funcionais que avaliassem a sua patogenicidade. Aliás, já foi descrito por Bourbon *et al.* que alterações pontuais sinónimas, apesar de parecerem não afectar a proteína que é produzida, podem ter algum efeito sobre o processo de *splicing* do mRNA.¹¹⁶ Este possível efeito no processo de remoção dos intrões e de junção dos exões, que permite a passagem de pré-mRNA para mRNA, poderá fazer com que a proteína produzida não seja funcional.¹³⁷

A realização de estudos de expressão do mRNA de casos-índice referenciados ao EPFH, que possuem alterações pontuais sinónimas, como é o caso desta menina, é importante para que se possa esclarecer sobre a possibilidade dos seus fenótipos serem causados por alterações deste tipo.

❖ Caso-índice 12025

O caso-índice 12025 é uma menina de 4 anos que apresenta um fenótipo com valores lipídicos elevados. Apesar de ser muito nova, a sua hipercolesterolemia já é grave, sendo importante realizar o diagnóstico molecular de FH. O seu perfil lipídico indica um valor de 387 mg/dL de CT e um valor de 313 mg/dL de c-LDL, havendo história de hipercolesterolemia num familiar em segundo grau.

O estudo molecular identificou a presença do grande rearranjo [EX11_EX12del] neste caso-índice, verificando-se a deleção dos exões 11 e 12 do gene *LDLR*, através da técnica de MLPA. Esta grande deleção de 2 exões nunca tinha sido identificada na população portuguesa porém Bertolini *et al.* descreveram, em 1995, a identificação de um grande rearranjo que consiste na deleção destes mesmos exões, na população italiana.¹¹⁵ Apesar de grandes rearranjos semelhantes já terem sido descritos noutras populações, como os limites das deleções identificadas (*endpoints*) podem ser diferentes, é possível que o grande rearranjo identificado na amostra portuguesa deste estudo seja diferente do que já se encontrava anteriormente descrito. Também não foi possível na amostra deste trabalho verificar os *endpoints*.

O grande rearranjo [EX11_EX12del] identificado deverá ter efeito sobre parte do gene *LDLR* que codifica para o domínio semelhante à molécula precursora do factor de crescimento epidérmico (EGF), o que deve resultar na formação de uma proteína truncada. Os receptores truncados, aos quais faltam domínios essenciais à sua função, são rapidamente degradados intracelularmente.^{103,104} Segundo o artigo de 1995 de Bertolini *et al.*, a forma heterozigótica do rearranjo que já se encontra descrito resulta num receptor das LDL com apenas 40% da actividade do receptor LDLR normal.¹¹⁵

❖ Caso-índice 12026

O caso-índice 12026 é um menino de 14 anos em que se verificou a redução dos valores de CT e de c-LDL através da toma de estatina (CT reduziu de 243 mg/dL para 167 mg/dL e c-LDL reduziu de 195 mg/dL para 119 mg/dL).

Este caso-índice foi identificado com a mutação c.818-2A>G, detectada através da sequenciação do exão 6 do gene *LDLR*. Esta mutação foi descrita em 2009 num artigo de Bourbon *et al.*, onde se alerta para a importância de realizar estudos funcionais antes de reportar a presença ou ausência de uma mutação que afecta um local de *splicing* no gene *LDLR*, para efeitos de diagnóstico.¹¹⁶ Segundo este artigo, esta alteração altera a sequência conservada AG no terminal 3' do intrão (*acceptor site*),

necessária para que ocorra o *splicing*. A alteração AG para GG nesta região do intrão afecta o *splicing*, sendo patogénica.¹¹⁶

❖ Caso-índice 12037

O caso-índice 12037 é um jovem de 16 anos, cujas determinações bioquímicas revelaram os seguintes valores: 323 mg/dL de CT; 232 mg/dL de c-LDL.

O estudo molecular identificou a alteração c.1802A>T (p.Asp601Val) por sequenciação do exão 12 do gene *LDLR*. Esta alteração consiste na substituição de uma Adenina por uma Timina na posição c.1802, o que se traduz na mudança de um Ácido aspártico para uma Valina na sequência de aminoácidos do receptor das LDL. Esta alteração não se encontra ainda descrita, pelo que têm de ser realizados mais estudos para se avaliar a sua patogénica, nomeadamente, de avaliação da sua frequência e funcionais. A alteração *missense*, afecta um aminoácido que é conservado entre espécies, sendo esta uma das condições necessárias para que a alteração seja considerada uma mutação com efeito causador de doença.¹⁰⁷ Para além disso, a mudança é dum aminoácido com carácter ácido para um de carácter hidrófobo, mudando as características bioquímicas da proteína que se forma.

O estudo familiar, realizado por outro membro da equipa de investigação, pesquisou a alteração c.1802A>T (p.Asp601Val) nos pais do caso-índice, tendo identificado a sua presença na mãe. No entanto, será necessário estudar mais familiares para que se complementem as informações acerca da co-segregação fenótipo/genótipo na família.

As 3 plataformas utilizadas para prever o efeito desta alteração revelaram uma elevada probabilidade de ser causadora de doença, havendo fortes possibilidades de ser patogénica.

❖ Caso-índice 12040

O caso-índice 12040 trata-se de uma senhora adulta de 61 anos, referenciada ao EPHF com um valor de 587 mg/dL de CT e um valor de 401 mg/dL de c-LDL. Na presença de terapêutica combinada de estatina, ezetimiba e LDL aferese, estes valores reduziram, respectivamente, para 389 mg/dL e 293 mg/dL. Para além deste perfil lipídico preocupante, foi referida a presença de DCV prematura, verificando-se uma claudicação aos 50 anos e diagnóstico clínico de angina.

A mutação c.1216C>T (p.Arg406Trp) foi identificada por sequenciação do exão 9 do gene *LDLR*. Esta mutação, já foi descrita como sendo potencialmente patogénica e com efeito causador de FH.^{117,118} A mutação consiste na substituição de um nucleótido por outro, ocorrendo a troca do aminoácido Arginina pelo aminoácido Triptofano na proteína que se forma.

Apesar de ter sido identificada uma mutação, o fenótipo severo deste caso-índice fez com que se realizasse adicionalmente a pesquisa de grandes rearranjos no gene *LDLR*, pela técnica de MLPA. Através desta técnica foi possível identificar a presença da grande deleção [EX8_EX12del], descrita em 2008 por Bourbon *et al.*⁵¹ e já referida anteriormente neste capítulo. Como a deleção inclui o exão 9, no qual foi identificada a outra mutação deste caso-índice, c.1216C>T (p.Arg406Trp), então pode concluir-se que a grande deleção [EX8_EX12del] e a mutação *missense* c.1216C>T (p.Arg406Trp) ocorrem em alelos diferentes. Assim, o caso-índice 12040 trata-se de um heterozigoto composto.

Até à data, ainda não foram disponibilizadas amostras de familiares deste caso-índice, que pudessem complementar este estudo.

❖ Caso-índice 12041

O caso-índice 12041 é um senhor de 58 anos com valor elevado de colesterol (CT=402 mg/dL e c-LDL=287 mg/dL) que realiza terapêutica de LDL aferese em combinação com estatina e resina. A determinação bioquímica no INSA revelou um CT de 374 mg/dL e um c-LDL de 231 mg/dL. O caso-índice já teve uma angina à idade prematura de 55 anos e é filho de um senhor que já sofreu uma DCV.

Neste caso-índice foi identificada a mutação c.2093G>T (p.Cys698Phe) que já se encontra descrita por Humphries *et al.*¹¹⁹ mas que foi detectada pela primeira vez na população portuguesa, através deste estudo. A mutação, que ocorre no exão 14 do gene *LDLR* e consiste na substituição de uma Guanina por uma Timina, donde resulta a troca de uma Cisteína por uma Fenilalanina na proteína que se forma, está descrita como provavelmente patogénica e não tolerada.

A ausência de amostras impossibilitou a pesquisa desta mutação em familiares do caso-índice, sendo importante tentar consciencializar os doentes para a importância do estudo de uma doença genética na família.

4.1.2. Casos-índice sem nenhuma alteração nos genes em estudo

Em 52,5% dos 40 casos-índice estudados não foi detectada nenhuma alteração nos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*. Nestes 21 casos-índice sem alteração, o fenótipo que levou à suspeita clínica de FH pode advir da presença de alterações nos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9* em regiões não detectáveis pelas metodologias utilizadas, como por exemplo regiões não codificantes do gene *LDLR* ou de alterações que possam ter efeito na expressão do gene ou no processamento do RNA. Outra hipótese para o aparecimento de hipercolesterolemia nestes indivíduos poderá ser uma maior contribuição da componente ambiental relativamente à componente genética.

Destes 21 indivíduos sem alteração, 13 foram classificados com diagnóstico negativo de HeFH segundo os critérios SBRG e 9 segundo os critérios DMP, sendo que os dois critérios mais utilizados a nível mundial atribuem ambos diagnóstico negativo a 8 destes indivíduos. Como tal, os critérios de diagnóstico clínico de FH mais utilizados a nível mundial podem explicar a não identificação de nenhuma alteração em cerca de 38% (n=8) dos 21 indivíduos. A hipercolesterolemia nestes casos-índice sem critérios de diagnóstico de FH poderá advir da ocorrência de outra condição, como a dislipidemia familiar combinada (FCHL), uma dislipidemia para a qual ainda não se encontra estabelecido um diagnóstico molecular, em que se verifica a presença de um perfil lipídico alterado e o aparecimento prematuro de doença arterial coronária (CAD). Dois destes indivíduos sem critérios, o 11280 e o 12060, foram efectivamente estudados relativamente à presença de FCHL.

4.1.3. Comparação entre diagnóstico clínico e diagnóstico molecular da hipercolesterolemia familiar

Um dos objectivos deste estudo era a comparação entre a eficácia da aplicação aos casos-índice portugueses dos dois critérios de diagnóstico de FH mais usados a nível mundial, os critérios desenvolvidos pelo SBRG e pelo DMP, e o estudo molecular destes mesmos indivíduos. De modo a cumprir este objectivo, classificou-se a amostra total de 609 casos-índice referenciados ao EPFH, cujas três fases do estudo molecular já se encontram finalizadas.

O diagnóstico clínico de FH é obtido a partir da combinação de informações sobre história clínica do indivíduo em estudo, sinais físicos, marcadores bioquímicos e história familiar. Apesar dos critérios SBRG e DMP se basearem nestas informações, cada um deles usa especificações distintas, o que, por vezes, resulta na obtenção de um diagnóstico clínico diferente para o mesmo indivíduo, consoante o critério que se considera. O diagnóstico genético de FH baseia-se na procura de mutações nos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*.

Comparando os critérios dentro do mesmo grupo etário, verifica-se que no grupo pediátrico ambos os critérios classificam um maior número de crianças como não tendo diagnóstico. No entanto, os critérios DMP consideram que 4 casos-índice deste grupo têm um diagnóstico clínico de HeFH confirmada enquanto os critérios SBRG não incluem nenhuma criança neste diagnóstico, considerando todas as crianças com diagnóstico clínico positivo na categoria HeFH provável. Ao confrontar estes diagnósticos com os resultados do estudo molecular, observa-se que em 3 dessas crianças, a quem foi dado o diagnóstico de HeFH confirmada pelos critérios DMP, foi identificada a presença de alteração num dos três genes referidos. Aliás, os dois conjuntos de critérios dão resultados semelhantes para a faixa etária dos 0 aos 17 anos,

verificando-se, com ambos os critérios, concordância entre a sua classificação clínica e o estudo molecular em cerca de 71% das 236 crianças.

No grupo de adultos, as diferenças entre os diagnósticos clínicos obtidos com os dois critérios já são maiores. Enquanto os critérios SBRG continuam a classificar a maior parte dos indivíduos com diagnóstico negativo, os critérios DMP classificam mais indivíduos adultos com diagnóstico possível/provável de HeFH. Nesta faixa etária continua, no entanto, a verificar-se concordância entre a classificação clínica e o estudo molecular, sendo que os critérios SBRG atribuem um diagnóstico clínico coincidente com o estudo molecular a 68% dos 373 adultos e os critérios DMP a 56% dos adultos. Estes resultados, embora preliminares, podem revelar uma eficácia ligeiramente superior dos critérios SBRG relativamente aos DMP, para o grupo de adultos.

Ao comparar os critérios clínicos com o estudo molecular verifica-se que pela aplicação dos critérios surgem falsos negativos (diagnóstico clínico negativo mas com alteração molecular) e falsos positivos (diagnóstico clínico positivo mas sem alteração molecular). Na amostra total de 609 casos-índice, os critérios SBRG originaram 11% falsos negativos e 19% falsos positivos enquanto os critérios DMP originaram 6% falsos negativos e 32% falsos positivos. O aparecimento de falsos negativos alerta para a necessidade de comprovar o diagnóstico clínico de FH através de metodologias que esclareçam sobre o diagnóstico molecular a atribuir ao indivíduo. Comparando os dois critérios, observa-se que os critérios SBRG originam uma maior percentagem de falsos negativos e os critérios DMP de falsos positivos, verificando-se também esta tendência quando se separa a amostra nos grupos pediátrico e de adultos. A formação de uma maior percentagem de falsos negativos pelos critérios SBRG pode relacionar-se com o facto deste conjunto de critérios clínicos ser mais rígido, obrigando à verificação simultânea de pelo menos duas condições para que se considere um diagnóstico positivo de FH. Na aplicação dos critérios SBRG a esta amostra de 609 indivíduos verificou-se que a ausência de informações de familiares de alguns casos-índice impossibilitou o seu diagnóstico clínico de HeFH possível ou confirmada, sendo esta uma possível causa de ocorrência dos falsos negativos. Quanto à maior ocorrência de falsos positivos pelos critérios de DMP, talvez derive da própria atribuição de *score* inerente a este conjunto de especificações clínicas, que ao ser cumulativa pode indicar a presença de um fenótipo mais severo do que o que realmente está presente. Para além disso, a maior percentagem de falsos positivos relativamente aos falsos negativos em ambos os critérios pode advir do facto dos falsos positivos possuírem alterações genéticas não detectadas pelas metodologias aplicadas ou noutros genes, sendo importante alertar para a continuação do estudo destes casos-índice.

No que diz respeito à comparação entre a aplicação dos critérios clínicos e o tipo de mutação encontrada, ambos os critérios aplicados originaram resultados semelhantes.

No entanto, deve salientar-se a não atribuição de diagnóstico clínico pelos critérios SBRG a um indivíduo indicado como homocigoto pelo estudo molecular. Apesar de se ter informação clínica de dois familiares deste caso-índice, eles não apresentam valores de CT acima de 290 mg/dL. No entanto, esta informação bioquímica foi obtida com estes familiares sob medicação, não havendo informações anteriores, o que alerta para a importância da obtenção de informações sobre a história clínica do caso-índice e familiares e para a necessidade de um conjunto de critérios que tenha em conta o facto de os indivíduos estarem sob medicação. Para além disso não existe informação sobre a possível presença de DCV no caso-índice ou nos seus familiares, o que contribui para o não diagnóstico de FH pelos critérios SBRG. Segundo os critérios DMP, a determinação no caso-índice de um valor de c-LDL superior a 330 mg/dL é indicativa de um diagnóstico de FH confirmada.

Ambos os critérios clínicos aplicados atribuíram um diagnóstico clínico errado a cerca de 31-38% dos 609 casos-índice portugueses. A definição de um conjunto de critérios clínicos, criado numa parceria entre os vários países onde se realiza o estudo molecular de genes associados à FH, será útil para a identificação de doentes com FH, sendo uma forma de indicação de indivíduos que devem ser submetidos a um estudo molecular que confirme a sua patologia. Assim, podem ser recomendados um aconselhamento e uma terapêutica adequados a uma patologia genética do metabolismo lipídico, de modo a diminuir o elevado risco cardiovascular de doentes com FH. Apesar de haver casos-índice que não seriam identificados se só se seguisse o diagnóstico clínico, sendo o diagnóstico genético o único que dá um resultado fiável, enquanto os estudos genéticos tiverem custos elevados, é mais rentável aplicar estudos moleculares a indivíduos que possuam critérios clínicos de diagnóstico de FH possível/provável/confirmada. Se só fossem estudados casos-índice com esta classificação clínica, o EPFH teria identificado geneticamente com FH 57% de casos-índice, se fossem seguidos os critérios SBRG, e 49%, se fossem seguidos os critérios DMP, em vez da taxa de detecção de 37%, efectivamente obtida no estudo molecular da amostra de 609 casos-índice. Apesar da taxa de detecção de FH aumentar se se tivesse como amostra apenas os indivíduos com critérios de diagnóstico de FH, os resultados apresentados demonstram, mais uma vez, que um diagnóstico clínico positivo de FH deve ser sempre confirmado por estudos moleculares, uma vez que os casos em que não se identifica nenhuma alteração nos genes associados à ocorrência de FH podem resultar duma hipercolesterolemia ambiental, que está a ser clinicamente mal diagnosticada como sendo uma patologia genética ou podem possuir outra dislipidemia familiar.

4.2. Dislipidemia familiar combinada

Para além da FH, estudou-se outra dislipidemia familiar, a dislipidemia familiar combinada (FCHL).

A FCHL é caracterizada pela presença de hipercolesterolemia e/ou hipertrigliceridemia. Como se pretendia avaliar a presença desta dislipidemia, foi estudada uma amostra de 5 casos-index que apresentavam simultaneamente hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia e que não foram identificados com FH.

Os caso-índice estudados foram os seguintes: 11268, 11280, 11324, 12029 e 12060. Nesta amostra, a média de CT é de $336,0 \pm 26,0$ mg/dL e a a média de TG é de $373,0 \pm 303,4$ mg/dL, considerando-se valores sem medicação.

A FCHL é uma dislipidemia poligénica, podendo ser originada por interacções entre vários genes e efeitos cumulativos destes. O envolvimento das apolipoproteínas no metabolismo das lipoproteínas como activadoras de enzimas ou como ligandos dos receptores envolvidos na incorporação celular das lipoproteínas sugere que alterações das apolipoproteínas, quer ao nível estrutural quer ao nível regulatório, possam ser indicativas de patologias genéticas associados à presença de hiperlipidemia.¹²⁸ Ao longo das cerca de 60 kb que constituem o *gene cluster APOA1/C3/A4/A5* já foram identificados vários polimorfismos comuns que foram associados ao fenótipo de FCHL.¹³⁸ Assim, para esta doença complexa não existe um diagnóstico molecular específico, uma vez que não há um consenso sobre a sua base genética, sendo apenas possível estudar possíveis genes candidatos, envolvidos no metabolismo dos TG, que podem ter alguma associação com o fenótipo da doença, como o *LPL*, o *APOC2*, o *APOC3*, o *APOA4* e o *APOA5*. Aliás, a FCHL é também difícil de compreender em termos de fenótipo, apresentando o seu diagnóstico clínico uma certa dificuldade, podendo ser confundido com o fenótipo de outras patologias, como o da FH.

4.2.1. Estudo molecular

Todos os casos-índice da amostra foram identificados com alterações nos genes em estudo mas a maioria destas alterações já se encontram descritas como polimorfismos nos genes associados à hipertrigliceridemia. No entanto, no gene *APOC2* não foi identificada nenhuma alteração.

A presença de várias alterações em homozigotia pode estar relacionada com a existência de grandes deleções nos genes estudados, sendo visível apenas um alelo. Um passo subsequente será então a pesquisa de grandes rearranjos nos genes estudados, havendo um protocolo de MLPA para o *LPL*, que não foi possível executar durante este trabalho.

O fenótipo dos casos-índice estudados pode estar associado às alterações que foram identificadas mas a relação entre as alterações e a ocorrência de FCHL é um assunto que ainda requer estudos adicionais, sendo este apenas um estudo preliminar.

No gene *LPL* foram identificadas as alterações c.332+73T>G, c.579G>A (p.Val135Val), c.1313+43T>C, 1595C>G (p.Ser474X) e c.1425+10G>A. A alteração c.332+73T>G consiste na substituição de uma Timina por uma Guanina numa região intrónica do gene *LPL*. Esta alteração no intrão 6 foi descrita em 2008 por Wright *et al.*¹²⁵ como sendo um polimorfismo. A alteração c.579G>A (p.Val135Val) é uma alteração sinónima que ocorre no exão 3 e que foi descrita em 2008 por Wright *et al.*¹²⁵ Tal como as outras alterações sinónimas já referidas, também esta necessita de estudos adicionais que avaliem o seu possível efeito ao nível da funcionalidade proteica. A alteração c.1313+43T>C é um polimorfismo que ocorre numa região intrónica do gene, podendo afectar o processo de *splicing*. A alteração c.1595C>G (p.Ser474X) ocorre no exão 9 do *LPL* e consiste na substituição de uma Citosina por uma Guanina na posição c.1595, formando-se um codão prematuro na posição 474 da proteína. Esta alteração *nonsense* produz uma enzima LPL truncada, com menos dois aminoácidos (uma Serina e uma Glicina) no seu terminal de carboxilo. Num artigo publicado em 1991, Faustinella *et al.* descreveram esta alteração como sendo um polimorfismo e observaram, através de estudos funcionais da análise da expressão, *in vitro*, das formas normal e mutada da proteína, que a alteração c.1595C>G (p.Ser474X) não prejudica a actividade da LPL, concluindo que o dipéptido perdido não mostra ser essencial para a actividade da enzima¹²⁶ O polimorfismo é um dos mais frequentes no gene *LPL*, com uma incidência de 17-22% na população caucasiana.¹²⁶ A alteração c.1425+10G>A é um polimorfismo que ocorre na região 3' não traduzida (3'UTR).

No gene *APOC3* foi identificada a alteração c.102T>C (p.Gly34Gly) no exão 3, que já se encontra descrita como sendo um polimorfismo.¹²⁷ As alterações c.179+57G>A e c.179+62T>A, também identificadas neste estudo, já se encontram descritas como sendo polimorfismos que ocorrem no intrão 3 do gene.¹²⁷ Na região 3'UTR deste gene foram identificadas as alterações 3269G>T, ainda não descrita, e 3238C>G. Esta última consiste numa transversão de uma Citosina para uma Guanina na região 3'UTR do exão 4 do gene *APOC3* e está descrita como sendo um polimorfismo (SstI). Vários estudos já reportaram a associação entre variantes comuns do gene *APOC3*, em particular deste polimorfismo SstI, e o desenvolvimento de aterosclerose, a ocorrência de FCHL e os níveis de TG em jejum.^{128,138}

Através do estudo molecular do gene *APOA4* foi possível identificar 4 alterações. A alteração c.87G>A (p.Thr29Thr), descrita em 2010 por Delgado-Lista *et al.*¹²⁹, ocorre no exão 2 e consiste na substituição de uma Guanina por

uma Adenina na posição c.87, não se verificando alteração no aminoácido formado. No gene *LDLR*, as alterações sinónimas podem ter algum efeito sobre o processo de *splicing* do mRNA.¹³⁷ Estudos adicionais devem ser realizados para avaliar se a presença de alterações sinónimas no gene *APOA4* pode ter um efeito semelhante. O estudo de 2010 de Delgado-Lista *et al.* refere que a alteração c.87G>A (p.Thr29Thr) tem efeito ao nível da diminuição dos níveis de apoA-I que, ao funcionar como cofactor da enzima LCAT, pode ter um carácter protector contra a aterosclerose, uma vez que pode intervir ao nível da regulação do transporte reverso do colesterol.¹²⁹ As alterações c.222T>C (p.Gly74Gly) e c.231G>A (p.Gln77Gln) ocorrem ambas no exão 3 deste gene e não alteram o aminoácido que se forma, não se encontrando ainda descritas na literatura. A alteração c.440G>A (p.Ser147Asn) ocorre no exão 3 do gene *APOA4* e consiste na substituição de uma Guanina por uma Adenina, o que se traduz na presença de um aminoácido Asparagina em vez de um aminoácido Serina, na proteína que se forma. Segundo o estudo de 2010 de Delgado-Lista *et al.*, esta alteração tem, também, efeito ao nível da diminuição dos níveis de apoA-I. No entanto, neste estudo não foi possível avaliar a variação do valor de apoA-I.¹²⁹

O estudo molecular do gene *APOA5* identificou as alterações 6G>A, a c.56C>G (p.Ser42Trp) e a c.132C>A (p.Ile67Ile). A alteração 6G>A consiste na substituição de uma Guanina por uma Adenina na região 5'UTR deste gene e não se encontra descritas. A alteração c.56C>G (p.Ser42Trp) consiste na substituição de uma Citosina por uma Guanina na posição c.56, o que se traduz na existência de um aminoácido Triptofano em vez do aminoácido Serina na proteína. O estudo de van der Vleuten *et al.*, publicado em 2007, mostra que o polimorfismo c.56C>G (p.Ser42Trp) tem uma associação independente com a FCHL e com a presença de elevados níveis de TG.¹³⁰ Para além disso, estes autores associam esta variante rara a um perfil lipídico aterogénico, algo que já tinha sido antes sugerido, e indicam outros estudos que sugerem que o haplótipo que contém esta variante polimórfica está associado aos mais elevados valores de TG.¹³⁰ Nesta pequena amostra de 5 casos-índice, este polimorfismo apenas foi detectado neste indivíduo, que era o que apresentava maior valor de TG. A hipertrigliceridemia deste caso-índice pode então advir da presença deste polimorfismo que reduz a secreção da proteína apoA-V, o que pode prejudicar a hidrólise das lipoproteínas ricas em TG, e que se encontra associado ao fenótipo de FCHL. Neste gene foi, ainda, detectada a alteração sinónima c.132C>A (p.Ile67Ile), que ocorre no exão 2 e que foi descrita em 2006 por Hodoğlugil *et al.*¹³¹

Sendo assim nos 5 doentes com fenótipo sugestivo de FCHL não se encontrou nenhuma alteração responsável pela severidade do fenótipo apresentado, sendo que o polimorfismo c.56C>G (p.Ser42Trp) do *APOA5* é a única alteração com alguma associação concreta ao fenótipo apresentado pelo doente.

Capítulo 5. Considerações finais e perspectivas futuras

O estudo realizado permitiu a aplicação de diversas metodologias que se incluem num panorama de constante investigação sobre as dislipidemias familiares, tendo possibilitado a identificação de alterações genéticas que podem ter um possível efeito ou serem causadoras de patologias genéticas em indivíduos que apresentam hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. O estudo molecular em indivíduos com suspeita clínica de uma dislipidemia familiar permite que se possa intervir, o mais precocemente possível, de modo a direccionar o doente para a terapêutica adequada e para um esclarecimento/aconselhamento sobre as implicações familiares da sua patologia genética. No entanto, o diagnóstico molecular dos 40 casos-índice estudados não pode ser considerado definitivo, uma vez que a prática científica consiste, exactamente, na procura de novas metodologias que possam revelar novas informações e complementar os estudos realizados.

A hipercolesterolemia familiar (FH) é uma patologia genética amplamente estudada a nível mundial, sendo considerada um factor de risco cardiovascular. O Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar estuda esta dislipidemia genética há 13 anos, contribuindo para a caracterização da população portuguesa, onde se estima que existam 20000 indivíduos com esta patologia, de acordo com dados sobre a incidência heterozigótica de 1/500. Este trabalho permitiu alargar a informação acerca do espectro português de mutações nos genes associados à FH e contribuiu para a identificação de indivíduos com esta doença, num país onde estes doentes se encontram subdiagnosticados. A pesquisa sobre a possível existência de um padrão de mutações genéticas para a população portuguesa e a sua caracterização representam um objectivo importante ao nível de estudos futuros, para que se possa direccionar primeiramente o estudo molecular para a avaliação destas alterações.

A elevada estimativa de indivíduos portugueses subdiagnosticados para a FH poderá ser reduzida se forem reunidos esforços no sentido de se elaborar um conjunto de critérios de diagnóstico desta dislipidemia. Estes critérios deverão ter uma aplicabilidade internacional, de modo a uniformizar o diagnóstico clínico, porém deverão ser suficientemente flexíveis para que não deixem de fora doentes com FH com fenótipos menos severos. Assim, poderá construir-se um conjunto de critérios comuns que deverá possuir características específicas de cada país onde será aplicado, como por exemplo, a indicação do percentil do valor de CT a utilizar. Em Portugal, será importante o desenvolvimento de estudos populacionais que possibilitem a informação a aplicar nos critérios de diagnóstico de FH, nomeadamente de tabelas de percentis de valores de colesterol, essenciais para a estratificação do risco cardiovascular.

Na actualidade, surgem cada vez mais estudos sobre o papel dos triglicéridos como um factor independente para o aumento do risco cardiovascular, na tentativa de avaliar outros marcadores bioquímicos de dislipidemia para além do colesterol. Este trabalho representa um estudo preliminar destas dislipidemias, tendo como base uma amostra muito reduzida de 5 casos-índice com hipertrigliceridemia. O estudo molecular de alguns genes envolvidos no metabolismo dos triglicéridos, que podem estar associados à ocorrência destas patologias, identificou a presença de polimorfismos, alguns deles já descritos como relacionados com o nível de triglicéridos dos indivíduos, sendo importante a continuação deste trabalho, de forma a poder implementar estratégias de auxílio do diagnóstico destes indivíduos.

As novas alterações detectadas ao longo deste trabalho representam uma contribuição para que, no futuro, sejam identificadas novas mutações associadas às dislipidemias familiares. O efeito destas alterações não descritas pode ser esclarecido em futuros projectos que incluam estudos funcionais que avaliem a estrutura/função da proteína.

A identificação de uma alteração genética num caso-índice deste estudo possibilitou a implementação da pesquisa dessa mesma alteração em indivíduos da mesma família, pelo estudo familiar por *cascade screening*, em que se avalia a co-segregação do fenótipo/genótipo na família, por avaliação sequencial das gerações. Este método reduz o custo associado a um diagnóstico genético, uma vez que permite a identificação de indivíduos com determinada mutação sem ser necessário o estudo completo de todo o gene.

O trabalho futuro deve, também, incidir sobre a pesquisa de novos métodos de diagnóstico e de outros genes que possam estar associados às dislipidemias familiares em causa, de modo a contribuir para um correcto diagnóstico populacional. Outro aspecto importante passa pela implementação de medidas de esclarecimento e consciencialização dirigidas à população em geral, quer sobre a importância da detecção de uma patologia genética quer sobre a existência de comissões que exercem controlo sobre as questões éticas que podem preocupar os indivíduos e afastá-los dos estudos genéticos. Para além disso, também, os clínicos devem ser informados sobre a possibilidade de referenciar doentes para estes estudos genéticos, sendo importante estabelecer um trabalho conjunto com o objectivo final de melhorar a qualidade de vida dos indivíduos e de aumentar a sua esperança média de vida.

Referências bibliográficas

1. Ndindjock R, Gedeon J, Mendis S, Paccaud F, Bovet P. Potential impact of single-risk-factor versus total risk management for the prevention of cardiovascular events in Seychelles. *Bull World Health Organ* 2011;**89**:286–295.
2. World Health Organization (WHO). Preventing chronic diseases. A vital investment: WHO global report. Geneva: World Health Organization; 2005. 200 p.
3. Gaziano TA, Reddy KS, Paccaud F, Horton S, Chaturvedi V. Cardiovascular disease. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, Jha P, Mills A, Musgrove P, editors. *Disease Control Priorities in Developing Countries*. 2nd ed. New York/Washington: Oxford University Press and The World Bank; 2006. p645-662.
4. De Backer G, Ambrosini E, Borch-Johnsen K, Brotons C, Cifkova R, Dallongeville J, Ebrahim S, Faergeman O, Graham I, Mancia G, Cats VM, Orth-Gomér K, Perk J, Pyörälä K, Rodicio JL, Sans S, Sansoy V, Sechtem U, Silber S, Thomsen T, Wood D. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Third Joint Task Force of European and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *Eur Heart J* 2003;**24**:1601-1610.
5. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional para as Doenças Cardiovasculares. *Reabilitação cardíaca: realidade nacional e recomendações clínicas*. Coordenação Nacional para as Doenças Cardiovasculares; 2009. 26 p.
6. Ministério da Saúde. Direcção-Geral da Saúde (DGS). *Plano nacional de saúde 2004-2010 Volume I - Prioridades*. Lisboa: Direcção-Geral da Saúde; 2004. 88 p.
7. World Health Organization (WHO). World health statistics 2009. Geneva: World Health Organization; 2009. 149 p
8. Catapano AL, Reiner Z, De Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, Agewall S, Alegria E, Chapman M, Durrington P, Erdine S, Halcox J, Hobbs R, Kjekshus J, Filardi PP, Riccardi G, Storey RF, Wood D, European Society of Cardiology (ESC), European Atherosclerosis Society (EAS). ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J* 2011;**32**:1769-1818.
9. Beaglehole R, Bonita R. Global public health: a scorecard. *Lancet* 2008;**372**: 1988–1996.
10. Institute of Medicine (IOM). *Promoting Cardiovascular Health in the Developing World: A Critical Challenge to Achieve Global Health*. Washington, DC: The National Academies Press; 2010. 483 p.
11. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, Ferguson TB, Ford E, Furie K, Gillespie C, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho PM, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott MM, Meigs J, Mozaffarian D, Mussolino M, Nichol G, Roger VL, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong ND, Wylie-Rosett J. Heart disease and stroke statistics – 2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2010;**121**:e46-e215.
12. Olson RE. Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. *J Nutr* 1998;**128**(Suppl 2):439S-443S.
13. Feher MD, Richmond W. *Pocket Picture Guides. Lipids and lipid disorders*. London: Mosby-Wolfe Medical Communications; 1997. 99 p.
14. Koenig W, Khuseyinova N. Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;**27**:15-26.

15. Berman JW, Kazimi M, Ma H. Development of the atherosclerotic plaque. In: David Lloyd Brown, editor. *Cardiovascular plaque rupture*. Informa Health Care; 2002. p1-42.
16. Corrêa-Camacho CR, Dias-Melicio LA, Soares AMVC. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. *Arq Ciênc Saúde* 2007;**14**:41-48.
17. Bourbon M. Factores genéticos e a doença cardiovascular. *Rev Port Cardiol* 2008;**27**(12):1559-1563.
18. Kardia SL, Modell SM, Peyser PA. Family-centered approaches to understanding and preventing coronary heart disease. *Am J Prev Med* 2003;**24**(2):143-151.
19. Arnett DK, Baird AE, Barkley RA, Basson CT, Boerwinkle E, Ganesh SK, Herrington DM, Hong Y, Jaquish C, McDermott DA, O'Donnell CJ. Relevance of genetics and genomics for prevention and treatment of cardiovascular disease: A scientific statement from the American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention, the Stroke Council, and the Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group. *Circulation* 2007;**115**:2878-2901.
20. Bourbon M, Rato Q. Lipoproteínas, genética e aterosclerose. *RFML* 2006; Série III,**11**(2):67-73.
21. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1990. 1315p.
22. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*. 4th ed. New York: W. H. Freeman; 2005. 1119p.
23. Yusuf PS, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): Case-control study. *Lancet* 2004;**364**:937-952.
24. Rifai N, Barchorik PS, Albers JJ. Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. In: Burtis CA, Ashwood E, editors. *Text Book of Clinical Chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders & Co.; 1999. p809-861.
25. Carmena R, Duriez P, Fruchart JC. Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation* 2004;**109**:III-2-III7.
26. Yip AG, Ma Q, Wilcox M, Panhuysen CI, Farrell J, Farrer LA, Wyszynski DF. Search for genetic factors predisposing to atherogenic dyslipidemia. *BMC Genet* 2003; **4**(Suppl I):S100-S103.
27. Groenendijk M, Cantor RM, de Bruin TWA, Dallinga-Thie GM. The apoAI-CIII-AIV gene cluster. *Atherosclerosis* 2001;**157**:1-11.
28. Soutar AK, Garner CW, Baker HN, Sparrow JT, Jackson RL, Gotto AM, Smith LC. Effect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidylcholine acyl donor on the activity of lecithin: cholesterol acyltransferase. *Biochemistry* 1975;**14**:3057-3064.
29. Julve J, Escolà-Gil JC, Rotllan N, Fiévet C, Vallez E, de la Torre C, Ribas V, Sloan JH, Blanco-Vaca R. Human apolipoprotein A-II determines plasma triglycerides by regulating lipoprotein lipase activity and high-density lipoprotein proteome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;**30**:232-238.
30. Chapman MJ, Caslake M. Non-high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor: addressing risk associated with apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Eur Heart J Suppl* 2004;**6**(Suppl A):A43-A48.
31. Jong MC, Hofker MHH, Havekes LM. Role of apoCs in lipoproteins metabolism: functional differences between apoC1, apoC2, and apoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;**19**:472-484.
32. Wilson PW, Myers RH, Larson MG, Ordovas JM, Wolf PA, Schaefer EJ. Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia and coronary heart disease. The Framingham Offspring Study. *JAMA* 1994;**272**:1666-1671.
33. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988;**8**:1-21.
34. Rodrigo E, González-Lamuño D, Ruiz JC, Fernández-Fresnedo G, Isla D, González-Cotorruelo J, Zubimendi JÁ, De Francisco ALM, García-Fuentes M, Arias M. Apolipoprotein C-II and E polymorphisms and cardiovascular syndrome,

- hyperlipidemia, and insulin resistance in renal transplantation. *Am J Transplant* 2002;**2**:323-348.
35. Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thopson DM, Stewart KE, Stroehia BC. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HUGE review. *Am J Epidemiol* 2002;**155**:487-495.
36. Ordovas JM. Genetic influences on blood lipids and cardiovascular disease risk: tools for primary prevention. *Am J Clin Nutr* 2009;**89**(5):1509S-1517S.
37. Goldstein JL, Hobbs H, Brown MS. Familial hypercholesterolaemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 7th ed. Vol II. New York: McGraw-Hill; 1995. p1981-2030.
38. Soutar AK, Naoumova RP. Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007;**4**:214-225.
39. Gotto AM Jr. Evolving concepts of dyslipidemia, atherosclerosis, and cardiovascular disease: The Louis F. Bishop lecture. *J Am Coll Cardiol*. 2005;**46**:1219-1224.
40. Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, Albus C, Benlian P, Boysen G, Cifkova R, Deaton C, Ebrahim S, Fisher M, Germano G, Hobbs R, Hoes A, Karadeniz S, Mezzani A, Prescott E, Ryden L, Scherer M, Syväne M, Scholte op Reimer WJ, Vrints C, Wood D, Zamorano JL, Zannad F. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J* 2012;**33**:1635-16701.
41. National Cholesterol Education Program, NCEP, Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third report of the National Cholesterol Education Program, NCEP, Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), Final report. *Circulation* 2002;**106**:3143-3421.
42. Yuan G, Al-Shali KZ, Hegele RA. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. *CMAJ* 2007;**176**(8):1113-1120.
43. Assmann G, Cullen P, Schulte H. The Münster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up at 8 years. *Eur Heart J* 1998;**19**(Suppl A):A2-11.
44. Criqui MH, Heiss G, Cohn R, Cowan LD, Suchindran CM, Bangdiwala S, Kritchovsky S, Jacobs DR Jr, O'Grady HK, Davis CE. Plasma triglyceride level and mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med* 1993;**328**:1220-1225.
45. Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a metaanalysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk* 1996;**3**:213-219.
46. Gianturco SH, Bradley WA. Pathophysiology of triglyceride-rich lipoproteins in atherothrombosis: cellular aspects. *Clin Cardiol*. 1999;**22**(6 Suppl):II7-114.
47. Hassing HC, Surendran RP, Mooij HL, Stroes ES, Nieuwdorp M, Dallinga-Thie GM. Pathophysiology of hypertriglyceridemia. *Biochim Biophys Acta* 2012;**1821**:826-832.
48. Williams KJ. Molecular processes that handle – and mishandle – dietary lipids. *J Clin Invest* 2008;**118**:3247-3259
49. Bourbon M, Rato Q. Alterações genéticas do metabolismo lipoproteico. *RFML* 2006;Série III,**11**(4):193-201.
50. Johansen CT, Hegele RA. Genetic bases of hypertriglyceridemic phenotypes. *Curr Opin Lipidol* 2011;**22**:247-253.
51. Bourbon M, Alves AC, Medeiros AM, Silva S, Soutar AK. Familial hypercholesterolaemia in Portugal. *Atherosclerosis* 2008;**196**:633-642.
52. De Castro-Orós I, Pocovi M, Civeira F. The genetic basis of familial hypercholesterolaemia: inheritance, linkage and mutations. *The application of clinical genetics* 2010;**3**:53-64.

53. Fahed AC, Nemer GM. Familial Hypercholesterolemia: the lipids or the genes. *Nutrition & Metabolism* 2011;**8**:23-34.
54. Alves C, Medeiros AM, Francisco V, Gaspar IM, Rato Q, Bourbon QR. Molecular diagnosis of familial hypercholesterolemia: an important tool for cardiovascular risk stratification. *Rev Port Cardiol* 2010;**29**(06):907-992.
55. Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register. Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. *BMJ* 1991;**303**:893-896.
56. Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. Mortality in treated heterozygous familial hypercholesterolaemia: implications for clinical management. *Atherosclerosis* 1999;**142**:105-112.
57. Defecche JC, Lansberg PJ, Umans-Eckenhauer MA, Kastelein JJ. Advanced methods for the identification of patients with inherited hypercholesterolemia, *Semin Vasc Med* 2004;**4**:59-65.
58. Yuan G, Wang J, Hegele RA. Heterozygous familial hypercholesterolemia: an underrecognized cause of early cardiovascular disease. *CMAJ* 2006.**174**(8):1124-1129.
59. Bourbon M, Rato Q. Estudo português de hipercolesterolemia familiar: apresentação do estudo e resultados preliminares. *Rev Port Cardiol* 2006;**25**(11):999-1013.
60. Medeiros AM, Alves AC, Francisco V, on behalf of the investigators of the Portuguese FH Study. Update of the Portuguese Familial Hypercholesterolaemia Study. *Atherosclerosis* 2010;**212**:553-558.
61. Damgaard D, Larsen ML, Nissen PH, Jensen JM, Jensen HK, Soerensen VR, Jensen LG, Faergeman O. The relationship of molecular genetic to clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia in a Danish population. *Atherosclerosis* 2005;**180**:155-160
62. 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.
63. Livy A, Lye SH. Familial hypercholesterolemia in Asia: a review. *OMICS Res* 2011;**1**:22-31.
64. Usifo E, Leigh SEA, Whittall RA, Lench N, Taylor A, Yeates C, Orengo CA, Martin ACR, Humphries SE. Low density lipoprotein receptor gene familial hypercholesterolemia variant database: update and pathological assessment. *Ann Hum Genet* 2012;**76**:387-401.
65. Varret M, Rabès JP, Collod-Bérout G, Junien C, Boileau C, Bérout C. Software and database for the analysis of mutations in the human LDL receptor gene. *Nucleic Acids Res* 1997;**25**:172-180.
66. Varret M, Rabès JP, Thiart R, Kotze MJ, Baron H, Cenarro A, Descamps O, Ebhardt M, Hondelijn JC, Kostner GM, Miyake Y, Pocovi M, Schmidt H, Schuster H, Stuhmann M, Yamamura T, Junien C, Bérout C, Boileau C. LDLR database (second edition): new additions to the database and the software, and results of the first molecular analysis. *Nucleic Acids Res* 1998;**26**:248-252.
67. Taylor A, Wang D, Patel K, Whittall R, Wood G, Farrer M, Neely RDG, Fairgrieve S, Nair D, Barbir M, Jones JL, Egan S, Everdale R, Lolin Y, Hughes E, Cooper JA, Hadfield SG, Norbury G, Humphries SE. Mutation detection rate and spectrum in familial hypercholesterolaemia patients in the UK pilot cascade project. *Clin Genet* 2010;**77**:572-580.
68. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic & molecular bases of inherited disease, Volume 1*. 8th ed. United States of America: McGraw Hill, Medical Publishing Division; 2001. 6338p.
69. Deeb SS, Disteche C, Motulsky AG, Lebo RV, Kan YW. Chromosomal localization of the human apolipoprotein B gene and detection of homologous RNA in monkey intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;**83**:419-422.
70. Chiou KR, Charng MJ. Common mutations of familial hypercholesterolemia patients in Taiwan: characteristics and implication of migrations from southeast China. *Gene* 2012;**498**:100-106.

71. Soria LF, Ludwing EH, Clarke HRG, VegaGL, Grundy SM, McCarthy BJ. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;**86**:587-591.
72. Borén J, Ekström U, Ågren B, Nilsson-Ehle P, Innerarity TL. The molecular mechanism for the genetic disorder familial defective apolipoprotein B100. *J Biol Chem* 2001;**276**:9214-9218.
73. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derré A, Villéger L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf M, Junien C, Seidah NG, Boileau C. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 2003;**34**:154-156.
74. Dudek RW. *Genetics*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. 239p.
75. Maxwell KN, Breslow JL. Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;**101**:7100-7105.
76. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med* 2006;**354**:1264-1272.
77. Kotowski IK, Pertsemlidis A, Luke A, Cooper RS, Vega GL, Cohen JC, Hobbs HH. A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Hum Genet* 2006;**78**:410-422.
78. Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG. Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest*. 1973;**52**:1544-1568.
79. Pollex RL, Hegele RA. Complex trait locus linkage mapping in atherosclerosis; time to take a step back before moving forward?. *Arterios Thromb Vasc Biol* 2005;**25**:1541-1544.
80. Brunzell JD, Albers JJ, Chait A, Grundy SM, Groszek E, McDonald GB. Plasma lipoproteins in familial combined hyperlipidemia and monogenic familial hypertriglyceridemia. *J Lipid Res* 1983;**24**:147-155.
81. Arai H, Ishibashi S, Bujo H, Hayashi T, Yokoyama S, Oikawa S, Kobayashi J, Shirai K, Ota T, Yamashita S, Gotoda T, Harada-Shiba M, Sone H, Eto M, Suzuki H, Yamada N. Management of type IIb dyslipidemia. *J Atheroscler Thromb* 2012;**19**:105-114.
82. Gaddi A, Cicero AFG, Odofo FO, Poli A, Paoletti R. Practical guidelines for familial combined hyperlipidemia diagnosis: an up-date. *Vasc Health Risk Manag* 2007;**3**(6):877-886.
83. Wojciechowski AP, Farrall M, Cullen P, Wilson TM, Bayliss JD, Farren B, Griffin BA, Caslake MJ, Packard CJ, Shepherd J, et al. Familial combined hyperlipidaemia linked to the apolipoprotein AI-CII-AIV gene cluster on chromosome 11q23-q24. *Nature* 1991;**349**:161-164.
84. Mar R, Pajukanta P, Allayee H, Groenendijk M, Dallinga-Thie G, Krauss RM, Sinsheimer JS, Cantor RM, de Bruin TW, Lusis AJ. Association of the APOLIPOPROTEIN A1/C3/A4/A5 gene cluster with triglyceride levels and LDL particle size in familial combined hyperlipidemia. *Circ Res* 2004;**94**:993-999.
85. Ding Y, Zhu MA, Wang ZX, Zhu J, Feng JB, Li DS. Associations of Polymorphisms in the Apolipoprotein APOA1-C3-A5 Gene Cluster with Acute Coronary Syndrome. *J Biomed Biotechnol* 2012;**2012**:509420.
86. Geurts JM, Janssen RG, van Greevenbroek MM, van der Kallen CJ, Cantor RM, Bu X, Aouizerat BE, Allayee H, Rotter JI, de Bruin TW. Identification of TNFRSF1B as a novel modifier gene in familial combined hyperlipidemia. *Hum Mol Genet* 2000;**9**:2067-2074.
87. Pajukanta P, Lilja HE, Sinsheimer JS, Cantor RM, Lusis AJ, Gentile M, Duan XJ, Soro-Paavonen A, Naukkarinen J, Saarela J, Laakso M, Ehnholm C, Taskinen MR,

- Peltonen L. Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1). *Nat Genet* 2004;**36**:371–376.
88. Nevin DN, Brunzell JD, Deeb SS. The LPL gene in individuals with familial combined hyperlipidemia and decreased LPL activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994;**14**:869-873.
89. de Graaf J, Veerkamp MJ, Stalenhoef AFH. Metabolic pathogenesis of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on insulin resistance, adipose tissue and free fatty acids. *J R Soc Med* 2002;**95**(Suppl 42):46-53.
90. Sniderman A, Bailey SA, Engert JC. Familial combined hyperlipidaemia: how can genetic disorders be common, complex and comprehensible?. *Clin Sci* 2007;**113**: 365-367.
91. Wakai J, Takagi A, Nakayama M, Miya T, Mitahara T, Iwanaga T, Takenaka S, Ikeda Y, Amano M. A novel method of identifying genetic mutations using an electrochemical DNA array. *Nucl Acids Res* 2004;**32**:e141.
92. Brunzell JD. Familial lipoprotein lipase deficiency. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2009. Disponível *online* em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1308/> (acedido em 25.10.2012).
93. Tuzgöl S, Bijvoet SM, Bruin T, Kastelein JJP, Hayden MR. Apolipoprotein CII-Padova(Tyr37→stop) as a cause of chylomicronaemia in an Italian kindred from Siculiana. *J Med Genet* 1994;**31**:622-636.
94. Johansen CT, Wang J, McIntyre AD, Martins RA, Ban MR, Lanktree MB, Huff MW, Péterfy M, Mehrabian M, Lusis AJ, Kathiresan S, Anand SS, Yusuf S, Lee AH, Glimcher LH, Cao H, Hegele RA. Excess of rare variants in non-genome-wide association study candidate genes in patients with hypertriglyceridemia. *Circ Cardiovasc Genet* 2012;**5**:66-72.
95. Connelly PW, Maguire GF, Little JA. Apolipoprotein CII St Michael. Familial apolipoprotein CII deficiency associated with premature vascular disease. *J Clin Invest* 1987;**80**:1597–1606.
96. Peterfy M, Ben-Zeev O, Mao HZ, Weissglas-Volkov D, Aouizerat BE, Pullinger CR, Frost PH, Kane JP, Malloy MJ, Reue K, Pajukanta P, Doolittle MH. Mutations in LMF1 cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia. *Nat Genet* 2007;**39**:1483–1487.
97. Lee JH, Giannikopoulos P, Duncan SA, Wang J, Johansen CT, Brown JD, Plutzky J, Hegele RA, Glimcher LH, Lee AH. The transcription factor CREB-H regulates triglyceride metabolism. *Nat Med* 2011;**17**:812– 815.
98. Gargalovic PS, Erbilgin A, Kohannim O, Pagnon J, Wang X, Castellani L, LeBoeuf R, Peterson ML, Spear BT, Lusis AJ. Quantitative trait locus mapping and identification of *Zhx2* as a novel regulator of plasma lipid metabolism. *Circ Cardiovasc Genet* 2010;**3**:60–67.
99. National Collaborating Centre for Primary Care. *Identification and management of familial hypercholesterolaemia. NICE clinical guideline 71*. London: National Institute for Health and Clinical Excellence; 2008. 45 p.
100. O'Neill FH, Patel DD, Knight BL, Neuwirth CKY, Bourbon M, Soutar AK, Taylor GW, Thompson GR, Naoumova RP. Determinants of variable response to statin treatment in patients with refractory familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;**21**:832-837.
101. Nierman MC, Rip J, Twisk J, Meulenberg JJM, Kastelein JJP, Stroes ESG, Kuivenhoven JA. Gene therapy for genetic lipoprotein lipase deficiency: from promise to practice. *Neth J Med* 2005;**63**(1):14-19.
102. Hequet O, Le QH, Rigal D, Mekhloufi F, Jaeger S, Sassolas A, Groisne L, Moulin P. The first results demonstrating efficiency and safety of a double-column whole blood method of LDL-apheresis. *Transfus Ather Sci* 2010;**42**:3-10.
103. Bosch T, Gahr S, Belschner U, Schaefer C, Lennertz A, Rammo J, for the DALI Study Group. Direct adsorption of low-density lipoprotein by DALI-LDL-Apheresis: results

- of a prospective long-term multicenter follow-up covering 12291 sessions. *Ther Apher Dial* 2006;**10**:210-218.
104. Goldenberg I, Benderly M, Goldbourt U. Update on the use of fibrates: focus on bezafibrate. *Vasc Health and Risk Manag* 2008;**4**:131-141
 105. Chapman MJ, Ginsberg HN, Amarencio P, Andreotti F, Borén J, Catapano AL, Descamps OS, Fisher E, Kovanen PT, Kuivenhoven JÁ, Lesnik P, Masana L, Nordestgaard BG, Ray KK, Reiner Z, Taskinen MR, Tokgözoğlu L, Tybjaerg-Hansen A, Watts GF, for the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. *Eur Heart J* 2011;**32**:1345-1361.
 106. Ito M. Dyslipidemia: Management Using Optimal Lipid-Lowering Therapy *Ann Pharmacother* 2012;**46**:1368-1381.
 107. Cotton RGH, Scriver CR. Proof of “disease causing” mutation. *Hum Mutat* 1998;**12**: 1-3.
 108. Lahiri DK, Nurnberger Jr JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991;**19**(19):5444.
 109. CGDP-DNA Amplification, Part 1. [Internet] 2005. Disponível *online* em: <http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html> (acedido em 13.10.2012).
 110. Dominguez MV, Bastos EP, Silva SD, Rossi BM. Molecular research methods in the detection of germinal mutations in hereditary colorectal câncer. *Rev gastroenterol Perú* 2009;**29**:247-253.
 111. MRC-Holland. MLPA[®] - an introduction. [Internet]. 2011. Disponível *online* em: <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=zjCZBtdOUyAt3KF3EwRZhNWLtcfv9pVl/tHJIM%5Cfa9FWO8KMqctOGloqYwxaGF9Y> (Acedido em 18.10.2012)
 112. Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutation analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet* 1990;**24**:133-170.
 113. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;**1**:445-466.
 114. Lind S, Rystedt E, Eriksson M, Wiklund O, Angelin B, Eggertsen G. Genetic characterization of Swedish patients with familial hypercholesterolemia: a heterogeneous pattern of mutations in the LDL receptor gene. *Atherosclerosis* 2002;**163**:399-407.
 115. Bertolini S, Garuti R, Lelli W, Rolleri M, Tiozzo RM, Ghisellini M, Simone ML, Masturzo P, Elicio NC, Stefanutti C, Coviello D, Carabbio C, Orecchini G, Calandra S. Four novel partial deletions of LDL-receptor gene in Italian patients with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;**15**:81-88.
 116. Bourbon M, Duarte MA, Alves AC, Medeiros AM, Marques L, Soutar AK. Genetic diagnosis of familial hypercholesterolaemia: the importance of functional analysis of potential splite-site mutations. *J Med Genet* 2009;**46**:352-357.
 117. Reshef A, Nissen H, Triger L, Hensen TS, Eliav O, Schurr D, Safadi R, Gare M, Leitersdorf E. Molecular genetics of familial hypercholesterolemia in Israel. *Hum Genet* 1996;**98**:581-586.
 118. Chiou KR, Charng MJ. Detection of mutations and large rearrangements of the low-density lipoprotein receptor gene in Taiwanese patients with familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2010;**105**:1752-1758.
 119. Humphries SE, Cranston T, Allen M, Middleton-Price H, Fernandez MC, Senior V, Hawe E, Iversen A, Wray R, Crook MA, Wierzbicki AS. 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 (Berl)* 2006;**84**:203-214.
 120. Davis CG, Elhammer A, Russell DW, Schneider WJ, Kornfeld S, Brown MS, Goldstein JL. Deletion of clustered O-linked carbohydrates does not impair function of low

- density lipoprotein receptor in transfected fibroblasts. *J Biol Chem* 1986;**261**: 2828-2838.
121. Schwarz JM, Rödelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods* 2010;**7**:575-576.
 122. Mutation Taster. [Internet]. Disponível *online* em: <http://www.mutationtaster.org/> (acedido em 09.09.2012).
 123. SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant). [Internet]. Disponível *online* em: <http://sift.bii.a-star.edu.sg/> (acedido em 09.09.2012).
 124. PolyPhen-2 (polymorphism phenotyping v2). [Internet]. Disponível *online* em: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> (acedido em 09.09.2012).
 125. Wright WT, Young IS, Nicholls D, Graham CA. Genetic screening of the LPL gene in hypertriglyceridaemic patients. *Atherosclerosis* 2008;**199**:187-192.
 126. Faustinella F, Chang A, Van Biervliet JP, Rosseneu M, Vinaimont N, Smith LC, Chen SH, Chan L. Catalytic triad residue mutation (Asp¹⁵⁶→Gly) causing familial lipoprotein lipase deficiency: co-inheritance with a nonsense mutation (Ser⁴⁴⁷→Ter) in a Turkish family. *J Biol Chem* 1991;**266**:14418-14424.
 127. Ensembl 2012. [Internet]. Disponível *online* em: <http://www.ensembl.org/index.html> (acedido em 02.10.2012).
 128. Rees A, Stocks J, Sharpe CR, Vella MA, Schoulders CC, Katz J, Jowett NI, Baralle FE, Galton DJ. Deoxyribonucleic acid polymorphism in the apolipoprotein A-1-C-III gene cluster. Association with hypertriglyceridemia. *J Clin Invest* 1985;**76**:1090-1095.
 129. Delgado-Lista J, Perez-Jimenez F, Ruano J, Perez-Martinez P, Fuentes F, Criado-Garcia J, Parnell LD, Garcia-Rios A, Ordovas JM, Lopez-Miranda J. Effects of variations in the APOA1/C3/A4/A5 gene cluster on different parameters of postprandial lipid metabolism in healthy young men. *J Lipid Res* 2010;**51**:63-73.
 130. van der Vleuten GM, Isaacs A, Zeng WW, ter Avest E, Talmud PJ, Dallinga-Thie GM, van Duijn CM, Stalenhoef AFH, de Graaf J. Haplotype analyses of the APOA5 gene in patients with familial combined hyperlipidemia. *Biochim Biophys Acta* 2007;**1772**: 81-88.
 131. Hodoğlugil U, Tanyolaç S, Williamson DW, Huang Y, Mahley RW. Apolipoprotein A-V: a potential modulator of plasma triglyceride levels in Turks. *J Lipid Res* 2005;**47**:144-153.
 132. Davis CG, Goldstein JL, Südhof TC, Anderson RGW, Russell DW, Brown MS. Aciddependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* 1987;**326**:760-765.
 133. Chang JH, Pan JP, Tai DY, Huang AC, Li PH, Ho HL, Hsieh HL, Chou SC, Lin WL, Lo E, Chang CY, Tseng J, Su MT, Lee-Chen GJ. Identification and characterization of LDL receptor gene mutations in hyperlipidemic Chinese. *J Lipid Res* 2003;**44**: 1850-1858.
 134. Bodamer OA, Bercovich D, Schlabach M, Ballantyne C, Zoch D, Beaudet AL. Use of denaturing HPLC to provide efficient detection of mutations causing familial hypercholesterolemia. *Clin Chem* 2002;**48**:1913-1918.
 135. Bourbon M. Characterization of molecular defects in Portuguese patients with familial Hypercholesterolaemia. PhD thesis in the University of London, 2005.
 136. Garuti R, Lelli N, Barozzini M, Tiozzo R, Ghisellini M, Simone ML, Li Volti S, Garozzo R, Mollica F, Vergoni W, Bertolini S, Calandra S. Two novel partial deletions of LDL-receptor gene in Italian patients with familial hypercholesterolemia (FH Siracusa and FH Reggio Emilia). *Atherosclerosis* 1996;**121**:105-117.
 137. Bourbon M, Sun XM, Soutar AK. A rare polymorphism in the low density lipoprotein (LDL) gene that affects mRNA splicing. *Atherosclerosis* 2007;**195**:e17-e20.
 138. Olano-Martin E, Abraham EC, Gill-Garrison R, Valdes AM, Grimaldi K, Tang F, Jackson KG, Williams CM, Minihane AM. Influence of apoA-V gene variants on postprandial triglyceride metabolism: impact of gender. *J Lipid Res* 2008;**49**:945-953.

Anexos

Anexo A – Inquérito clínico de um caso-índice do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

Anexo B – Inquérito clínico de um familiar do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

Anexo C – Especificações associadas às determinações bioquímicas realizadas no Daytona

Tabela C.1. Soluções de trabalho utilizadas para as determinações bioquímicas efectuadas no aparelho Daytona (Randox) e intervalos de referência recomendados pelo fabricante

Parâmetro a quantificar	Soluções específicas de cada parâmetro	Intervalo recomendado para o qual o indivíduo deve ser considerado normolipidémico (mg/dL)
apoE	R1 – tampão de ensaio Tris/HCl 100 mmol/L pH 8,5	2,7 - 4,5
	R2 – Anticorpo anti-apoE-humana	
apoA-II	R1 – Tampão de ensaio Tris/HCl 100 mmol/L pH 8,5	25,1 - 34,5
	R2 – Anticorpo anti-apoA-II-humana	
apoC-II	R1 – Tampão de ensaio Tris/HCl 100 mmol/L pH 8,5	1,6 - 4,2
	R2 – Anticorpo anti-apoC-II-humana	
apoC-III	R1 – Tampão de ensaio Tris/HCl 100 mmol/L pH 8,5	5,5 - 9,5
	R2 – Anticorpo anti-apoC-III-humana	
Colesterol associado às sdLDL	R1 – Tampão Good pH 7,0; colesterol esterase 1600 U/L; colesterol oxidase 600 U/L; esfingomielinase 2700 U/L; catalase 1200 kU/L; N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilnilina 2,0 mmol/L; Albumina sérica de bovino 1,0% (m/v)	Grupo 1*: 5,1 - 60,8 Grupo 2*: 8,9 - 64,4
	R2 – Tampão Good pH 7,0; Peroxidase 5000 U/L; 4-aminoantipirina 4.0 mmol/L; Azida sódica 0,05% (m/V)	

apo, apolipoproteína; sdLDL, *small dense low density lipoprotein*; *, para o colesterol associado às sdLDL, o fabricante refere que se podem considerar dois intervalos de referência, um aplicado ao grupo 1 em que se incluem indivíduos mais jovens (o fabricante inclui neste grupo homens dos 21 aos 44 anos e mulheres dos 21 aos 54 anos) e outro aplicado ao grupo 2 (o fabricante inclui neste grupo homens dos 45 aos 75 anos e mulheres dos 55 aos 75 anos).

Anexo D – Preparação de soluções

- Soluções necessárias para o procedimento de extração de DNA

- Tris/HCl 1 M, pH 7,5: dissolver 12,114 g de Tris em H₂O; ajustar o pH a 7,5 (com HCl) antes de perfazer o volume de 100 mL com H₂O; armazenar à temperatura ambiente.
- KCl 1 M: dissolver 7,45 g de KCl em 100 mL de H₂O; armazenar à temperatura ambiente.
- MgCl₂ 1 M: dissolver 20,33 g de MgCl₂ em 100 mL de H₂O; armazenar à temperatura ambiente.
- EDTA 0,5 M: dissolver 18,6 g de EDTA em 100 mL de H₂O; armazenar à temperatura ambiente.
- SDS 10% (m/v): dissolver 10 g em 100 mL de H₂O; armazenar à temperatura ambiente.
- NaCl 5 M: dissolver 29,2 g de NaCl em 100 mL de H₂O; armazenar à temperatura ambiente.
- TKM1: 5 mL Tris/HCl 1 M, pH 7,5; 5 mL KCl 1 M; 5 mL MgCl₂ 1 M; 2 mL EDTA 0,5 M; perfazer com H₂O até 500 mL; autoclavar a 110°C, durante 15 minutos; armazenar à temperatura ambiente.
- TKM2: 1 mL Tris/HCl 1 M, pH 7,5; 1 mL KCl 1 M; 1 mL MgCl₂ 1 M; 400 µL EDTA 0,5 M; 8 mL NaCl 5 M; perfazer com H₂O até 100 mL; autoclavar a 110°C, durante 15 minutos; armazenar à temperatura ambiente.
- TKM X-100: 5 mL KCl 1 M; 5 mL MgCl₂ 1 M; 2 mL EDTA 0,5 M; 12,5 mL Triton X-100; perfazer com H₂O até 500 mL; autoclavar a 110°C, durante 15 minutos; armazenar à temperatura ambiente.

- Solução de deposição a utilizar na preparação de amostras submetidas a electroforese

Adicionar 625 μL de Glicerol a 625 μL de H_2O ; adicionar 2,5 μL de EDTA 0,5 M; juntar azul de bromofenol q.b.

- Solução de marcador de peso molecular PUC (Fermentas) utilizada nas electroforeses em gel de agarose

Adicionar 20 μL de solução stock de marcador (PUC ladder, Fermentas) a 40 μL de H_2O ; adicionar 10 μL de solução de aplicação para gel de agarose (6 \times *DNA Loading Dye*, Fermentas); misturar cuidadosamente.

Anexo E – Condições da técnica de amplificação de DNA

- Genes *LDLR* e *APOB*

Tabela E.1. Primers utilizados nas reacções de PCR e sequenciação do gene *LDLR*

Região a amplificar (<i>LDLR</i>)	Primer	Sequência 5'→3' do primer	Fragmento amplificado (pb)	Temperatura de annealing (°C)
Promotor +Exão 1	SPr+1F SPr+1R	F: ACAAATCAAGTCGCCTGCCC R: GCCATTACCCACAAGTCTCC	480	59
Exão 2	2F 2R	F: TCCCATACCCAGAGAGTCCATA R: CAGCCGCCATCAAAAAG	587	58
Exão 3	LDL3F1 MB260	F: GGTTCCTACTATATTGGCCAGG R: CTCCCCAGGACTCAGATAGG	330	59
Exão 4	EX4F EX4R Seq: R4F(*)	F: GTACAGATGAGGAACTGAG R: TTGGCATGTGTGGAAATCC F:GAGGAAACTGAGGCACCGA	677	57
Exão 5	EX5F NEW EX5R NEW	F: GCAAAAAGGCCCTGCTTCTTT R: GAGGCTCTGAGAAGTCAAGT	342	58
Exão 6	EX6F EX6R	F: ATTACAGGCACAAACCACCGTG R: GCAGAGTGGAGTTCCCAAAACC	370	59
Exão 7	LDL 7F LDL 7R	F: GAGTGACCAGTCTGCATCCC R: GAAGCGCAGAGGGGGCCAG	198	63
Exão 8	MB30 MB31	F: ATCTCCCAGAGGCTGGGCTGTCT R: CCCGGTCAGGGGATATGAGTCTGT	361	59
Exão 9	EX9+10F MB277	F: GGTCTTTTCCACCCTCTTTTTC R: CTGAGGCAGGAGGAGAGAAG	379	59
Exões 9+10	EX9+10F MB35	F: GGTCTTTTCCACCCTCTTTTTC R: GTGCTGGGATTACAGGTGCTTTGA	738	60
Exão 10	MB34 MB35	F: CCTTGGCCCCGAGGTGAGA R: GTGCTGGGATTACAGGTGCTTTGA	403	62
Exão 11	EX11F EX11R	F: GCCACATTTGGAGTTTGGGGTTC R: AGCAGCTTGGGCTTGTCGAGAG	355	60
Exão 12	EX12F EX12R	F: GGTGCTTTTCTGCTAGGTCC R: TTTTCTGCGTTCATCTTGGCT	347	59
Exão 13	EX13F EX13R	F: CTAGTTGTGGAGAGAGGGTGGC R: GCGGAGTCAGGGCAGGAACGAG	275	60
Exão 14	EX14F EX14R	F: GAAACCTCCTTGTTGAAACTCT R: GAAAAGTATGGTTATCCCGACT	388	58
Exão 15	EX15F EX15R	F: CCAAGGTCATTTGAGACTTTCGT R: GAGAGAAGGTGAGCAAGGGAGTG	388	60
Exão 16	EX16F EX16R	F: GTCCTCTGCCTGCTCCATTCTT R: ATCCTCCATCTGACCCCTTAGC	350	60
Exão 17	R17F R17R	F: GAGCTGGGTCTCTGGTCTCG R: GCGCACAGAAGCATTACCT	500	60
Exão 18	EX18F EX18R	F: GAGCGGTGGGAAGTGAATGAAT R: TGGTGCCATCTGCTGTTGTGTG	580	59

A amplificação do exão 3 foi realizada com a enzima *Platinum[®] Taq DNA Polymerase* e a dos restantes exões com a enzima *GoTaq[®] DNA Polymerase*; Utilizou-se 1,5 mM de Mg²⁺ na amplificação de todos os exões; Nas reacções de sequenciação foram utilizados os primers forward de PCR, excepto para a sequenciação dos exões 11 e 15 em que se utilizou o reverse de PCR e do exão 4 em que se utilizou o primer R4F(*); F, primer forward; pb, pares de bases; R, primer reverse; Seq, sequenciação; °C, grau Celsius.

Tabela E.2. Primers utilizados nas reacções de PCR e sequenciação do gene *APOB*

Região a amplificar (<i>APOB</i>)	Primer	Sequência 5'→3' do primer	Fragmento amplificado (pb)	Temperatura de annealing (°C)
Exão 26	P61 P62	F: GGAGCAGTTGACCACAAGCTTAGCTTGAA R: GGGTGGCTTTGCTTGTATGTTCTCCGT	343	59
Exão 29	MB63 MB64	F: CCAAGATGAGATCAACACAATC R: AACTTGACTTGAGAGTTGGG	334	59

A amplificação foi realizada com a enzima *GoTaq*[®] *DNA Polymerase*; Utilizou-se 1,5 mM de Mg²⁺ na amplificação de todos os exões; Nas reacções de sequenciação foi utilizado o primer *reverse* de PCR para o exão 26 e o *forward* de sequenciação para o exão 29; F, *primer forward*; pb, pares de bases; R, *primer reverse*; °C, grau Celsius.

Tabela E.3. Programa utilizado nas reacções de PCR dos genes *LDLR* e *APOB*

Temperatura (°C)	Tempo
95	3 minutos
94	45 segundos
[57-63]*	30 segundos
72	1 minuto
72	5 minutos
4	∞

} 35 ciclos

*, As temperaturas de *annealing* dos fragmentos a amplificar encontram-se nas tabelas E.1 e E.2; ∞, infinito; °C, grau Celsius; PCR, reacção em cadeia da polimerase.

- Gene *PCSK9*Tabela E.4. *Primers* utilizados nas reacções de PCR e sequenciação do gene *PCSK9*

Região a amplificar (LDLR)	Primer	Sequência 5'→3' do primer	Fragmento amplificado (pb)	Temperatura de annealing (°C)
Promotor +Exão 1	MB1 MB3	F: GGAGGGCGAGGCCGAAACCTGAT R: CTCGGCGACCTGCACTCCACTTCC	740	65
Exão 2	MB261 MB262	F: GCTGGGTTTCTTCCATGTCATCAT R: CGATAAGTGCTCAATACATACTTGCT:	340	54,5
Exão 3	890 891	F: CTCTATGCCAGACCGTGTTG R: GTGCTGAGTCCCAAAGCC	420	55,5
Exão 4+5	MB263 MB264	F: AGGTTGACTTTATGCTCATTCCCT R: TAGGAGACATTAGCTCTCCCTGG	610	60
Exão 6	892 893	F: TCGCAGCAGCATTTCCAC R: TCCAAAGCCAGAAGGGTTC	450	57,5
Exão 7	MB98 MB99	F: GGCCTGAGTCTGCCTCTGC R: ACCCTGACTGCCAAAGGGGC	330	65
Exão 8	MB100 MB101	F: CACTGGCAGGAGTCCCCTGC R: AGGTCACACAGACCTCCCAAGC	320	64
Exão 9	MB199 MB200	F: GTAAGGAGGATGATGCCACC R: TTACAGAAGAGCTGGAGTCTGG	450	63
Exão 10	896 897	F: AGCTCCTTGTCCTCCAGAAG R: GAGTATGGAAGTCAAGTCAGG	390	56,5
Exão 11	MB6 MB7	F: ATGGGCACTGGAGACGGAGCATC R: GGCGGTATGGTGGTGGCACAAA	300	62
Exão 12	874 875	F: GTGGGAGATACACGGTTGTGTCC R: TGGGGAGGAGGCACCCAGAGT	530	56

A amplificação dos exões 1, 8, 10, 11 e 12 foi realizada com a enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase*, tendo-se usado 0,75 mM de Mg²⁺ para o exão 12, 1 mM de Mg²⁺ para os exões 1 e 11, 1,5 mM de Mg²⁺ para o exão 10 e 2,5 mM de Mg²⁺ para o exão 8; Os restantes exões foram amplificados com a enzima *GoTaq® DNA Polymerase*, tendo-se usado 0,5 mM de Mg²⁺ para o exão 6, 1 mM de Mg²⁺ para o fragmento que engloba os exões 4+5, 1,5 mM de Mg²⁺ para o exão 9 e 3mM de Mg²⁺ para os exões 2, 3 e 7; Nas reacções de sequenciação foram utilizados os *primers forward* de PCR, F, *primer forward*; pb, pares de bases; R, *primer reverse*; °C, grau Celsius.

Tabela E.5. Programa utilizado nas reacções de PCR do gene *PCSK9*

Temperatura (°C)	Tempo
94	5 minutos
94	30 segundos
[54,5-62]*	50 segundos
72	1 minuto
72	7 minutos
4	∞

35-42 ciclos

, As temperaturas de *annealing* dos fragmentos a amplificar encontram-se na tabela E4; ∞, infinito; °C, grau Celsius; PCR, reacção em cadeia da polimerase.

- Gene *LPL*Tabela E.6. *Primers* utilizados nas reacções de PCR e sequenciação do gene *LPL*

Região a amplificar (<i>LPL</i>)	Primer	Sequência 5'→3' do primer	Fragmento amplificado (pb)	Temperatura de annealing (°C)
Promotor	MB134 MB135	F: AAACAGGATTCGTCAAAAAGA R: CTAGAAGTGGGCAGCTTTC	435	55
Exão 1	MB102 MB103	F:GCCAATAGGTGATGAGGTTT R:CTTCTTCTCATCCTCAGTTCG	422	56
Exão 2	MB104 MB105	F: GTGGTTGCCTGTGAACCTA R: GCAGGCCAGTCAGGATAC	311	58
Exão 3	MB106 MB107	F: CAATGGGTTTCCAATCAAGT R: TTCTGGCTCCAGTCAAAAAC	353	54
Exão 4	MB108 MB109	F: GGCAGAACTGTAAGCACCT R: TCAGAATGACAGTCTTTTCACC	209	57
Exão 5	MB110 MB111	F: AGTGCATTCAAATGATGAGC R: TGGCCAAATGTGTATATGAAA	433	57
Exão 6	MB112 MB113	F: CCTATTTTAGACATGCCAAATG R: TGTCCAATGGACAGAATC	414	54
Exão 7	MB114 MB115	F: TGAATTGCCTGACTATTTGG R: CTGCTCAGACCAAGGGTTAT	265	57
Exão 8	MB116 MB117	F: TTTGTTGGACATTTTTGTGC R: TGGGGGTCTAAAGTGAAGG	360	59
Exão 9	MB118 MB119	F: TCCTGACAGAACTGTACCTTTG R: ATGAAGCTGCCTCCCTTAG	248	57
Exão 10	MB120 MB121	F: ACAGGCGGGAATTGTAAAAC R: AACGTTGGAGGATGTGCTAT	300	58

A amplificação de todos os exões foi realizada com a enzima *GoTaq*[®] *DNA Polymerase*, tendo-se usado 1 mM de Mg²⁺ para o promotor e os exões 1, 2, 7, 8, 9 e 10 e 1,5 mM de Mg²⁺ para os exões 3, 4, 5 e 6; Nas reacções de sequenciação foram utilizados os *primers forward* de PCR, F, *primer forward*; pb, pares de bases; R, *primer reverse*; °C, grau Celsius.

Tabela E.7. Programa utilizado nas reacções de PCR do gene *LPL*

Temperatura (°C)	Tempo
95	3 minutos
94	45 segundos
[54-59]*	30 segundos
72	1 minuto
72	7 minutos
4	∞

} 35 ciclos

*, As temperaturas de *annealing* dos fragmentos a amplificar encontram-se na tabela E.6; ∞, infinito; °C, grau Celsius; PCR, reacção em cadeia da polimerase.

- Gene *APOC2*Tabela E.8. *Primers* utilizados nas reacções de PCR e sequenciação do gene *APOC2*

Região a amplificar (<i>APOC2</i>)	Primer	Sequência 5'→3' do primer	Fragmento amplificado (pb)	Temperatura de annealing (°C)
Exão 2	MB154 MB155	F: CACAGAGCAGGATCTCAGTC R: AAGATGCTTGGAGCTCATT	227	55
Exão 3	MB156 MB157	F: TCTTCTTCCTTCCTCCTTTC R: GATGCAGTCGGTGGTATG	280	56
Exão 4	MB237 MB238	F: CCTCCTCCCTCTAACCATCT R: GAGGAGGATGCAAGAGCTAC	229	58

A amplificação dos exões foi realizada com a enzima *GoTaq*[®] *DNA Polymerase*, tendo-se usado 0,75 mM de Mg²⁺ para o exão 4 e 1 mM de Mg²⁺ para os exões 2 e 3; Nas reacções de sequenciação foram utilizados os *primers forward* de PCR, F, *primer forward*; pb, pares de bases; R, *primer reverse*; °C, grau Celsius.

Tabela E.9. Programa utilizado nas reacções de PCR do gene *APOC2*

Temperatura (°C)	Tempo
95	3 minutos
94	45 segundos
[55-58]*	30 segundos
72	1 minuto
72	7 minutos
4	∞

} 35 ciclos

*, As temperaturas de *annealing* dos fragmentos a amplificar encontram-se na tabela E.8; ∞, infinito; °C, grau Celsius; PCR, reacção em cadeia da polimerase.

- Gene *APOC3*Tabela E.10. *Primers* utilizados nas reacções de PCR e sequenciação do gene *APOC3*

Região a amplificar (<i>APOC3</i>)	Primer	Sequência 5'→3' do primer	Fragmento amplificado (pb)	Temperatura de annealing (°C)
Exão 2	MB160 MB161	F: CCTTCTGAGAGCCCGTATTA R: CTGCTTGACCACCCATTG	297	57
Exão 3	MB162 MB163	F: CAATGGGTGGTCAAGCAG R: ATICCATTTGTTGGGATCTCA	288	57
Exão 4	MB187 MB188	F: TGTCGTCCAGTGAAGTTGAG R: CTGACCTGGAGTCTGTCCA	532	55

A amplificação dos exões foi realizada com a enzima *GoTaq*[®] *DNA Polymerase*, tendo-se usado 1 mM de Mg²⁺; Nas reacções de sequenciação foram utilizados os *primers forward* de PCR, F, *primer forward*; pb, pares de bases; R, *primer reverse*; °C, grau Celsius.

Tabela E.11. Programa utilizado nas reacções de PCR do gene *APOC3*

Temperatura (°C)	Tempo
95	3 minutos
94	45 segundos
[55-59]*	30 segundos
72	1 minuto
72	7 minutos
4	∞

} 35 ciclos

*, As temperaturas de *annealing* dos fragmentos a amplificar encontram-se na tabela E.10; ∞, infinito; °C, grau Celsius; PCR, reacção em cadeia da polimerase.

- Genes *APOA4*

Tabela E.12. Primers utilizados nas reacções de PCR e sequenciação do gene *APOA4*

Região a amplificar (<i>APOA4</i>)	Primer	Sequência 5'→3' do primer	Fragmento amplificado (pb)	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)
Exão 1	MB136 MB137	F: GAGTCACACTGAGGAAGGAG R: CATCTGCACTACTCAGAGC	313	56
Exão 2	MB138 MB139	F: CTAAGCTCAGACAGGGAAAA R: TTTAAGAATTCCCCGTCAC	298	58
3' (Exão 3)	MB140 MB141	F: GAACTCGGTACCTCTGAGC R: ACTCTCTCCATGCGCTGT	451	56
3'' (Exão 3)	MB142 MB143	F: GACAACCTGCCGAGAGCTT R: AGCTCTGCCAGTGACTTCT	500	56
3''' (Exão 3)	MB144 MB145	F: CTTCCAGATGAAGAAGAACG R: CAGAACTTCTTTGGGACAGA	551	55

A amplificação dos exões foi realizada com a enzima *GoTaq*[®] *DNA Polymerase*, tendo-se usado 0,5 mM de Mg²⁺ para o fragmento 3'' do exão 3 e 1 mM de Mg²⁺ para os restantes fragmentos; Nas reacções de sequenciação foram utilizados os *primers forward* de PCR, F, *primer forward*; pb, pares de bases; R, *primer reverse*; °C, grau Celsius.

Tabela E.13. Programa utilizado nas reacções de PCR do gene *APOA4*

Temperatura (°C)	Tempo
95	3 minutos
94	45 segundos
[55-58]*	30 segundos
72	1 minuto
72	7 minutos
4	∞

} 35 ciclos

*, As temperaturas de *annealing* dos fragmentos a amplificar encontram-se na tabela E.12; ∞, infinito; °C, grau Celsius; PCR, reacção em cadeia da polimerase.

- Gene *APOA5*Tabela E.14. *Primers* utilizados nas reacções de PCR e sequenciação do gene *APOA5*

Região a amplificar (<i>APOA5</i>)	Primer	Sequência 5'→3' do primer	Fragmento amplificado (pb)	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)
Promotor	MB185 MB186	F: ACTGTAGACGGAGTGGGTGT R: AGGGTTAAAGACCAACCACA	241	57
Exões 1+2	MB146 MB147	F: AGGGGTAACAGGATTTTCG R: CAGCTGTCTCCTCCCTTC	447	55
3' (Exão 3)	MB148 MB149	F: AAGGAGATGATGGAGGCTA R: GGCATATGGGTGGAAGAG	475	57
3 (Exão 3)	MB235 MB236	F: GAGTTGGAGGAGGTGAAGG R: AGACAAGGAGCTGGGAATG	845	60

A amplificação dos exões foi realizada com a enzima *GoTaq*[®] *DNA Polymerase*, tendo-se usado 0,5 mM de Mg²⁺ para o fragmento 1+2 e para os fragmentos 3' e 3 do exão 3 e 1 mM de Mg²⁺ para o promotor; Nas reacções de sequenciação foram utilizados os *primers forward* de PCR, F, *primer forward*; pb, pares de bases; R, *primer reverse*; °C, grau Celsius.

Tabela E.15. Programa utilizado nas reacções de PCR do gene *APOA5*

Temperatura (°C)	Tempo
95	3 minutos
94	45 segundos
[55-59] [*]	30 segundos
72	1 minuto
72	7 minutos
4	∞

} 35 ciclos

^{*}, As temperaturas de *annealing* dos fragmentos a amplificar encontram-se na tabela E.14; ∞, infinito; °C, grau Celsius; PCR, reacção em cadeia da polimerase.

Anexo F – Condições específicas da técnica de cromatografia líquida de elevada performance desnaturante (dHPLC)**Tabela F.1. Temperaturas utilizadas na cromatografia líquida de alta performance desnaturante (dHPLC)**

Gene	Exão	Temperatura de desnaturação (°C)
<i>LDLR</i>	3	63,5
	4	64
	5	63
	9	63
	17	62

°C, grau Celsius.

Anexo G – Condições das técnicas de purificação e sequenciação de DNA**Tabela G.1. Programa utilizado na purificação de todos os genes em estudo**

Temperatura (°C)	Tempo
37	15 minutos
80	15 minutos
4	∞

°C, grau Celsius; ∞, infinito.

Tabela G.2. Programa utilizado na sequenciação de todos os genes em estudo

Temperatura (°C)	Tempo
96	1 minuto
96	10 segundos
58	5 segundos
55	4 minutos
4	∞

25 ciclos

°C, grau Celsius; ∞, infinito.

Anexo H – Especificações da técnica de *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA)

Tabela H.1. Mistura de sondas (SALSA MLPA probemix P062-C2 LDLR; MRC-Holland) utilizada na técnica de *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA)

Sonda SALSA MLPA	Dimensão da sonda (nucleótidos)	Posição cromossomal	
		Controlo	LDLR
Fragmentos Q - controlo	64-70-76-82		
Fragmentos D - controlo	88-92-96		
Fragmento X - controlo	100		
Fragmento Y - controlo	105		
Sonda controlo 01819-L10850	136	16p13	
Sonda SMARCA4 02488-L13996	142		Montante (<i>upstream</i>)
Sonda LDLR 02309-L01800	148		Exão 1
Sonda controlo 14744-L16441	154	1q23	
Sonda LDLR 02310-L01801	160		Exão 2b
Sonda LDLR 02311-L01802	166		Exão 11
Sonda controlo 01114-L00383	175	5q13	
Sonda LDLR 02312-L01803	184		Exão 3
Sonda LDLR 02313-L01804	193		Exão 12
Sonda controlo 01116-L00620	202	8q21	
Sonda LDLR 02314-L01805	212		Exão 4 ^a
Sonda LDLR 11838-L12635	220		Exão 14
Sonda controlo 16918-L19862	229	7p14	
Sonda LDLR 02316-L01807	238		Exão 5
Sonda LDLR 02317-L01808	247		Exão 15
Sonda controlo 00518-L00098	256	2q13	
Sonda LDLR 02318-L01809	265		Exão 6
Sonda LDLR 02319-L01810	274		Exão 16
Sonda controlo 01326-L00873	283	17p13	
Sonda LDLR 02320-L01811	292		Exão 7
Sonda LDLR 02321-L01812	301		Exão 17
Sonda controlo 15380-L17211	310	3p22	
Sonda LDLR 02322-L09533	319		Exão 8
Sonda LDLR 02323-L01814	328		Exão 18a
Sonda LDLR 02324-L01815	346		Exão 9
Sonda KANK2 02325-L01816	355		Jusante (<i>downstream</i>)
Sonda controlo 01234-L12680	364	10p14	
Sonda controlo 14947-SP0234-L16680	372	6q22	
Sonda LDLR 03003-L02442	391		Exão 10
Sonda LDLR 03004-L12681	400		Exão 13
Sonda LDLR 10781-L11396	427		Exão 15
Sonda LDLR 06281-L12682	436		Exão 1
Sonda controlo 08793-L08817	445	10q21	

Anexo I – Caracterização bioquímica e clínica da amostra

Tabela I.1. Caracterização bioquímica dos casos-índice que constituem o grupo pediátrico

Caso-índice	Idade	Sexo	DCV	XT	CT (a)	c-LDL (a)	c-HDL (a)	TG (a)	CT (b)	c-LDL (b)	c-HDL (b)	TG (b)	apoA-I (b)	apoB (b)	Lp(a) (b)	História familiar		
																HC	XT	DCV
10227	13	F	N	N	227	149	55	113	269	183	61	84	181	104	8	S	N	S
11029	10	F	N	N	276	158	75	276	239	145	79	54	181	73	8	S	N	N
11215	12	F	N	N	365	243	106	82	195	109	84	65	187	67	9	S	N	N
11225	12	M	N	N	211	-	57	85	216	144	62	72	162	89	52	S	N	N
11228	11	M	N	N	229	-	-	-	160 ^c	89 ^c	60 ^c	53 ^c	170 ^c	56 ^c	172 ^c	S	N	S
11258	4	M	N	N	337	279	50	-	333	260	57	52	147	151	82	S	N	N
11280*	16	F	N	N	291	181	91	196	310	177	94	202	259	139	50	S	N	N
11311	7	F	N	N	273	208	53	75	236	178	38	55	107	115	9	S	N	S
11326	12	M	N	N	325	260	60	44	303	229	48	54	135	155	42	S	N	N
11335	12	F	N	N	270	216	33	105	286	231	35	85	103	152	10	S	N	S
11349	16	M	N	N	241	191	33	53	251	196	44	47	108	127	168	S	N	S
12016	10	F	N	N	238	178	45	78	233	162	60	56	141	104	34	S	N	N
12021	11	F	N	N	248	174	76	52	228	141	70	48	147	95	11	S	N	N
12025	4	F	N	N	387	313	59	73	280	197	31	172	102	144	13	S	N	N
12026	14	M	N	N	243	195	37	59	167 ^c	119 ^c	32 ^c	35 ^c	93 ^c	86 ^c	22 ^c	S	-	-
12035	11	M	N	N	230	162	-	57	224	159	45	90	130	107	46	S	N	N
12037	16	M	N	N	331	-	-	-	323	232	62	112	153	150	9	S	N	N

Os valores de CT, c-LDL, c-HDL, TG, apoA-I, apoB e Lp(a) encontram-se em mg/dL; *, caso-índice em que se estudou a hipercolesterolemia familiar, a deficiência familiar em LPL e a dislipidemia familiar combinada; (a), valores antes da medicação; (b), valores presentes determinados no estudo; ^c, valores presentes em tratamento. Abreviaturas: CT, colesterol total; c-HDL, colesterol associado à lipoproteína de elevada densidade; c-LDL, colesterol associado às lipoproteínas de baixa densidade; DCV, doença cardiovascular; F, feminino; HC, hipercolesterolemia; Lp(a), lipoproteína(a); M, masculino; N, não; S, sim; TG, triglicéidos; XT, xantomas.

Tabela I.2. Caracterização clínica dos casos-índice que constituem o grupo de adultos

Caso-índice	Idade	Sexo	DCV	XT	CT (a)	c-LDL (a)	c-HDL (a)	TG (a)	CT (b)	c-LDL (b)	c-HDL (b)	TG (b)	apoA-I (b)	apoB (b)	Lp(a) (b)	História familiar		
																HC	XT	DCV
11035	62	F	N	N	>300	-	-	-	279 ^c	183 ^c	34 ^c	140 ^c	131 ^c	135 ^c	35 ^c	-	-	-
11230	35	F	N	N	350	253	52	69	290 ^c	224 ^c	49 ^c	54 ^c	158 ^c	135 ^c	8 ^c	S	N	N
11242	22	F	N	N	285	179	76	114	297	202	76	65	241	130	8	S	N	S
11247	33	F	N	N	317	238	64	97	241 ^c	154 ^c	71 ^c	72 ^c	214 ^c	116 ^c	12 ^c	S	N	N
11251	30	M	N	N	296	232	49	74	189 ^c	122 ^c	45 ^c	53 ^c	132 ^c	90 ^c	41 ^c	S	N	S
11268 [*]	39	M	S	N	370	-	-	900	-	-	-	-	-	-	-	S	N	S
11269	19	F	N	N	356	281	75	112	228 ^c	115 ^c	90 ^c	202 ^c	247 ^c	106 ^c	99 ^c	S	N	S
11305	42	F	N	N	-	-	-	90	265 ^c	164 ^c	76 ^c	55 ^c	216 ^c	125 ^c	9 ^c	-	-	-
11324 [*]	42	F	N	N	341	265	44	259	194 ^c	115 ^c	32 ^c	54 ^c	122 ^c	102 ^c	64 ^c	S	N	S
11325	51	F	N	N	362	220	121	90	287	119	150	85	254	107	186	-	-	-
11340	^d	M	N	N	407	294	76	64	228 ^c	145 ^c	72 ^c	47 ^c	174 ^c	127 ^c	9 ^c	S	N	N
11341	^d	M	N	N	301	195	69	114	172 ^c	76 ^c	76 ^c	56 ^c	199 ^c	72 ^c	9 ^c	N	N	N
11343	^d	M	N	S(AC)	420	260	51	64	219 ^c	144 ^c	58 ^c	48 ^c	158 ^c	106 ^c	168 ^c	S	N	N
11344	^d	M	S	N	331	248	49	165	164 ^c	76 ^c	64 ^c	165 ^c	191 ^c	81 ^c	9 ^c	N	N	N

Os valores de CT, c-LDL, c-HDL, TG, apoA-I, apoB e Lp(a) encontram-se em mg/dL; *, casos-índice em que se estudou a hipercolesterolemia familiar, a deficiência familiar em LPL e a dislipidemia familiar combinada; (a), valores antes da medicação; AC, *arcus cornealis*; apo, apolipoproteína; (b), valores presentes determinados no estudo; ^c, valores presentes em tratamento; CT, colesterol total; c-HDL, colesterol associado às lipoproteínas de elevada densidade; c-LDL, colesterol associado às lipoproteínas de baixa densidade; ^d, embora não se tivesse informação sobre a idade, considerou-se, a partir das árvores genealógicas da família, que se tratava de um adulto; DCV, doença cardiovascular; F, feminino; HC, hipercolesterolemia; Lp(a), lipoproteína(a); M, masculino; N, não; S, sim; TG, triglicéridos; XT, xantomas.

Tabela I.2. (continuação). Caracterização clínica dos casos-índice que constituem o grupo de adultos

Caso-índice	Idade	Sexo	DCV	XT	CT (a)	c-LDL (a)	c-HDL (a)	TG (a)	CT (b)	c-LDL (b)	c-HDL (b)	TG (b)	apoA-I (b)	apoB (b)	Lp(a) (b)	História familiar		
																HC	XT	DCV
11346	^d	M	N	N	295	200	63	165	232 ^c	144 ^c	76 ^c	125 ^c	194 ^c	119 ^c	20 ^c	N	N	N
12003	44	M	S	S(AC)	-	351	27	162	386 ^c	292 ^c	54 ^c	190 ^c	158 ^c	206 ^c	117 ^c	S	N	S
12010	47	M	S	N	358	-	35	108	257	195	37	94	109	149	106	S	N	S
12013	36	F	N	S	352	-	-	-	357 ^c	287 ^c	43 ^c	106 ^c	118 ^c	192 ^c	164 ^c	-	-	-
12029 [*]	40	M	N	N	349	231	45	247	381 ^c	279 ^c	48 ^c	216 ^c	140 ^c	223 ^c	20 ^c	S	N	N
12040	61	F	S	N	587	401	69	67	389 ^c	293 ^c	65 ^c	122 ^c	158 ^c	192 ^c	36 ^c	S	N	N
12041	58	M	S	N	402	287	93	108	374 ^c	231 ^c	113 ^c	98 ^c	273 ^c	152 ^c	109 ^c	S	N	S
12058	49	M	N	N	450	-	-	-	202 ^c	139 ^c	41 ^c	118 ^c	130 ^c	125 ^c	44 ^c	S	N	S
12060 [*]	43	M	N	N	310	175	40	355	180 ^c	103 ^c	58 ^c	152 ^c	152 ^c	170 ^c	81 ^c	S	N	N

Os valores de CT, c-LDL, c-HDL, TG, apoA-I, apoB e Lp(a) encontram-se em mg/dL; ^{*}, casos-índice em que se estudou a hipercolesterolemia familiar, a deficiência familiar em LPL e a dislipidemia familiar combinada; (a), valores antes da medicação; AC, *arcus cornealis*; apo, apolipoproteína; (b), valores presentes determinados no estudo ^c, valores presentes em tratamento; CT, colesterol total; c-HDL, colesterol associado às lipoproteínas de elevada densidade; c-LDL, colesterol associado às lipoproteínas de baixa densidade; ^d, embora não se tivesse informação sobre a idade, considerou-se, a partir das árvores genealógicas da família, que se tratava de um adulto; DCV, doença cardiovascular; F, feminino; HC, hipercolesterolemia; Lp(a), lipoproteína(a); M, masculino; N, não; S, sim; triglicéridos; XT, xantomias.

Tabela I.3. Determinações bioquímicas realizadas no aparelho Daytona, efectuadas nos casos-índice que constituem o grupo pediátrico

Caso-índice	Idade	Sexo	apoE (mg/dL)	apoA-II (mg/dL)	apoC-II (mg/dL)	apoC-III (mg/dL)	c-sdLDL (mg/dL)
10227	13	F	2,46	40,70	5,23	11,51	52,37
11029	10	F	2,17	30,20	4,15	8,06	20,74
11215	12	F	4,88	32,30	6,09	9,56	22,99
11225	12	M	3,41	37,30	4,29	7,45	32,27
11228	11	M	4,49 ^c	22,50 ^c	3,08 ^c	6,86 ^c	22,78 ^c
11258	4	M	4,04	27,10	4,92	8,91	71,81
11280*	16	F	3,47	51,10	3,26	15,11	56,19
11311	7	F	4,20	29,00	3,08	6,04	30,89
11326	12	M	5,81	25,50	3,46	8,23	52,28
11335	12	F	4,38	26,00	3,88	7,81	73,51
11349	16	M	3,06	25,90	0,54	4,47	48,17
12016	10	F	4,13	26,70	1,58	6,32	25,44
12021	11	F	4,62	29,70	3,92	6,38	30,48
12025	4	F	3,31	27,60	4,50	7,56	39,66
12026	14	M	2,48 ^c	19,20 ^c	1,70 ^c	2,90 ^c	21,63 ^c
12035	11	M	2,86	33,60	3,98	5,97	34,52
12037	16	M	5,06	30,40	4,11	9,06	63,67

* , caso-índice em que se estudou a hipercolesterolemia familiar, a deficiência familiar em LPL e a dislipidemia familiar combinada; apo, apolipoproteína; ^c, valores presentes em tratamento; c-sdLDL, colesterol associado às *small dense low density lipoproteins*; F, feminino; M, masculino.

Tabela I.4. Determinações bioquímicas realizadas no aparelho Daytona, efectuadas nos casos-índice que constituem o grupo de adultos

Caso-índice	Idade	Sexo	apoE (mg/dL)	apoA-II (mg/dL)	apoC-II (mg/dL)	apoC-III (mg/dL)	c-sdLDL (mg/dL)
11035	62	F	5,41 ^c	31,00 ^c	10,04 ^c	16,48 ^c	71,51 ^c
11230	35	F	2,62 ^c	25,00 ^c	2,07 ^c	7,54 ^c	54,84 ^c
11242	22	F	4,31	45,90	8,42	14,36	86,90
11247	33	F	2,67 ^c	36,70 ^c	3,44 ^c	13,55 ^c	81,85 ^c
11251	30	M	1,70 ^c	24,90 ^c	2,78 ^c	5,71 ^c	26,38 ^c
11268*	39	M	-	-	-	-	-
11269	19	F	4,32 ^c	33,20 ^c	2,70 ^c	12,43 ^c	30,91 ^c
11305	42	F	1,49 ^c	36,90 ^c	5,37 ^c	10,71 ^c	44,28 ^c
11324*	42	F	5,27 ^c	26,60 ^c	8,89 ^c	13,64 ^c	33,30 ^c
11325	51	F	4,46	34,90	9,37	15,89	45,99
11340	- ^d	M	3,99 ^c	29,10 ^c	5,17 ^c	8,82 ^c	38,06 ^c
11341	- ^d	M	2,20 ^c	42,90 ^c	6,20 ^c	12,32 ^c	22,01 ^c
11343	- ^d	M	2,32 ^c	31,80 ^c	2,18 ^c	4,95 ^c	37,45 ^c
11344	- ^d	M	2,33 ^c	29,40 ^c	3,63 ^c	11,11 ^c	19,81 ^c
11346	- ^d	M	3,13 ^c	42,90 ^c	5,49 ^c	13,75 ^c	52,14 ^c
12003	44	M	5,38 ^c	36,10 ^c	9,17 ^c	14,39 ^c	94,26 ^c
12010	47	M	2,42	24,50	3,55	5,72	55,06
12013	36	F	4,05 ^c	26,80 ^c	4,54 ^c	8,04 ^c	79,09 ^c
12029*	40	M	4,43 ^c	32,00 ^c	9,93 ^c	16,13 ^c	98,31 ^c
12040	61	F	5,65 ^c	26,60 ^c	8,08 ^c	12,99 ^c	80,98 ^c
12041	58	M	4,71 ^c	43,50 ^c	9,55 ^c	20,19 ^c	101,31 ^c
12058	49	M	1,66 ^c	16,80 ^c	3,45 ^c	7,05 ^c	23,75 ^c
12060*	43	M	4,19 ^c	8,00 ^c	5,65 ^c	12,16 ^c	31,99 ^c

* , casos-índice em que se estudou a hipercolesterolemia familiar, a deficiência familiar em LPL e a dislipidemia familiar combinada; apo, apolipoproteína; ^c, valores presentes em tratamento; c-sdLDL, colesterol associado às *small dense low density lipoproteins*; ^d, embora não se tivesse informação sobre a idade, considerou-se, a partir das árvores genealógicas da família, que se tratava de um adulto; F, feminino; M, masculino.