



## Estudo português de hipercolesterolemia familiar

### Portuguese familial hypercholesterolaemia study

Ana Margarida Medeiros, Ana Catarina Alves, Joana Rita Chora, Mafalda Bourbon

mafalda.bourbon@insa.min-saude.pt

Unidade de I&D, Grupo de Investigação Cardiovascular. Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

BioISI – Biosystems & Integrative Sciences Institute. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

#### \_Resumo

A Hipercolesterolemia Familiar (FH) é uma doença genética associada a um elevado risco cardiovascular. Doentes com FH possuem valores muito elevados de colesterol no plasma, desde o nascimento. Até à data 3 genes foram associados à FH: *LDLR* (85-90%), *APOB* (5-8%) e *PCSK9* (1-2%). Em 1999 foi estabelecido, no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, o Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar (EPHF). Este estudo de investigação tem como objetivo principal identificar a causa genética da dislipidemia em doentes com critérios clínicos de FH. O EPHF identificou molecularmente 718 doentes heterozigotos com uma variante patogénica ou provavelmente patogénica (segundo as diretrizes da ACMG) num dos 3 genes associados à FH. Adicionalmente, 90 indivíduos possuem uma das 35 variantes de significado incerto cuja patogénicidade necessita de ser avaliada através de estudos funcionais. Foram também identificados 10 homozigotos (3 homozigotos verdadeiros e 7 heterozigotos compostos), com variantes patogénicas nos genes *LDLR* e *PCSK9*. O EPHF conseguiu identificar 3,8% dos portugueses que se calcula terem FH, colocando Portugal entre os dez países com mais doentes identificados. O risco cardiovascular dos doentes com FH é determinado pelos valores elevados de colesterol que os doentes apresentam desde o nascimento, mas também pela patogénicidade da variante identificada. A identificação precoce dos doentes com FH, através do diagnóstico genético, permite ao clínico implementar medidas terapêuticas adequadas e mais agressivas, de modo a diminuir o risco cardiovascular inerente a estes doentes.

#### \_Abstract

Familial Hypercholesterolemia (FH) is a genetic disorder associated with a high cardiovascular risk. Patients with FH have very high plasma cholesterol values since birth. Until now three genes have been associated to FH: *LDLR* (85-90%), *APOB* (5-8%) and *PCSK9* (1-2%). In 1999 the Portuguese FH (PFHS) Study was established at the National Institute of Health. This study aims to identify the genetic cause of dyslipidemia in patients with clinical diagnosis of FH. The Portuguese FH Study genetically identified 718 heterozygous patients with a pathogenic or probably pathogenic variant (according to ACMG guidelines) in one of the 3 genes associated to FH. In addition, 90 individuals have one of 35 variants of uncertain significance whose pathogenicity needs to be assessed through functional studies. Ten homozygotes (3 true homozygotes and 7 heterozygous compounds) were also identified, with pathogenic variants in the *LDLR* and *PCSK9* genes. The PFHS was able to identify 3.8% of the Portuguese that are estimated to have FH, placing Portugal among the ten countries with the most patients identified. The cardiovascular risk of FH patients is determined by the

high cholesterol values present since birth, but also by the pathogenicity of the identified variant. The early identification of these patients through genetic diagnosis allows the clinician to implement appropriate and more aggressive therapeutic measures in order to reduce the cardiovascular risk inherent to these patients.

#### \_Introdução

A Hipercolesterolemia Familiar (FH) é uma doença genética (autossómica dominante) comum do metabolismo lipídico, que possui um elevado risco cardiovascular. A forma heterozigótica tem uma frequência de 1/200-1/500, e a forma homozigótica é mais rara (1/300.000-1/1000.000) <sup>(1)</sup>.

Os doentes com FH caracterizam-se, clinicamente, por possuírem valores muito elevados de colesterol total (CT) e colesterol LDL (c-LDL) no plasma, presentes desde o nascimento <sup>(2)</sup>. Como consequência, quando não estão identificados nem tratados, estes doentes possuem um risco muito elevado de desenvolver aterosclerose e doença cardiovascular prematura <sup>(3,4)</sup>.

Até à data, 3 genes foram associados à FH: o gene *LDLR*, que apresenta a maior frequência de mutações (85-90% dos casos) <sup>(5)</sup>, e em menor frequência, o gene *APOB* (5-8%) <sup>(6)</sup> e o gene *PCSK9* (1-2%) <sup>(7)</sup>. No entanto, a interpretação do significado clínico das variantes encontradas nestes genes nem sempre é fácil. Em 2015, a *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG), emitiu uma diretriz para a classificação das variantes genéticas para ser usada no diagnóstico molecular de doenças genéticas. Nos 3 genes que se sabe que causam FH, estão descritas 2104 variantes diferentes mas em apenas 166 das variantes a sua patogénicidade foi comprovada por estudos funcionais *in vitro*. Aplicando-se

as diretrizes *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG), apenas 1097/2014 das variantes descritas são consideradas patogénicas ou provavelmente patogénicas (*likely pathogenic*) (8).

Uma vez que existe um diagnóstico genético e tratamento adequado para esta doença, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o rastreio universal da FH desde 1998 (9). No entanto, em Portugal este rastreio não existe e o benefício em identificar estes doentes precocemente não é devidamente reconhecido. Foi baseado nesta recomendação da OMS que, em 1999, foi estabelecido, no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), o Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar (EPHF) (10).

### \_Objetivos

O EPHF é um estudo de investigação, desenvolvido e promovido pelo INSA, financiado por várias entidades públicas e privadas. Tem como principal objetivo identificar a causa genética da dislipidemia em doentes com critérios clínicos de FH, tendo para tal implementado o diagnóstico genético da FH em Portugal. É também objetivo deste estudo a determinação da patogénicidade das variantes encontradas através de estudos funcionais *in vitro* e a caracterização da patofisiologia da doença cardiovascular (DCV) nestes doentes.

### \_Material e métodos

Foram referenciados para este estudo, até à presente data, um total de 856 casos índice com diagnóstico clínico de FH e 1787 familiares. O estudo molecular de FH tem sido realizado em 5 fases. Fase I: pesquisa das variantes patogénicas mais comuns no gene *APOB* (exões 26 e 29) e pesquisa de variantes no gene *LDLR* (completo); fase II: pesquisa de grandes rearranjos (deleções ou duplicações) no gene *LDLR* por MLPA; fase III: pesquisa das variantes patogénicas mais comuns no gene *PCSK9* (5 exões); fase IV: pesquisa de variantes no gene *APOB* (completo); fase V: estudos funcionais (*in vitro*) de variantes de patogénicidade desconhecida nos genes *LDLR*, *APOB* ou *PCSK9*.

### \_Resultados

O EPHF identificou molecularmente 718 doentes heterozigotos (281 casos índice + 437 familiares), crianças e adultos, com uma variante potencialmente patogénica num dos 3 genes associados à FH: *LDLR*, *APOB* ou *PCSK9*. Estas variantes incluem variantes classificadas como patogénicas ou provavelmente patogénicas, segundo as diretrizes da ACMG. Adicionalmente, foram ainda identificados 90 indivíduos (45 casos índice + 45 familiares) que possuem uma das 35 variantes de significado incerto (VUS, do inglês *variant of unknown significance*) cuja patogénicidade necessita de ser avaliada através de estudos funcionais; estes estudos estão em curso (tabela 1). Foram também identificados 10 doentes homozigotos (3 homozigotos verdadeiros e 7 heterozigotos compostos); 9 possuem variantes patogénicas no gene *LDLR* e um possui duas variantes patogénicas no gene *PCSK9*. Estes doentes com FH, identificados geneticamente, encontram-se de momento a receber aconselhamento e tratamento de acordo com a sua patologia.

Em cerca de 60% dos indivíduos estudados não foi possível determinar a causa genética da sua hipercolesterolemia. Estes indivíduos poderão ter outra doença do metabolismo lipídico, fenotipicamente semelhante à FH, como a deficiência em lípase ácida lisossomal (LALD) (11), e uma pequena percentagem poderá ter um defeito genético num gene ainda por identificar.

Na população portuguesa foram identificadas um total de 189 variantes. As variantes encontradas, na sua grande maioria, já foram descritas noutros países. A variante patogénica mais comum na população portuguesa é a p.(Ala431Thr) no gene *LDLR*, identificada em 11% dos casos e é comum em doentes do litoral alentejano. A segunda variante mais comum na nossa população é a p.(Asp224Asn), identificada em 7% dos casos, é bastante comum na região do Algarve. Outra variante muito frequente na população portuguesa (6%), comum no norte do país, é uma deleção de grande parte do gene *LDLR* (Pr\_ex2+ex8\_ex12del)

Tabela 1: Variantes de significado incerto (VUS) identificadas na população portuguesa.

Gene	cDNA	Proteína
LDLR	c.292G>C	p.(Gly98Arg)
LDLR	c.1432G>A	p.(Gly478Arg)
LDLR	c.1027G>A	p.(Gly343Ser)
LDLR	c.1876G>A	p.(Glu626Lys)
LDLR	c.1A>C	p.(Met1Leu)
LDLR	c.265T>C	p.(Cys89Arg)
LDLR	c.1455C>G	p.(His485Gln)
LDLR	c.1840T>A	p.(Phe614Ile)
LDLR	c.241C>T	p.(Arg81Cys)
APOB	c.5690G>A	p.(Arg1897His)
APOB	c.10679A>G	p.(Tyr3560Cys)
APOB	c.9835A>G	p.(Ser3279Gly)
LDLR	c.1325A>G	p.(Tyr442Cys)
APOB	c.5599C>T	p.(Arg1867Trp)
APOB	c.7853T>C	p.(Ile2618Thr)
APOB	c.6639_6641del	p.(Asp2213del)
LDLR	c.473C>G	p.(Ser158Cys)
LDLR	c.1403T>A	p.(Val468Asp)
LDLR	c.1960C>T	p.(Leu654Phe)
LDLR	c.1088C>A	p.(Thr363Asn)
LDLR	c.2397_2411del	p.(Val800_Leu804del)
APOB	c.13158del	p.(Glu4387Asnfs*7)
LDLR	c.1833_1841del	p.(Leu611_Val613del)
LDLR	c.1618_1620del	p.(Ala540del)
LDLR	c.1352T>C	p.(Ile451Thr)
LDLR	c.1846-?_2311+?dup (EX13_15dup)	
LDLR	c.1463T>C	p.(Ile488Thr)
LDLR	c.1474G>A	p.(Asp492Asn)
LDLR	c.799G>A	p.(Glu267Lys)
LDLR	c.1585G>C	p.(Gly529Arg)
LDLR	c.185C>T	p.(Thr62Met)
LDLR	c.1499T>C	p.(Val500Ala)
APOB	c.5066G>A	p.(Arg1689His)
LDLR	c.487C>T	p.(Arg163Cys)
LDLR	c.1897C>T	p.(Arg633Cys)

que leva a uma ausência total de recetores das LDL. Em 21% dos doentes foram identificadas outras 5 variantes que surgem também com frequência na nossa população (3-5%). Nos restantes 55% dos doentes foram encontradas variantes isoladas.

## Conclusões

A FH é uma doença genética associada a um risco elevado de DCV prematura. Esse risco é determinado pelos valores elevados de colesterol que estes doentes apresentam desde o nascimento, mas também pela patogenicidade da variante identificada (12). A identificação clínica é o primeiro passo mas a identificação, correta e definitiva, destes doentes só é possível através do diagnóstico genético. Num estudo recente verificou-se que indivíduos com mutações funcionais, num dos três genes que causam FH, possuem um risco 16 vezes superior de sofrer uma DCV prematura quando comparados com indivíduos com os mesmos valores de c-LDL mas sem mutação funcional (4).

Deste modo, torna-se muito importante a identificação precoce dos doentes com FH pois permite ao clínico implementar medidas terapêuticas adequadas e mais agressivas, de modo a diminuir o risco cardiovascular inerente a estes doentes.

O EPHF conseguiu, até à data, identificar 3,8% dos 20.000 portugueses que se calcula terem FH (com base na prevalência de 1/500); esta situação de subdiagnóstico é semelhante em todos os países, no entanto, Portugal está entre os dez países com mais casos identificados.

## Agradecimentos:

Os autores agradecem a todos os doentes que participaram no estudo de investigação assim como a todos os médicos que os referenciaram.

## Referências bibliográficas:

- (1) Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, et al.; European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J.* 2013 Dec;34(45):3478-90a. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3844152/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3844152/)
- (2) Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial Hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al. (eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed, New York: McGraw-Hill, 2001, pp. 2863-2913.

artigos breves\_ n. 3

- (3) Marks D, Thorogood M, Neil HA, et al. A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*. 2003;168(1):1-14.
- (4) Khera AV, Won HH, Peloso GM, et al. Diagnostic Yield and Clinical Utility of Sequencing Familial Hypercholesterolemia Genes in Patients With Severe Hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(22):2578-89. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2016.03.520>
- (5) Soutar AK, Naoumova RP. Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007;4(4):214-25.
- (6) Alves AC, Etxebarria A, Soutar AK, et al. Novel functional APOB mutations outside LDL-binding region causing familial hypercholesterolaemia. *Hum Mol Genet*. 2014;23(7):1817-28. Epub 2013 Nov 13.
- (7) Abifadel M, Varret M, Rabès JP, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*. 2003;34(2):154-6.
- (8) Chora J, Medeiros AM, Alves AC, et al. Systematic Review of LDLR, APOB and PCSK9 Variants Associated with Familial Hypercholesterolaemia – Application of ACMG Guidelines and Implications for Familial Hypercholesterolaemia Diagnosis. *Genet Med*. (submitted 2017).
- (9) WHO Human Genetics Programme. Familial hypercholesterolaemia (FH) : report of a WHO consultation, Paris, 3 October 1997. Geneva: WHO, 1998. (WHO/HGN/CONS/FH/98.7) [www.who.int/iris/handle/10665/64162](http://www.who.int/iris/handle/10665/64162)
- (10) Bourbon M, Rato Q ; Investigadores do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar. Portuguese Familial Hypercholesterolemia Study: presentation of the study and preliminary results. *Rev Port Cardiol*. 2006;25(11):999-1013. [www.spc.pt/DL/RPC/artigos/771.pdf](http://www.spc.pt/DL/RPC/artigos/771.pdf)
- (11) Chora JR, Alves AC, Medeiros AM, et al. Lysosomal acid lipase deficiency: A hidden disease among cohorts of familial hypercholesterolemia? *J Clin Lipidol*. 2017;11(2):477-484.e2. Epub 2016 Nov 17.
- (12) Santos RD. Phenotype vs. genotype in severe familial hypercholesterolemia: what matters most for the clinician? *Curr Opin Lipidol*. 2017;28(2):130-135. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2016.11.002>