

Estudo de dislipidemias familiares monogénicas raras

Study of rare familial monogenic dyslipidemias

Ana Catarina Alves^{1,2}, Sílvia Sequeira³, Oana Moldovan⁴, Goreti Lobarinhas⁵, Helena Mansilha⁶, Sequeira Duarte⁷, Ana Gaspar⁸, António Guerra^{9,10}, Mafalda Bourbon^{1,2}

mafalda.bourbon@insa.min-saude.pt

(1) Grupo de Investigação Cardiovascular. Departamento de Promoção da Saúde e Doenças Crónicas, INSA. (2) BioISI-Instituto de Biosistemas e Ciências Integrativas. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa. (3) Unidade de Doenças Metabólicas. Hospital de Dona Estefânia. (4) Serviço de Genética Médica. Departamento de Pediatria, Hospital de Santa Maria; Centro Académico de Medicina de Lisboa. (5) Serviço de Pediatria, Hospital de Santa Maria Maior. (6) Serviço de Pediatria/Nutrição Pediátrica. Departamento da Infância e Adolescência. Centro Materno-Infantil do Norte, Centro Hospitalar do Porto. (7) Serviço Endocrinologia, Hospital Egas Moniz. (8) Serviço de Pediatria, Hospital de Santa Maria. (9) Serviço de Pediatria, Centro Hospitalar de São João. (10) Centro de Investigação em Tecnologias e Serviços de Saúde. Faculdade de Medicina, Universidade do Porto.

_Resumo

A dislipidemia é um distúrbio do perfil lipídico, seja por elevação ou diminuição de partículas lipídicas. O objetivo deste trabalho é fazer uma revisão dos casos com dislipidemia rara em estudo no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, apresentando os dados clínicos e moleculares mais relevantes. O perfil lipídico foi determinado para cada caso índice e familiares e o estudo molecular dos genes envolvidos foi realizado por amplificação por PCR e sequenciação de Sanger. Foram estudados, ou está em curso o estudo, de 14 casos índice com os seguintes diagnósticos clínicos: Deficiência familiar em lipoproteína lípase (3), Lipodistrofia familiar parcial de Dunningan Tipo 2 (1), Deficiência em lípase ácida lisossomal (3), Abeta/hipobetalipoproteinemia (2), Deficiência em HDL (1), Hipertrigliceridemia autossómica recessiva (3), Sitosterolemia (1). O fenótipo clínico de cada caso índice é variável dependendo de cada condição. Foi encontrada a causa genética da doença em 8/14 doentes, estando os restantes ainda em estudo. Doentes com as várias dislipidemias raras apresentadas têm um risco acrescido de ter outras doenças graves como pancreatite, doença cardiovascular ou complicações neurológicas e devem, por esta razão, ser identificados o mais precocemente possível, de forma a minimizar ou prevenir os efeitos nefastos destas condições.

_Abstract

Dyslipidemia is a disorder of lipid metabolism, characterized by either an increase or decrease in lipid particles. The aim of this study is to review all cases with rare dyslipidemia, studied in the National Health Institute of Portugal, presenting the most relevant clinical and molecular data. Lipid profile was determined for each index case and relatives, and molecular analysis of the genes involved was performed by PCR amplification and Sanger sequencing. This study includes 14 index cases, with the following clinical diagnoses: Familial lipoprotein lipase deficiency (3), Familial partial lipodystrophy, Dunningan Type 2 (1), Lysosomal acid lipase deficiency (3), Abeta / hypobetalipoproteinemia (2), HDL deficiency (1), Autosomal recessive hypertriglyceridemia (3), Sitosterolaemia (1). The clinical phenotype of each index case varies depending on each condition. It was possible to find the genetic cause of the disease in 8/14 patients, and the remaining are still under study. Patients with the rare dyslipidemias presented have an increased risk of having other serious disorders such as pancreatitis, cardiovascular disease or neurological complications and should, therefore, be identified as early as possible in order to minimize or prevent the adverse effects of these conditions.

_Introdução

A dislipidemia é um distúrbio do perfil lipídico, seja por elevação ou diminuição de partículas lipídicas, usualmente associadas aos triglicéridos (TGs), colesterol LDL (C-LDL) ou colesterol HDL (C-HDL) (1-3). Uma dislipidemia, para ser considerada rara, deve estar presente em menos de 1 em 2 000 pessoas, embora algumas doenças raras tenham frequentemente uma prevalência mais baixa, estimada em menos de 1 em 100 000 indivíduos (www.orpha.net/).

O Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças não Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) tem na sua missão estudar os determinantes biológicos associados a doenças não transmissíveis. Nesse contexto, o estudo dos determinantes associados à dislipidemia é uma das áreas de referência deste departamento, desenvolvendo investigação e prestação de serviços nesta área. Atualmente, encontram-se em curso 2 estudos nesta área: 1) o Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar (FH), o qual não será abordado neste artigo uma vez que a FH é considerada uma doença comum (4); 2) o Estudo de Dislipidemias Familiares Monogénicas Raras ou Poligénicas. No âmbito deste último estudo têm sido referenciados ao INSA vários casos índice e familiares com diagnóstico clínico de diferentes dislipidemias monogénicas raras ou outras patologias em que a dislipidemia é o fator clínico que desperta para a necessidade de um diagnóstico genético (tabela 1). A maioria das hiperdislipidemias e a deficiência em HDL conferem um risco cardiovascular aumentado enquanto as hipodislipidemias, como a abeta ou hipobetalipoproteinemia, podem apresentar diferentes manifestações desde má progressão ponderal a manifestações neurológicas (3,5-20).

Salientamos a existência de várias outras doenças raras acompanhadas por hiperlipidemias ou hipolipidemias como, por exemplo, a glicogenose do tipo 1, a doença de Niemann Pick tipos A e B e a síndrome de Smith Lemli Opitz. Estas doenças não são aqui abordadas por terem manifestações clínicas sugestivas e terem diagnósticos bioquímicos ou enzimáticos específicos (21–23).

_Objetivo

O objetivo deste trabalho é fazer uma revisão dos casos em estudo no INSA, apresentando os dados clínicos e moleculares mais relevantes.

_Material e métodos

No âmbito deste estudo foi determinado o perfil lipídico de cada caso índice e familiares, incluindo marcadores de rotina (colesterol total (CT), LDL, HDL, TGs, ApoA1, Lp(a), ApoB) e outros em investigação no nosso departamento (sdLDL, ApoA2, ApoC2, ApoC3 e ApoE). Os valores de referência recomendados pelas sociedades científicas para o perfil lipídico são: CT <200 mg/dL; LDL <130 mg/dL; HDL >40 mg/dL e TGs normal <150 mg/dL; ApoA1 >120 mg/dL; Lp(a) <50 mg/dL; ApoB <90 mg/dL (24). No que se refere aos marcadores em investigação os valores de referência recomendados pelo fabricante (Randox, Crumlin, UK) são: ApoA2 entre 25,1 e 34,5 mg/dL; ApoC2 entre 1,6 e 4,2 mg/dL; ApoC3 entre 5,5 e 9,5 mg/dL, ApoE entre 2,7 e 4,5 mg/dL e sdLDL < 35mg/dL (www.randox.com).

O estudo molecular foi realizado por amplificação de todos os exões e junções exão/intrão de cada gene indicado na tabela 1, por PCR e sequenciação pelo método de Sanger.

_Resultados

Foram estudados, ou estão em curso, os 14 casos índice com os seguintes diagnósticos clínicos: FLLD (3 casos), FPLD2 (1), LALD (3), ABL/FHBL (2), HDLD (1), ARHTG (3), STL (1).

O fenótipo clínico de cada caso índice é variável dependendo de cada condição, conforme resumido na tabela 2.

Em todos os 3 casos recebidos com diagnóstico clínico de FLLD foi encontrada uma alteração patogénica nos genes LPL (p.((Gly215Glu);(Ser286Gly))), (p.((Gly215Glu);(Gly215Glu))) e APOC2 (p.((Tyr37Asp);(Tyr37Asp))) tendo sido identificados 3 doentes e 6 portadores. O estudo molecular do caso índice com suspeita de FPLD2 também foi bem sucedido levando à identificação de uma mutação já descrita (p.(Arg482Trp)) no caso índice e 5 familiares. Foram identificados 3 casos índice e um familiar com LALD sendo que estes casos foram referenciados como casos índice ao Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar (EPHF) mas um estudo subsequente identificou a mutação mais comum no gene LIPA associada a LALD (p.((Ser275_Gln298del);(Ser275_Gln298del))). Foram recebidos para estudo 2 casos com suspeita de ABL/FHBL em que num foi possível encontrar a mutação causadora da doença, uma mutação stop no gene APOB (p. ((Trp1237*);(Trp1237*))) (25). O segundo caso com diagnóstico de ABL/FHBL, encontra-se em estudo neste momento de forma a identificar a causa genética do seu fenótipo, uma vez que o estudo molecular foi negativo para os genes APOB, MTP, SARB1B e PCSK9. Foram recebidos também 3 casos com suspeita de ARHTG em que os estudos moleculares dos genes LPL, APOC2, LMF1 e GPD1 foram negativos sendo que todos os casos ainda se encontram em estudo. O único caso recebido até à data com deficiência em HDL encontra-se ainda em estudo, bem como o caso com suspeita de STL (tabela 2).

_Discussão

Doentes com as várias dislipidemias raras apresentadas têm um risco acrescido de ter outras doenças graves como pancreatite, doença cardiovascular ou complicações neurológicas e devem, por esta razão, ser identificados o mais precocemente possível, de forma a minimizar ou prevenir os efeitos nefastos destas condições. A identificação genética da causa da patologia, em qualquer dos casos apresentados, permitiu uma melhor e mais personalizada abordagem terapêutica com melhoria do prognóstico do doente, assim como também, um aconselhamento genético adequado, com identificação de outros familiares em risco.

Tabela 1: ⬇ Dislipidemias familiares monogénicas raras: fenótipo, genes e prevalência.

Patologia Genética	Fenótipo	Genes/ Hereditariedade	Prevalência
Deficiência familiar em lipoproteína lípase (FLLD) (OMIM-238600)	Hiperquilomiconemia e hipertrigliceridemia severas (TGs>1000 mg/dL)	<i>LPL</i> (lipoproteína lípase); <i>APOC2</i> (apolipoproteína C2) Hereditariedade – autossómica recessiva	1/1 000 000
Lipodistrofia familiar parcial de Dunningan Tipo 2 (FPLD2) (OMIM-151660)	Hipertrofia muscular dos membros inferiores, lipodistrofia do tronco com deposição de gordura na cara e em volta do pescoço, hiperlipidemia (valores elevados de C-LDL e TG)	<i>LMNA</i> (lâmina A/C) Hereditariedade – autossómica dominante	1/150 000
Deficiência em lípase ácida lisossomal (LALD) (OMIM-613497)	Hiperlipidemia (valores elevados de C-LDL, baixos valores de C-HDL) e esteatose microvesicular. Fenocópia da FH	<i>LIPA</i> (lípase lisossomal ácida) Hereditariedade – autossómica recessiva	1/90 000 a 1/170 000
Hipertrigliceridemia autossómica recessiva (ARHTG) (OMIM-614480) (OMIM-611761) (OMIM-615947)	Níveis elevados de triglicéridos (>500 mg/dL) e baixos níveis de colesterol HDL	<i>GPIHBP1</i> (Glycosylphosphatidylinositol Anchored High Density Lipoprotein Binding Protein 1); <i>LMF1</i> (fator de maturação de lípase 1); <i>GPD1</i> (Glicerol-3-fosfato-desidrogenase 1) Hereditariedade – autossómica recessiva	Não conhecida
Abetalipoproteinemia (ABL) (OMIM-200100)/ hipobetalipoproteinemia (FHBL) (OMIM-615558)	Colesterol total, LDL e triglicéridos abaixo do percentil 5	<i>APOB</i> (apolipoproteína B) <i>MTP</i> (proteína de transferência microsossomal); <i>ANGPTL3</i> (Angiopietin-Like 3); <i>SAR1B</i> (Secretion Associated, Ras Related GTPase 1B) Hereditariedade – autossómica recessiva	1/1 000 000
Sitosterolemia (STL) (OMIM-210250)	Elevação de fitoesteróis e sitoesteróis, bem como valores elevados de C-LDL	<i>ABCG5/8</i> (transportadores ABCG5/8) Hereditariedade – autossómica recessiva	100 casos em todo o mundo
Deficiência em colesterol HDL (HDL) (OMIM-604091)	Colesterol HDL abaixo do percentil 5	<i>APOA1</i> (apolipoproteína A1); <i>ABCA1</i> (<i>ATP binding cassette A1</i>) Hereditariedade – autossómica recessiva	1/1 000 000
Hipercolesterolemia autossómica recessiva (ARH) (OMIM-603813)	Hipercolesterolemia (valores elevados de C-LDL)	<i>LDLRAP1</i> (Proteína adaptadora do receptor das LDL) Hereditariedade – autossómica recessiva	1/1 000 000

Sendo a dislipidemia uma das áreas laboratoriais de referência do INSA e na procura da melhoria constante, encontra-se em curso a implementação de um painel de 26 genes associados a dislipidemia a serem estudados com recurso a sequenciação de nova geração (NGS). Este novo painel irá permitir uma resposta mais rápida e com uma sensibilidade e especificidade mais elevadas, a qualquer pedido de diagnóstico molecular na área da dislipidemia (26, 27). Es-

peramos brevemente com este painel conseguir identificar a mutação causadora da doença nos casos ainda em estudo e em todos os futuros casos que nos possam ser referenciados para diagnóstico; caso não seja possível por esta metodologia chegar a um resultado, deverá ser equacionado o estudo do exoma, como estudo exploratório, para identificação da causa genética da doença apresentada, bem como estudos funcionais para a comprovação da mesma.

artigos breves_ n. 13

Tabela 2: ↓ Características clínicas dos casos índice em estudo.

ID	Idade	CT	LDL	HDL	TG	Lp(a)	ApoA1	ApoB	ApoA2	ApoC2	ApoC3	ApoE	sdLDL	Tratamento	Diagnóstico clínico	Diagnóstico molecular
I	13	148,00	13,00	19,00	923,00	21,00	98,00	58,00	25,5	0,11	33,57	17,66	10,26	Não	FLLP	Gene APOC2: p.[(Tyr37Asp);(Tyr37Asp)]
II	14	139,00	*	8,00	1156,00	8,00	75,00	30,00	14,9	3,15	12,92	5,95	10,92	Não	FLLP	Gene LPL: p.[(Gly215Glu);(Ser286Gly)]
III	34	114,00	19,00	12,00	686,00	8,00	77,00	42,00	24,7	3,11	8,46	2,53	15,12	Estatinas/fibratos	FLLP	Gene LPL: p.[(Gly215Glu);(Gly215Glu)]
IV	45	141	74	47	165	2	158	61	38,7	4,23	10,94	3,66	19,44	Estatina	FLPD2	Gene LMNA: p.(Arg482Trp)
V	17	189	122	57	67	18,8	158	104	36,00	0,82	5,47	5,00	28,74	Estatina	LALD	Gene LIPA: p.[Ser275_Gln298del];[Ser275_Gln298del]
VI	28	181	135	36	98	3,6	112	115	32,10	2,20	5,54	4,53	42,82	Estatina	LALD	Gene LIPA: p.[Ser275_Gln298del];[Ser275_Gln298del]
VII	22	217	163	47	85	65,1	116	125	37,20	3,87	5,84	8,11	36,43	Estatina	LALD	Gene LIPA: p.[Ser275_Gln298del];[Ser275_Gln298del]
VIII	16	22	*	24	6	**	**	**	**	**	**	**	**	Não	ABL/FHBL	Gene APOB: p.[(Trp1237*); (Trp1237*)]
IX	14	24	<0,10	22	5	9,0	49,0	10,0	11,7	0,05	0,34	2,44	2,50	Não	ABL/FHBL	Em estudo
X	42	73	46	3	158	<8,3	10	91	**	**	**	**	**	Não	HDL	Em estudo
XI	11	147	41	17	736	39	93	64	21,2	7,12	9,97	4,64	19,69	Estatinas/fibratos	ARHTG	Em estudo
XII	3	116,00	23,00	21,00	536,00	8,00	139,00	45,00	29,2	11,79	19,98	6,42	18,03	Não	ARHTG	Em estudo
XIII	1	205	92	42	599	<8,3	163,0	111	**	**	**	**	**	Fibratos	ARHTG	Em estudo
XIV	4	329	265	32	89	78,6	99,0	208,0	17,60	3,94	4,73	4,87	51,64	Estatinas	STL	Em estudo

Idade (anos); IMC – índice de massa corporal (Kg/m²); CT – colesterol total (mg/dL); LDL – lipoproteína de baixa densidade (mg/dL); HDL – lipoproteína de alta densidade (mg/dL); TG – triglicéridos (mg/dL); Lp(a) – lipoproteína (a) (mg/dL); ApoA1 – apolipoproteína A1 (mg/dL); ApoB – apolipoproteína B (mg/dL); ApoA2 – apolipoprotein A2 (mg/dL); ApoC2 – apolipoproteína C2 (mg/dL); ApoC3 – apolipoproteína C3 (mg/dL); ApoE – apolipoproteína E (mg/dL); sdLDL – lipoproteína de baixa densidade pequenas e densas; * Impossível determinar por motivos técnicos; ** Não determinado.

_Conclusão

Segundo o Plano Nacional de Saúde Infantil e Juvenil (28), é recomendado que todas as crianças antes dos 10 anos de idade realizem a caracterização do seu perfil lipídico. Uma vez que, em todos os casos apresentados, a dislipidemia apresenta-se desde a infância, se a circular normativa fosse cumprida, estas crianças seriam identificadas em idade precoce, aumentando a possibilidade de prevenir as doenças graves associadas a cada uma das condições referidas. A identificação da etiologia de cada dislipidemia é importante para a implementação da correta abordagem terapêutica uma vez que a mesma depende da via metabólica afetada. A utilização dos novos biomarcadores bioquímicos diferenciados determinados no INSA permitirá uma melhor estratificação do diagnóstico molecular contribuindo para uma medicina mais personalizada. Para a maioria das condições referidas já há terapêutica farmacológica; noutros casos estão em curso ensaios clínicos como, por exemplo, visando aumentar o HDL, utilização de enzimas deficientes ou a leptina no caso de algumas lipodistrofias (29, 30). Todos estes avanços no conhecimento científico referentes ao um melhor diagnóstico e/ou novas terapêuticas irão melhorar o prognóstico do doente.

Referências bibliográficas:

- (1) Bourbon M, Rato Q. Lipoproteínas, genética e aterosclerose. *RFML*. 2006;11(2):67-73.
- (2) Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet*. 2009;10(2):109-21.
- (3) Johansen CT, Hegele RA. Genetic bases of hypertriglyceridemic phenotypes. *Curr Opin Lipidol*. 2011;22(4):247-53.
- (4) Medeiros AM, Alves AC, Bourbon M. Mutational analysis of a cohort with clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia: considerations for genetic diagnosis improvement. *Genet Med*. 2016;18(4):316-24. Epub 2015 May 28.
- (5) Gotoda T, Yamada N, Kawamura M, et al. Heterogeneous mutations in the human lipoprotein lipase gene in patients with familial lipoprotein lipase deficiency. *J Clin Invest*. 1991;88(6):1856-64. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC295753/
- (6) Maily F, Palmén J, Muller DP, et al. Familial lipoprotein lipase (LPL) deficiency: a catalogue of LPL gene mutations identified in 20 patients from the UK, Sweden, and Italy. *Hum Mutat*. 1997;10(6):465-473.
- (7) Brunzell JD. Familial Lipoprotein Lipase Deficiency. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al. (eds). *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2016. [consult. 29/1/2015] www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1308/
- (8) Gilbert B, Rouis M, Griglio S, et al. Lipoprotein lipase (LPL) deficiency: a new patient homozygote for the preponderant mutation Gly188Glu in the human LPL gene and review of reported mutations: 75 % are clustered in exons 5 and 6. *Ann génétique*. 2001;44(1):25-32.
- (9) Emi M, Hata A, Robertson M, et al. Lipoprotein lipase deficiency resulting from a nonsense mutation in exon 3 of the lipoprotein lipase gene. *Am J Hum Genet*. 1990;47(1):107-11. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1683742/pdf/ajhg00091-0111.pdf
- (10) Vantyghem MC, Pigny P, Maurage CA, et al. Patients with familial partial lipodystrophy of the Dunnigan type due to a LMNA R482W mutation show muscular and cardiac abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(11):5337-46.
- (11) Vantyghem MC, Balavoine AS, Douillard C, et al. How to diagnose a lipodystrophy syndrome. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2012;73(3):170-89.
- (12) Reiner Ž, Guardamagna O, Nair D, et al. Lysosomal acid lipase deficiency--an under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction. *Atherosclerosis*. 2014;235(1):21-30.
- (13) Yuan G, Al-Shali KZ, Hegele RA. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. *CMAJ*. 2007;176(8):1113-20.
- (14) Welty FK. Hypobetalipoproteinemia and abetalipoproteinemia. *Curr Opin Lipidol*. 2014;25(3):161-68.
- (15) Assmann G, Smootz E. High density lipoprotein infusion and partial plasma exchange in Tangier disease. *Eur J Clin Invest*. 1978;8(3):131-35.
- (16) Bhattacharyya AK, Connor WE. Beta-sitosterolemia and xanthomatosis. A newly described lipid storage disease in two sisters. *J Clin Invest*. 1974;53(4):1033-43. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC333088/
- (17) Genest J, Libby P, Gotto AMJ (eds). *Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*. 7th ed. Philadelphia, Pa.: Saunders, 2005.
- (18) Scott SA, Liu B, Nazarenko I, et al. Frequency of the cholesteryl ester storage disease common LIPA E85J mutation (c.894G>A) in various racial and ethnic groups. *Hepatology*. 2013;58(3):958-65. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3690149/
- (19) Soutar AK, Naoumova RP. Autosomal recessive hypercholesterolemia. *Semin Vasc Med*. 2004;4(3):241-8.
- (20) Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, et al. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIIIBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J Intern Med*. 2012;272(2):185-96. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3940136/
- (21) Joshi M, Eagan J, Desai NK, et al. A compound heterozygous mutation in GPD1 causes hepatomegaly, steatohepatitis, and hypertriglyceridemia. *Eur J Hum Genet*. 2014;22(10):1229-32. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4169545/
- (22) Schuchman EH, Wasserstein MP. Types A and B Niemann-Pick disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015;29(2):237-47. Epub 2014 Oct 16.
- (23) Griffiths WJ, Abdel-Khalik J, Crick PJ, et al. Sterols and oxysterols in plasma from Smith-Lemli-Opitz syndrome patients. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016. pii: S0960-0760(16)30064-4. www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960076016300644
- (24) European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation, Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, et al.; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG) 2008-2010 and 2010-2012 Committees. 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(14):1769-818. http://eurheartj.oxfordjournals.org/content/32/14/1769.long
- (25) Di Leo E, Magnolo L, Bertolotti M, et al. Variable phenotypic expression of homozygous familial hypobetalipoproteinaemia due to novel APOB gene mutations. *Clin Genet*. 2008;74(3):267-73.
- (26) Johansen CT, Dubé JB, Loyzer MN, et al. LipidSeq: a next-generation clinical resequencing panel for monogenic dyslipidemias. *J Lipid Res*. 2014;55(4):765-72. www.jlr.org/content/55/4/765.long
- (27) Futema M, Plagnol V, Li K, et al. Whole exome sequencing of familial hypercholesterolaemia patients negative for LDLR/APOB/PCSK9 mutations. *J Med Genet*. 2014;51(8):537-44.
- (28) Direção-Geral da Saúde. Norma nº 010/2013, de 31 de maio. Plano Nacional de Saúde Infantil e Juvenil. www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0102013-de-31052013.aspx
- (29) Brinton EA, Kher U, Shah S, et al. Effects of anacetrapib on plasma lipids in specific patient subgroups in the DEFINE (Determining the Efficacy and Tolerability of CETP Inhibition with Anacetrapib) trial. *J Clin Lipidol*. 9(1):65-71.
- (30) Burton BK, Balwani M, Feillet F, et al. A Phase 3 Trial of Sebelipase Alfa in Lysosomal Acid Lipase Deficiency. *N Engl J Med*. 2015;373(11):1010-20.