



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Caracterização clínica e molecular de um caso de hipercolesterolemia familiar

Sílvia Cristina Coelho do Amaral

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Prof. Doutor Manuel Carlos Loureiro de Lemos
Co-orientador: Prof.^a Doutora Mafalda Bourbon

Covilhã, Junho de 2014

Dedicatória

Aos meus avós, pais, irmã e amigos por todo o apoio no alcance dos meus sonhos.

À família participante no estudo, desejo que este trabalho contribua para uma vida com a qualidade e longevidade que merecem.

Ao José por me ter desembaraçado o caminho.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Manuel Lemos por ter aceite ser meu orientador e assim me ter incutido o seu rigor e profissionalismo. Pela sua amabilidade em me ter proporcionado trabalhar no CICS e agilizado todo o processo para que pudesse estagiar no INSA. Pela sua paciência e persistência aquando da minha desmotivação e sentimento de incapacidade. Pela generosidade da partilha do seu tempo e conhecimento.

À Doutora Mafalda pela co-orientação da minha tese. Pela sua gentileza em me aceitar no seu grupo de trabalho fazendo-me sentir parte integrante da sua equipa. Por me ter dado todas as condições, quer técnicas quer teóricas, para desenvolver a investigação de forma proveitosa. Pelas conversas tão enriquecedoras acerca do estudo português de hipercolesterolemia familiar, que me sensibilizaram para a necessidade de colaboração estreita entre clínicos e investigadores. Conhecê-la despontou a minha curiosidade pelo mundo da investigação científica. Obrigada.

À Eduarda, Marina e restantes colegas do grupo de trabalho do professor Manuel Lemos do CICS, por me terem ensinado e partilhado o conhecimento laboratorial necessário para a elaboração desta investigação. Pelo incentivo que me deram desde o primeiro momento e por terem acreditado que faria um bom trabalho. A vossa expectativa e confiança foram imprescindíveis para que me sentisse capaz de realizar este projecto com êxito. Foi um gosto ter aprendido convosco e um privilégio ter integrado uma equipa tão profissional e amistosa como a vossa.

À Ana Medeiros, Isabel Picanço, Bárbara Oliveira e Joana Canilho do INSA pela disponibilidade que demonstraram para comigo. A vossa amabilidade, simpatia e ambiente familiar fizeram-me sentir benvinda e querida. Penso que só dessa forma é possível ter sentido aquela pontinha de tristeza ao vir embora, contudo com a esperança de poder futuramente fazer parte do vosso projecto. O meu muito obrigado por terem tornado o meu trabalho tão prazeroso.

Aos diversos laboratórios pela acessibilidade e ajuda na recolha e preparação do material necessário à participação no estudo português de hipercolesterolemia familiar.

À Catarina Rosa, Catarina Dionísio, Margarida Adão, Rita Pardal, Joana Freitas, Lurdes Gomes, por me terem ouvido tanto e tantas vezes. Pela ajuda incansável, sem vocês não teria sido possível o finalizar deste trabalho.

Aos elementos da família em estudo, que sempre se mostraram interessados e disponíveis para colaborar. Obrigado pela vossa gentileza e carinho. Guardo-vos a todos no coração.

Resumo

Introdução: As doenças cardiovasculares são uma importante causa de mortalidade e morbidade em Portugal e no mundo. Os factores que causam as mesmas são múltiplos. Sabe-se que o perfil lipídico da população em muito influencia o seu risco cardiovascular. A hipercolesterolemia familiar (HF) e a hiperlipidemia familiar combinada (HFC) são duas doenças genéticas de origens monogénica e poligénica respectivamente. Estas entidades patológicas potenciam grandemente o risco cardiovascular e estão sub-diagnosticadas em Portugal. A frequência da HF é de 1/500 nos países Europeus, sendo que em Portugal estima-se que existam cerca de 20.000 casos. A frequência de HFC em Portugal não é conhecida. Torna-se imperativo o estudo mais aprofundado, nomeadamente a nível molecular, dos doentes que apresentem valores de lípidos séricos elevados e/ou risco de doença vascular aterosclerótica. O objectivo deste trabalho foi caracterizar clínica e molecularmente uma caso de HF.

Metodologia: Foi identificada uma família em que nas últimas 3 gerações, vários membros apresentavam características clínicas sugestivas de HF. Foram feitas análises sanguíneas para estudo bioquímico e molecular. Os genes estudados foram os associados à HF (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *APOE*) e HFC (*LPL*, *APOA4*, *APOA5*, *APOC2*, *APOC3*, *USF1*). Estudou-se ainda o gene da *APOE* em todos os participantes do estudo por estar associado ao perfil lipídico. O estudo incluiu reacção de PCR (*polymerase chain reaction*) e sequenciação automática do ácido desoxirribonucleico (DNA) tendo sido ainda estudado, através de técnica de amplificação dependente de múltiplas sondas (MLPA), grandes rearranjos ou deleções no gene *LDLR*.

Resultados: Não foi identificada qualquer mutação patogénica nos genes estudados. No entanto, foram encontrados vários polimorfismos no caso-index incluindo os polimorfismos *rs688*, *rs3737787* e *rs2073658* que estão relacionados com níveis elevados de colesterol e associados ao risco aumentado de desenvolvimento de aterosclerose.

Discussão e Conclusão: A família em estudo apresenta critérios clínicos de HF embora a presença de triglicérideos elevados em alguns membros da família possa sugerir que se trata de uma HFC. Não foram no entanto, encontradas alterações patogénicas nos genes estudados. Ainda assim, a presença de certos polimorfismos predispõe a mesma para níveis elevados de lípidos no sangue. A confirmação de valores elevados nos vários elementos da família permite concluir que a carga genética em consonância com a carga ambiental devem ser tidas em conta no tratamento da família em estudo, pelo risco cardiovascular acrescido.

Palavras-chave

Hipercolesterolemia familiar, hiperlipidemia familiar combinada, aterosclerose, risco cardiovascular, metabolismo, endocrinologia, genética.

Abstract

Background: Cardiovascular diseases are a major source of mortality and morbidity in Portugal and worldwide. The factors that cause them are multiple, but it is known that the lipid profile of the population influences their cardiovascular risk. Familial hypercholesterolemia and combined dyslipidemia are two pathological entities that greatly potentiate the cardiovascular risk and are under-diagnosed in Portugal. The frequency of familial hypercholesterolemia is 1/500 in European countries, and in Portugal it is estimated that there are about 20.000 cases. Frequency of familial combined hypercholesterolemia in Portugal is not known. Further studies are needed, particularly at the molecular level, of patients showing high serum lipid values and / or risk of atherosclerotic vascular disease. The aim of this study was to characterise the molecular and clinical features of a family with familial hypercholesterolemia.

Methods: A three-generation family was identified with several members with clinical characteristics suggestive of familial hypercholesterolemia. Blood tests for biochemical and molecular studies were performed. The genes studied were the ones associated with familial hypercholesterolemia (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9*), and familial combined hyperlipidemia (*LPL*, *APOC4*, *APOA5*, *APOC2*, *APOC3*, *USF1*). *APOE* gene was study in all participants of the study because it is related with the lipid profile in blood. The study included polymerase chain reaction (PCR), DNA automated sequencing and MLPA was used to detect large genetic rearrangements or deletions in the *LDLR* gene.

Results: No pathogenic mutation was identified in the studied genes. However, there were various polymorphisms found in the index-case, including the *rs688*, *rs3737787* and *rs2073658* polymorphisms which are associated with high levels of cholesterol and increased risk of developing atherosclerosis.

Discussion and Conclusion: The studied family presents familial hypercholesterolemia although the presence of high triglycerides in some family members suggests that it could be a familial combined hyperlipidemia. However, no mutations were found in the known genes. Nevertheless, the presence of certain polymorphisms may predispose them to high levels of lipids in blood. The genetic load should be taken into consideration in the treatment in line with the environmental load because of the increased cardiovascular risk of this family.

Keywords

Familial hypercholesterolemia, familial combined hyperlipidemia, atherosclerosis, cardiovascular risk, metabolism, endocrinology, genetics.

Índice

Dedicatória.....	II
Agradecimentos	III
Resumo	IV
Abstract.....	VIII
Índice	VIII
Lista de Figuras.....	IX
Lista de Tabelas.....	X
Lista de Abreviaturas.....	XI
1. Introdução	1
2. Materiais e Métodos	7
a) Caso-index.....	7
b) Família participante	7
c) Caracterização bioquímica	9
d) Caracterização molecular	9
i) Extração de DNA genómico.....	10
ii) Quantificação de DNA.....	10
iii) Amplificação por PCR	10
iv) Sequenciação do DNA.....	11
v) MLPA.....	11
3. Resultados	12
4. Discussão/conclusão	18
Bibliografia.....	21
Anexo 1 - Parecer relativo ao projecto EPHF, Comissão de Ética do INSA.....	23
Anexo 2 - Consentimento informado e inquérito do caso índice	24
Anexo 3 - Protocolo de extração de DNA a partir de sangue fresco (método de “salting out”)	32
Anexo 4 - Protocolo de análise dos genes <i>LDLR</i> e <i>APOB</i>	34
Anexo 5 - Protocolo de análise do gene <i>PCSK9</i>	36
Anexo 6 - Protocolo de análise do gene <i>APOE</i>	38
Anexo 7 - Protocolo de análise dos genes <i>LPL</i> , <i>APOA4</i> , <i>APOCII</i> , <i>APOCIII</i> e <i>USF1</i>	39
Anexo 8 - Diploma de apresentação do EPHF na Unidade Local de Saúde da Guarda	42

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática do gene <i>LDLR</i> (cromossoma 19) e respectiva proteína ..2	
Figura 2 - Representação esquemática do gene <i>APOB</i> (cromossoma 2) e respectiva proteína ..3	
Figura 3 - Representação esquemática do gene <i>PCSK9</i> (cromossoma 1) e respectiva proteína..3	
Figura 4 - Heredograma da família em estudo	8
Figura 5 - Fases do EPHF e estudos complementares feitos à família em estudo	9
Figura 6 - Gene <i>LDLR</i> , Exão 2.	13
Figura 7 - Gene <i>LDLR</i> , Exão 7	13
Figura 8 - Gene <i>LDLR</i> , Exão 11	14
Figura 9 - Gene <i>LDLR</i> , Exão 12	14
Figura 10 - Gene <i>LDLR</i> , Exão 16	15
Figura 11 - Gene <i>LDLR</i> , Exão 18	16
Figura 12 - Gene <i>APOE</i> do caso-índice	16
Figura 13 - Gene <i>USF1</i>	17

Lista de Tabelas

Tabela 1- Critérios diagnósticos clínicos para HF de acordo com MedPed e OMS.	4
Tabela 2- Critérios de FH adaptados de “Simon Broome Heart Research Trust”	5
Tabela 3- Resultados bioquímicos dos vários elementos da família	12
Tabela 4- Polimorfismos encontrados nos vários genes, tipo de alteração, codificação e frequência.....	12

Lista de Abreviaturas

Apo (a)	Lipoproteína A
ApoA4	Apolipoproteína A4
ApoA5	Apolipoproteína A5
ApoC2	Apolipoproteína C2
ApoC3	Apolipoproteína C3
ApoE	Apolipoproteína E
c-HDL	Cholesterol of High-density Lipoprotein (colesterol das lipoproteínas de alta densidade)
CICS	Centro de Investigação em Ciências da Saúde
c-LDL	Cholesterol of Low-density Lipoprotein (colesterol das lipoproteínas de baixa densidade)
CT	Colesterol Total
DALYs	Disability Adjusted Life Years (Anos de vida ajustados com incapacidade)
DC	Doença coronária
DCp	Doença coronária prematura
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)
EAM	Enfarte Agudo do Miocárdio
EPHF	Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar
HDL	High-density Lipoprotein (Lipoproteínas de alta densidade)
HF	Hipercolesterolemia Familiar
HFC	Hiperlipidemia Familiar Combinada
HMG-CoA	5-hydroxyl-3-metilglutaril-coenzima A
IMC	Índice de Massa Corporal
INSA	Instituto Nacional de Saúde Pública Dr. Ricardo Jorge
LDL	Low-density Lipoprotein (Lipoproteínas de baixa densidade)
LDLR	Low-density Lipoprotein Receptor (Receptor da lipoproteína de baixa densidade)
LPL	Lipoprotein Lipase (Lipase da lipoproteína)
MAF	Minor Allele Frequency (frequência do alelo <i>minor</i>)
MedPed	Make early diagnosis to Prevent early death
mg/dL	Miligrama por decilitro
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
nm	Nanómetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Polymerase chain reaction (reacção em cadeia de polimerase)
PCSK9	Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9
RNA	Ribonucleic Acid (Ácido ribonucleico)
Rpm	Rotações por minuto
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de nucleotídeo único)
TG	Triglicerídeos
UBI	Universidade da Beira Interior
ULI	Unidade Laboratorial Integrada
UMA	Unidades Maço Ano

USF1	Upstream Transcription Factor 1 (factor de transcrição 1 <i>upstream</i>)
UV	Ultra Violeta
VLDL	Very-low-density lipoprotein (Lipoproteínas de muito baixa densidade)
XT	Xantomas tendinosos

1. Introdução

A doença cardiovascular é a principal causa de mortalidade prematura e de anos de vida ajustados para a incapacidade (DALYs) na Europa, sendo também cada vez mais frequente nos países em desenvolvimento¹.

A doença cardiovascular é na maioria das vezes poligénica, isto é, a patogénese da doença tem por base pequenas variações genéticas. Por outro lado, os próprios genes interagem com factores ambientais. Deste modo, torna-se difícil o reconhecimento do desencadeador específico da doença². Ao longo dos anos foram descritas alterações hereditárias das lipoproteínas. Estas, aumentando os níveis de colesterol no sangue, potenciam o processo aterosclerótico estando, portanto, intimamente relacionadas com a incidência de eventos coronários e mortalidade cardiovascular². A doença coronária (DC), o acidente vascular cerebral isquémico e a doença arterial periférica são as principais entidades clínicas associadas à doença vascular, sendo a sua etiologia multifactorial. Se por um lado as variáveis genéticas não são modificáveis, os estilos de vida tais como os hábitos tabágicos, a falta de actividade física e os hábitos nutricionais, sendo determinantes modificáveis, podem ser alvo de aconselhamento e acção terapêutica¹.

Os lípidos que circulam na corrente sanguínea encontram-se na forma de lipoproteínas (colesterol, ácidos gordos e triglicerídeos associados a proteínas), que são insolúveis em água e necessitam de transportadores³. O colesterol é importante na constituição das membranas celulares e como precursor de hormonas esteróides. No entanto, se a regulação dos seus níveis não estiver controlada, deposita-se em locais indesejados e de difícil remoção. Através de um processo inflamatório, formam-se placas ateroscleróticas que estão na base das doenças vasculares supracitadas³.

As lipoproteínas são moléculas complexas constituídas por lípidos e proteínas, sendo uma das suas funções o transporte de colesterol na corrente sanguínea. Das lipoproteínas existentes importa referir as LDL (lipoproteínas de baixa densidade), HDL (lipoproteínas de alta densidade) e VLDL (lipoproteínas de muito baixa densidade). A importância das lipoproteínas está relacionada com a sua função de regulação dos níveis plasmáticos de lípidos no sangue e nos locais onde se processa o seu metabolismo³. Podem definir-se quatro vias metabólicas das lipoproteínas: via exógena (os triglicerídeos e colesterol originários da dieta são processados no lúmen intestinal, absorvidos e empacotados em quilomicras nascentes), via endógena (síntese de triglicerídeos pelos hepatócitos a partir de hidratos de carbono e ácidos gordos ou de novo através da activação da transcrição do gene da enzima HMG-CoA reductase), via do receptor das LDL (partículas de colesterol das LDL removidas do plasma por receptores específicos, presentes nas membranas celulares e que se ligam à Apolipoproteína B presente

na superfície das LDL) e via do colesterol reverso (permite que o colesterol não metabolizado a nível periférico, seja direccionado para o fígado para excreção)³.

A prevalência de Hipercolesterolemia Familiar (HF) heterozigótica na população do Reino Unido é de 1 em 500⁴, sendo esta igualmente a prevalência apontada para os indivíduos de ascendência europeia¹. No entanto, a forma homozigótica é rara nas populações europeias (1 em 10⁶ nascimentos)¹. A HF é causada por mutações no gene do receptor das lipoproteínas de baixa densidade (*LDLR*), que está representado na figura 1 e cuja função principal da proteína associada é a captação e degradação das LDL, permitindo a remoção do colesterol LDL do plasma (via do receptor das LDL)². Existem mais de mil mutações descritas no gene *LDLR*². Os indivíduos afectados pelas mutações neste gene apresentam níveis de colesterol LDL (C-LDL) cerca de duas vezes superior a irmãos não afectados¹. Os indivíduos com HF apresentam níveis de C-LDL elevados (200-400 mg/dL)¹ com valores de triglicéridos normais. Clinicamente, observa-se ainda a presença de arcos senis, xantelasmas ou xantomas tendinosos, sendo os extensores do dorso da mão e do tendão de Aquiles os locais mais frequentemente envolvidos¹.

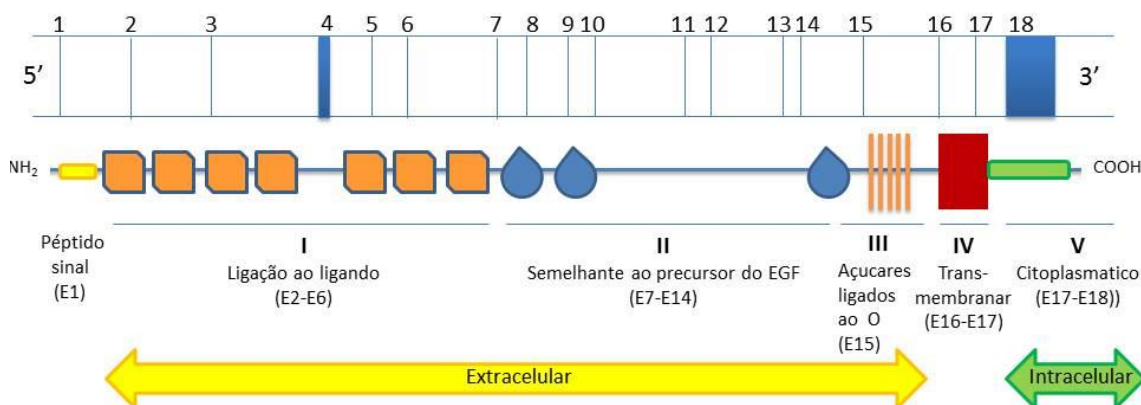


Figura 1 - Representação esquemática do gene *LDLR* (cromossoma 19) e respectiva proteína. Numeração 1 a 18- exões; NH₂ - grupo funcional amino; COOH - grupo funcional carboxilo; E- Exão; numeração romana I a V - domínios da proteína (839 aminoácidos). Imagem gentilmente cedida pelo EPHF.

Igualmente associado à HF está o gene da Apolipoproteína B (*APOB*) (figura 2). A sua função prende-se com a montagem e secreção das VLDL e quilomicras assim como ser ele mesmo um ligando do LDLR; logo uma mutação neste gene dificulta a ligação das LDL ao respectivo receptor, prejudicando a remoção do colesterol das LDL e levando à sua acumulação no plasma².

O gene da *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)* codifica uma proteína cuja função ainda é desconhecida. A mesma é regulada pelo colesterol e por isso pode estar envolvido num novo mecanismo de modulação da função do LDLR, por uma via alternativa de inibição da transcrição do gene *LDLR*². Mutações no gene *PCSK9* poderão causar ganho de função da proteína, resultando em hipercolesterolemia².

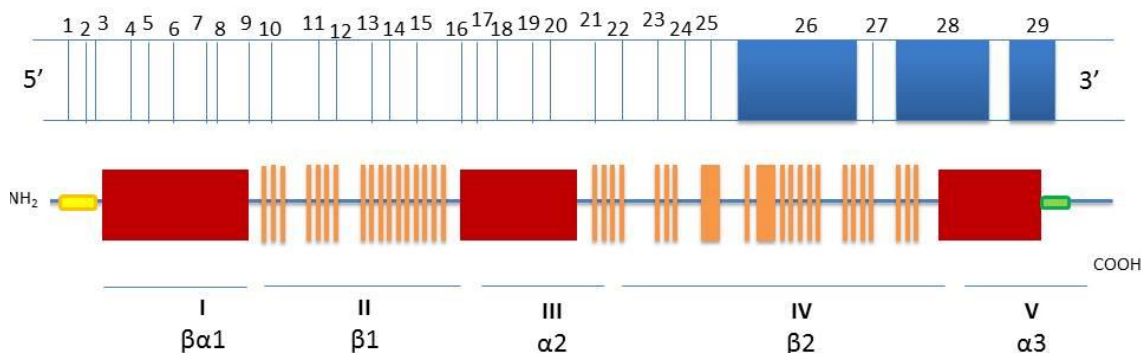


Figura 2- Representação esquemática do gene *APOB* (cromossoma 2) e respectiva proteína. Numeração 1 a 29- exões; NH₂ - grupo funcional amina; COOH - grupo funcional carboxila; numeração romana I a V - domínios da proteína (4536 aminoácidos). Figura baseada na imagem gentilmente cedida pelo EPHF e adaptada de figura da referência 5.

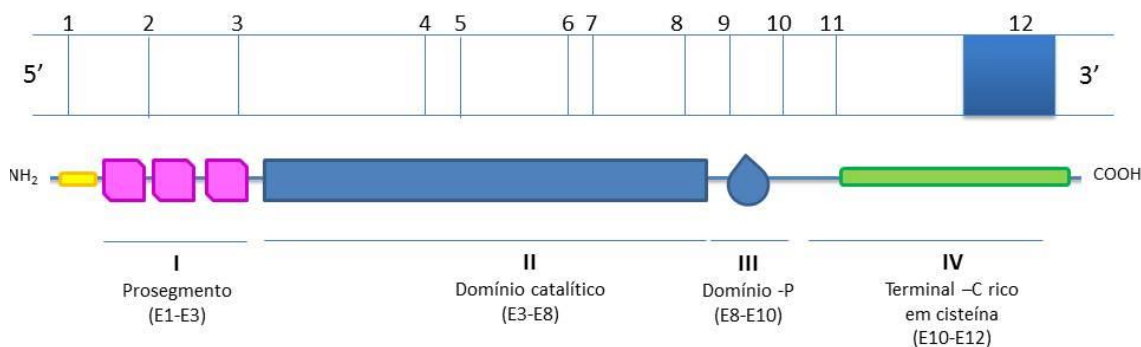


Figura 3 - Representação esquemática do gene *PCSK9* (cromossoma 1) e respectiva proteína. Numeração 1 a 12- exões; NH₂ - grupo funcional amina; COOH - grupo funcional carboxila; E- Exão; numeração romana I a IV - domínios da proteína (692 aminoácidos). Figura baseada na imagem gentilmente cedida pelo EPHF.

A Apolipoproteína E (ApoE) é a proteína chave na modulação do metabolismo das lipoproteínas, que são altamente aterogénicas⁵. A sua principal função é constituir-se como um ligando do receptor do LDL. Existem três alelos comuns designados ε2, ε3, e ε4 que codificam as três principais isoformas de ApoE no plasma. A associação entre o genótipo de APOE num indivíduo e a média dos níveis de colesterol é consistente ao longo dos estudos⁶. O

genótipo E4 ($\epsilon 4/\epsilon 4$) predispõe para doença coronária, enquanto que existem evidências de que o E3 ($\epsilon 3/\epsilon 3$) é preventivo da mesma⁶.

Para caracterizar o fenótipo de HF, o projecto Make early diagnosis to Prevent early death (MedPed) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceram critérios clínicos¹, baseados num sistema de pontuação (1-18 pontos) segundo a história familiar, história clínica, exame objectivo e os valores de C-LDL (tabela 1). Uma pontuação entre 3 e 5 pontos prevê uma HF possível, 6-8 HF provável, mais de 8 pontos HF confirmada¹.

Tabela 1- Critérios diagnósticos clínicos para HF de acordo com MedPed e OMS¹.

	Critérios	Pontuação
Historia Familiar	Familiar 1º grau com DCp conhecida e/ou C-LDL > percentil 95	1
	Familiar 1º grau com XT e/ou crianças >18 anos com C-LDL > percentil 95	2
História Clínica	Doente com DCp	2
	Doente com doença vascular cerebral / periférica	1
Exame Objectivo	XT	6
	Arco senil antes dos 45 anos	4
C-LDL	>330 mg/dL	8
	250 - 329 mg/dL	5
	190-259 mg/dL	3
	155-189 mg/dL	1

DCp - Doença coronária prematura (homem antes dos 55 anos e mulher antes dos 60 anos); C-LDL - colesterol das lipoproteínas de baixa densidade; XT - Xantomas tendinosos; mg/dL - miligramas por decilitro.

A hiperlipidemia familiar combinada (HFC) apresenta uma prevalência de 1- 2% no mundo ocidental⁷. A mesma é caracterizada por níveis elevados de colesterol total (CT), c-LDL, triglicéridos (TG), individualmente ou os três em simultâneo. O fenótipo varia entre os vários casos, entre os vários elementos de uma família e apresenta variabilidade intrapessoal¹. Os genes associados à HFC são os genes da lipase da lipoproteína (*LPL*), apolipoproteína A5 (*APOA5*), apolipoproteína A4 (*APOA4*), apolipoproteína C2 (*APOC2*), apolipoproteína C3 (*APOC3*), factor 1 de transcrição *upstream* (*USF 1*)⁸.

Em Portugal, o Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar (EPHF) encontra-se a decorrer desde 1999, estabelecendo uma rede nacional entre vários clínicos que tem como objectivo a identificação molecular de pacientes e respectivo rastreio familiar em cadeia. Os critérios de inclusão no estudo molecular do EPHF baseiam-se nos critérios de Simon Broome, “Simon Broome Heart Research Trust”⁹ (tabela 2).

Os últimos dados do EPHF¹⁰ apontam para a identificação de 171 casos índice com diagnóstico molecular nos últimos 10 anos, o que representa cerca de 48% dos casos enviados para o estudo com critérios clínicos de HF. O rastreio familiar em cadeia dos 171 casos permitiu a identificação e caracterização genética de 404 pacientes com HF em Portugal¹⁰.

O mesmo grupo começa agora a fazer estudos genéticos para outros genes associados à HF como o do *APOE*⁵ e dos genes da HFC, acima explicitados: *LPL*, *ApoA5*, *ApoA4*, *ApoC2*, *ApoC3* e *USF1*⁸.

Tabela 2- Critérios de FH adaptados de “Simon Broome Heart Research Trust”⁹

<p>Hipercolesterolemia familiar confirmada</p>	<p>a) Caso index :</p> <p><i>Criança</i> menor de 10 anos com colesterol total acima de 200 mg/dL (5,2 mmol/L) ou colesterol LDL acima de 120 mg/dL (3,10 mmol/L)</p> <p><i>Criança</i> menor de 16 anos com colesterol total acima de 260 mg/dL (6,7 mmol/L) ou colesterol LDL acima de 155 mg/dL (4,00 mmol/L)</p> <p><i>Adulto</i> com colesterol total acima de 290 mg/dL (7,5 mmol/L) ou colesterol LDL acima de 190 mg/dL (4,9 mmol/L)</p>
	<p>b) xantomas tendinosos no caso-index ou familiar (pais, filhos, avós, irmãos, tios)</p>
	<p>c) Evidência genética de mutação no receptor de LDL ou ApoB</p>
<p>Hipercolesterolemia familiar possível</p>	<p>a) Caso index :</p> <p><i>Criança</i> menor de 10 anos com colesterol total acima de 200 mg/dL (5,2 mmol/L) ou colesterol LDL acima de 120 mg/dL (3,10 mmol/L)</p> <p><i>Criança</i> menor de 16 anos com colesterol total acima de 260 mg/dL (6,7 mmol/L) ou colesterol LDL acima de 155 mg/dL (4,00 mmol/L)</p> <p><i>Adulto</i> com colesterol total acima de 290 mg/dL (7,5 mmol/L) ou colesterol LDL acima de 190 mg/dL (4,9 mmol/L)</p>
	<p>b) História familiar de enfarte do miocárdio antes dos 50 anos em avós e tios ou antes dos 60 anos nos pais, irmãos e filhos</p>
	<p>c) História familiar de níveis elevados de colesterol total (>290 mg/dL e >200 mg/dL, crianças menores de 16 anos) nos pais, irmãos ou filhos; ou colesterol total <290 mg/dL (7,5mmol/L) nos avós e/ou tios.</p>

Este estudo tem por base uma família com dislipidemia refractária ao tratamento, em que existe doença coronária prematura em duas gerações. Em parceria com o EPHF, incluiu-se

esta família no estudo para caracterização bioquímica e molecular. Para além dos genes da HF, estendeu-se o estudo ao gene da *APOE* (exão 4) e ainda aos genes da HFC acima referidos. Assim, o presente trabalho teve como objectivo caracterizar clínica, bioquímica e molecularmente esta família.

2. Materiais e Métodos

a) Caso índice

O caso índice da família participante foi um homem, com 55 anos de idade, caucasiano, nacionalidade Portuguesa, residente em Portugal até há cinco anos atrás, aquando emigrou para França. Como antecedentes médico-cirúrgicos apresentava hipercolesterolemia há mais de 10 anos, hipertensão arterial estágio 1¹¹ com evolução de 7 anos, controlada mas não medicada. Foi submetido a colecistectomia laparoscópica por litíase vesicular aos 51 anos. O paciente tinha um índice de massa corporal (IMC) de 27 kg/m², era fumador de 13,5 unidades maço ano (UMA) e fazia actividade física regular (caminhadas, 3 vezes por semana). O utente tinha história familiar de Enfarte Agudo do Miocárdio (EAM) do seu pai, aos 66 anos, e que determinou a sua morte. A avaliação do risco cardiovascular¹² aos 52 anos conferia um score 3-4% - risco cardiovascular moderado¹². Aos 52 anos de idade deu entrada no hospital por dor no braço esquerdo com irradiação para o pescoço e maxila esquerda, sensação de aperto no peito e elevação da pressão arterial. Foi diagnosticado um EAM, tendo sido transferido para uma unidade especializada em intervenção coronária. Foi submetido a coronariografia onde foram descritas, na artéria coronária esquerda, estenoses de 70-99%, comprimento de 10-15 mm, com calcificações moderadas importantes na artéria circunflexa da artéria coronária esquerda e ramo marginal esquerdo. Na bifurcação do ramo interventricular anterior e ramo lateral interventricular anterior da artéria coronária esquerda, as lesões correspondiam a placas com um comprimento de 10-15 mm, um grau de estenose de 10-30 mm e com calcificações mínimas. Na artéria coronária direita, nomeadamente no ramo marginal, a estenose era de 70-99%, com comprimento de 10-15 mm e calcificações mínimas. Foi efectuada angioplastia na artéria coronária esquerda com colocação de stent coronário com libertação prolongada de Everolimus Xience PRIME, Abbott®. Após alta do internamento, o utente passou a ser medicado para controlo da pressão arterial, níveis lipídicos séricos e terapêutica profiláctica com antiagregação plaquetária. O utente abandonou os hábitos tabágicos e manteve a prática regular de actividade física (caminhadas, 3 vezes por semana). A avaliação do risco cardiovascular actual é alto/muito alto, sendo que o utente tem sido acompanhado regularmente por cardiologista.

b) Família Participante

Ao elaborar a história clínica do caso índice, foi notável a presença de vários elementos da família com níveis de colesterol elevado e um elemento com morte por evento associado a doença cardiovascular. Como se pode constatar pelo heredograma da figura 4, nas duas

primeiras gerações (I1 e I6) existem acidentes cardiovasculares e a hipercolesterolemia está presente nas duas últimas gerações (II1, II4, II5, II6, II8, III1).

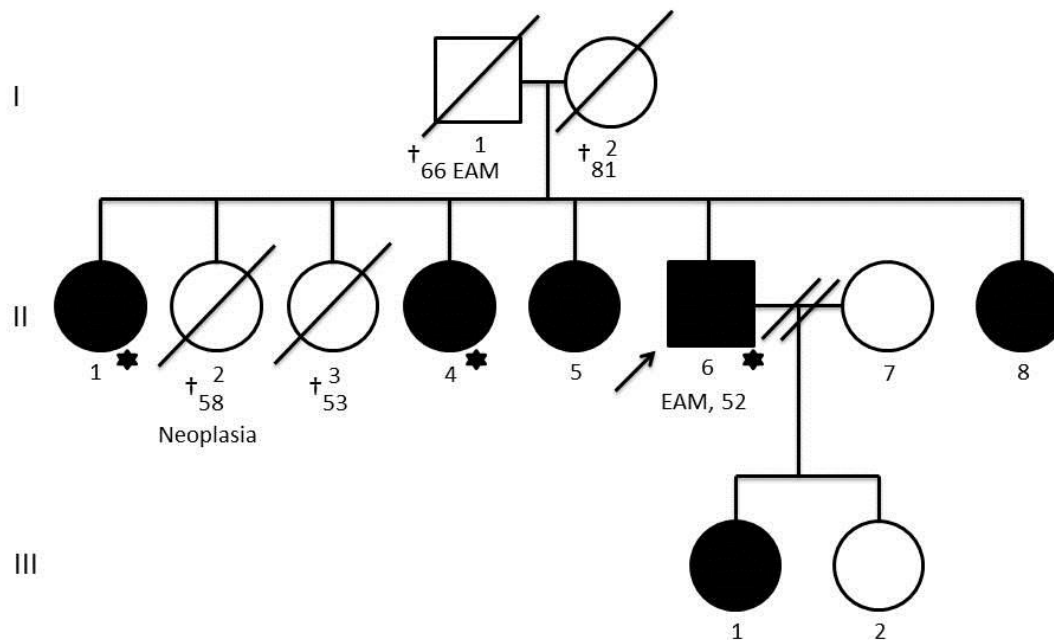


Figura 4- Heredograma da família em estudo: Círculos - sexo feminino; quadrados- sexo masculino; figuras preenchidas a negro - níveis elevados de colesterol; linha oblíqua única - morte; linha oblíqua dupla - divórcio; seta- caso índice; estrela - elementos que preenchem critérios para inclusão no EPHF; numeração romana - denominação de gerações; numeração 1-8 - denominação de elementos de cada geração; EAM - Enfarte agudo do miocárdio; † -morte e idade correspondente.

Para a inclusão no EPHF é necessário o preenchimento de critérios clínicos, quer para uma HF confirmada, quer para HF possível, com base nos critérios de “Simon Broome Heart Research Trust”⁹ (tabela 2). Segundo os critérios adaptados, esta família possui hipercolesterolemia familiar possível, uma vez que o caso índice é um adulto com história de colesterol total acima de 290 mg/dL ou colesterol LDL acima de 190 mg/dL e história familiar de níveis elevados de colesterol total nas irmãs (acima de 290 mg/dL); o elemento II1 em 2010 apresentava colesterol de 319 mg/dL; II4 em 2011, possuía colesterol total de 299 mg/dL;

A premissa b) “história familiar de enfarte do miocárdio antes dos 60 anos nos pais” não está cumprida, pois o pai do caso índice terá falecido aos 66 anos. Ainda assim, a presença de evento coronário é relevante, pois vai corroborar a importância deste estudo como contributo para diminuição do risco cardiovascular nas gerações seguintes.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (ref: CE-FCS-2013-017), Comissão de Ética do INSA (anexo 1) e

todos os familiares aceitaram participar, assinando os devidos consentimentos informados (anexo 2).

c) Caracterização bioquímica

A caracterização bioquímica foi realizada no Laboratório de Química Clínica da Unidade Laboratorial Integrada (ULI) do INSA (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge). Ao caso-índice e a cada elemento da família, foi colhido um total de 10 mL de sangue venoso, em tubos para soro, centrifugados a 3500 rotações por minutos (rpm) durante 10 minutos e enviados para o INSA, para avaliação lipídica. Foram avaliados os níveis de colesterol total (CT), c-LDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade (c-HDL), ApoA, ApoB, triglicerídeos (TG), por método colorimétrico enzimático e Lp(a) por método imunoturbidimétrico, utilizando um analisador automático de bioquímica (Cobas Integra 400 plus, Roche®)

d) Caracterização molecular

O isolamento do DNA de todos os participantes foi realizado no CICS (Centro de Investigação em Ciências da Saúde) e o restante estudo molecular do caso índice, no Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis do INSA, no âmbito do EPHF. Como está exemplificado na figura 5, este estudo compreende a pesquisa de mutações genéticas mais comuns em 2 exões no gene *APOB* (exão 26 e 29) e o estudo completo do gene do *LDLR*. Numa segunda fase e como não foram encontradas mutações nestes genes, pesquisaram-se grandes rearranjos (deleções ou duplicações) no gene *LDLR* pela técnica de MLPA. Por fim, realizou-se o estudo do gene *PCSK9* (12 exões). Para estudo complementar foram ainda pesquisadas alterações nos genes *LPL*, *APOA4*, *APOA5*, *APOC2*, *APOC3* e *USF1*.

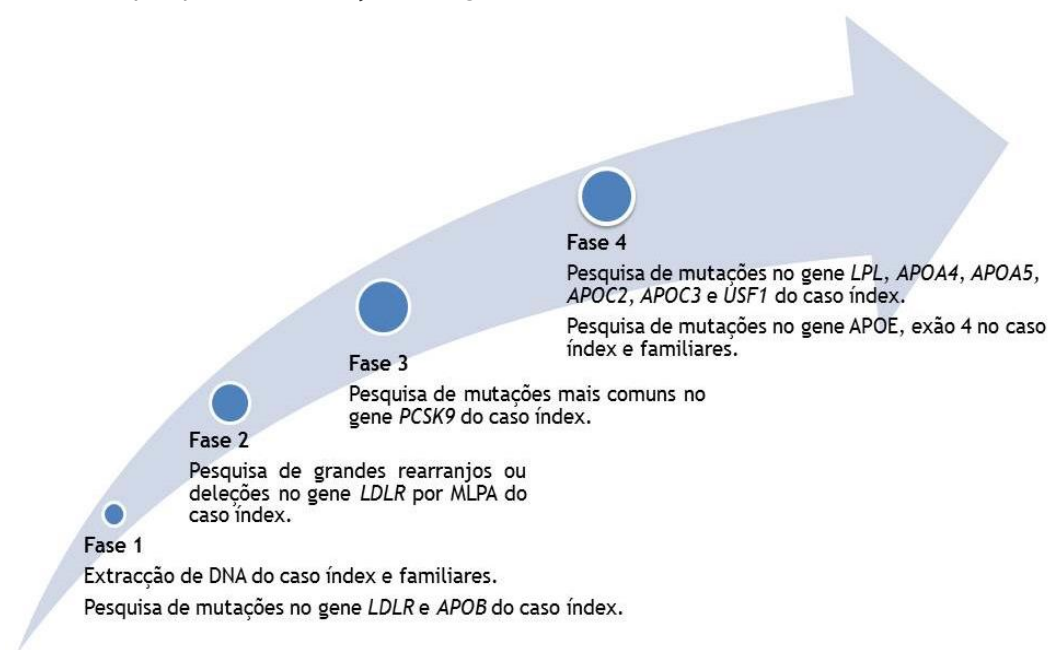


Figura 5 - Fases do EPHF e estudos complementares feitos aos elementos em estudo.

i) Extracção de DNA genómico

Foi colhido um total de 10mL de sangue venoso, em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), ao caso-índice e familiares. O DNA foi extraído dos leucócitos de sangue periférico e armazenado a 4°C até à sua manipulação. O método usado foi baseado no método “salting-out” descrito por Miller¹³. O protocolo seguido encontra-se no anexo 3.

ii) Quantificação de DNA

A análise rigorosa de preparações de DNA requer que o mesmo seja o mais livre de impurezas possível e que, por outro lado, tenha a quantidade de DNA necessário. A aferição da qualidade e quantidade de DNA foi feita por determinação espectrofotométrica (nanophotometer TM, Impen, Alemanha). Através da análise de absorção dos raios ultra violeta (UV) pelos nucleótidos, obtém-se uma estimativa precisa da concentração de ácidos nucleicos na amostra. As purinas e pirimidinas têm absorção máxima por volta dos 260 nanómetros (nm) (dATP: 259nm;dCTP:272nm; dTTP: 247nm) se a amostra de DNA for pura, sem contaminação significativa de proteínas ou outros componentes. Para obter o grau de pureza é determinado o rácio OD260/OD280. Um rácio entre 1.8 - 2.0 significa que a absorção é feita pelos ácidos nucleicos. Um rácio inferior indica a presença de proteínas ou outros absorventes de UV. Um rácio superior a 2.0 significa que as amostras estão contaminadas por RNA. Após a quantificação todas as amostras foram diluídas para a mesma concentração (100ng/µL).

iii) Amplificação por PCR

A reacção de cadeia em polimerase (PCR) foi desenvolvida em 1985 por Karry Mullis e é usada para aumentar exponencialmente um determinado fragmento de DNA *in vitro*. Os protocolos para cada gene e para cada exão encontram-se em anexo (anexos 4, 5, 6 e 7). A amplificação foi levada a cabo em dois termocicladores *T300 thermocycler* (Biometra) e *T professional Basic Gradient* (Biometra). Foi estudado o DNA do caso-índice para análise dos genes de *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LPL*, *APOA4*, *APOA5*, *APOC2*, *APOC3* e *USF1*. Para o gene da *APOE* foi estudado o DNA de todos os elementos da família.

Os produtos de amplificação foram analisados por electroforese em tampão TBE (tris, ácido bórico e EDTA) tendo sido utilizados como marcadores: *puC Mix marker*, 8 *SM0302*, (Fermentas Life Science) e *BioRad Ezload TM 1kb, Molecular Ruler*. Os géis foram visualizados no transiluminador (*safe imager blue light + safe imager TM invitrogen®*). A purificação foi feita por digestão enzimática recorrendo a Exonuclease I e da *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) que compõe a *ExoSAP-IT®* (AmershamPharmacia Biotech). A purificação do produto de PCR foi efectuada de acordo com as recomendações do fabricante, encontrando-se o protocolo em anexo (anexo 4, 5, 6 e 7).

iv) Sequenciação do DNA

A sequenciação dos fragmentos purificados foi realizada de forma automática sendo que a reacção de sequenciação respeitou as instruções do fabricante, *Big Dye terminator cycle sequencing ready reaction kit* (Applied Biosystems). A sequenciação foi realizada no sistema ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems), que consiste num método eletroforético em capilar único. Posteriormente, o *software* interpreta o resultado baseando-se na intensidade da fluorescência em cada ponto e associando-a à base correspondente. As sequências obtidas foram analisadas recorrendo ao programa Standen package®.

v) MLPA

Grandes rearranjos nos genes *LDLR* foram pesquisados pela técnica de *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA), usando SALSArMLPAr KIT P062 LDLR MRC-Holland (Amsterdão, Holanda). Para o estudo do gene *LDLR* foi usada SALSA MLPA probemix P062-C2 LDLR MRC-Holland (Amsterdão, Holanda) conforme indicações do fornecedor. Os produtos foram analisados com GeneScan Analysis Software Version 2.5 (Applied Biosystems) e exportados para folhas de excel para processamento. A altura dos picos foi normalizada e depois dividida pelos picos normalizados das amostras-controlo. Deleções heterozigóticas de sequências reconhecidas deverão dar uma redução da área do pico de cerca 35-50%.

3. Resultados

O estudo bioquímico efectuado no laboratório de bioquímica do INSA permitiu obter os perfis lipídicos do caso índice (II6) e familiares, representados na tabela 3. Ao analisarmos estes resultados, os mesmos não se enquadram nos critérios de HF do EPHF apresentados anteriormente, dado que no momento da colheita não atingiram os valores mínimos de colesterol total ou c-LDL para inclusão no estudo. Não obstante, estes são valores obtidos com os elementos sob efeito de terapêutica farmacológica, nomeadamente os elementos II1,II4,II5,II6 e II8. Para participação no EPHF os critérios incluem os valores antes de medicação, obtidos em 2 alturas diferentes. Estes foram cumpridos, como mencionado na descrição da família participante.

Tabela 3 - Resultados Bioquímicos dos vários elementos da família, designados pela identificação do heredograma.

	II 6*	III2	III1	II1*	II5*	II8*	II4*
CT mg/dL	206	168	229	240	236	209	237
c-HDL mg/dL	59	50	66	73	97	101	72
c-LDL mg/dL	126	102	133	146	131	94	165
Lp(a) mg/dL	58	34	11	26	33	30	26
ApoA1mg/dL	175	154	196	201	236	228	176
ApoB mg/dL	111	68	117	113	102	76	111
TG mg/dL	118	72	146	50	60	57	71

CT - Colesterol total; c-HDL- colesterol das HDL; c-LDL- colesterol das LDL; Lp (a) - Lipoproteína a; Apo A1 - Apolipoproteína A1; ApoB- Apolipoproteína B; TG- Triglicerídeos; mg/dL - miligrama por decilitro; * - sob terapêutica farmacológica.

Tabela 4 - Polimorfismos encontrados nos vários genes, tipo de alteração, codificação e frequência.

Gene	E/I	Polimorfismo	Alteração	dbSNP	MAF*
<i>LDLR</i>	I2	cDNA:NM_000527.3:c.190+56G>A	S. I2	rs3745677	A=0,093
<i>LDLR</i>	I2	cDNA:NM_000527.3:c.190+144G>A	S. I2	rs17242416	A=0,001
<i>LDLR</i>	I7	cDNA:NM_000527.3:c.1060+10G>C	S. I7	rs12710260	C=0,283
<i>LDLR</i>	11	cDNA: NM_000527.3:c.1617C>T	S.S.	rs5929	T=0,124
<i>LDLR</i>	12	cDNA:NM_000527.3:c.1773C>T	S.S.	rs688	T=0,280
<i>LDLR</i>	I16	cDNA:NM_000527.3:c.2389+46C>T	S. I16	rs2738460	T=0,250
<i>LDLR</i>	I17	cDNA:NM_000527.3:c.2548-80G>A	S. I17	rs2116897	A=0,250
<i>LDLR</i>	3'UTR	cDNA:NM_000527.3:c.2548-42A>G	S. I17	rs6413504	G=0,360
<i>Apo E</i>	4	cDNA:NM_c.3887T>C(p.Cys112Arg) cDNA:NM_c.3526T>C(p.Arg176Cys)	ε3/ε3	rs429258 rs7415	
<i>USF 1</i>	I7	cDNA:NM_001113205.1:c.-2083G>A		rs2073658	A=0,216
	E11	cDNA:NM_001113206.1:c.-844C>T		rs3737787	T=0,216

dbSNP - base de dados de Polimorfismo de Nucleótido Único (SNP); E - exão; I- Intrão; MAF - frequência do alelo *minor*; A- Adenina; C- Citosina; T - Timina; G- Guanina; S - Substituição; S.S - Substituição sinónima. MAF* - dados obtidos do projecto 1000 genomas (www.1000genomes.org).

No estudo molecular do caso índice foram encontrados diversos polimorfismos como se pode constatar na tabela 4.

No gene *LDLR* encontraram-se dois polimorfismos no exão 2 (figura 6): rs3745677, que constitui uma substituição no intrão 2 de uma guanina por uma adenina e com uma frequência de alelo *minor* (MAF) de A=0,093 e o polimorfismo rs17242416, também ele uma substituição no intrão 2 de uma guanina por adenina com uma MAF de 0,001.

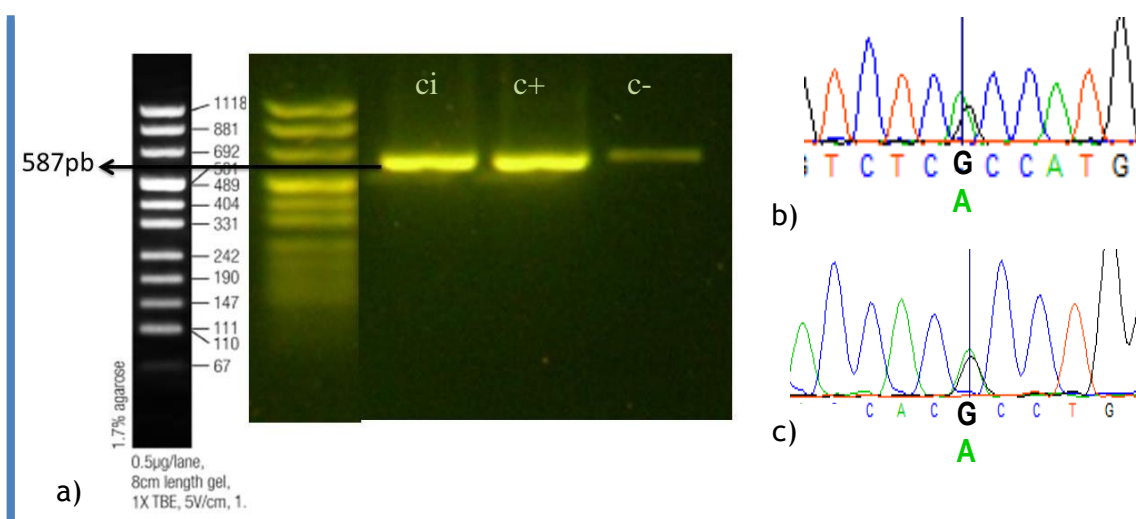


Figura 6 - a) Electroforese em gel de agarose do Exão 2 do gene *LDLR*, do caso índice, controlo positivo e controlo negativo, com comprimento de 587 pares de bases (pb). b) Leitura da sequência correspondente ao polimorfismo rs 3745677, cDNA:NM_000527.3:c.190+56G>A. c) Leitura da sequência correspondente ao polimorfismo rs17242416, cDNA:NM_000527.3:c.190+144G>A. A - Adenina; C- Citosina; G- Guanina; T - Timina; pb- pares de bases; ci -caso índice; c+ - controlo positivo; c- - controlo negativo.

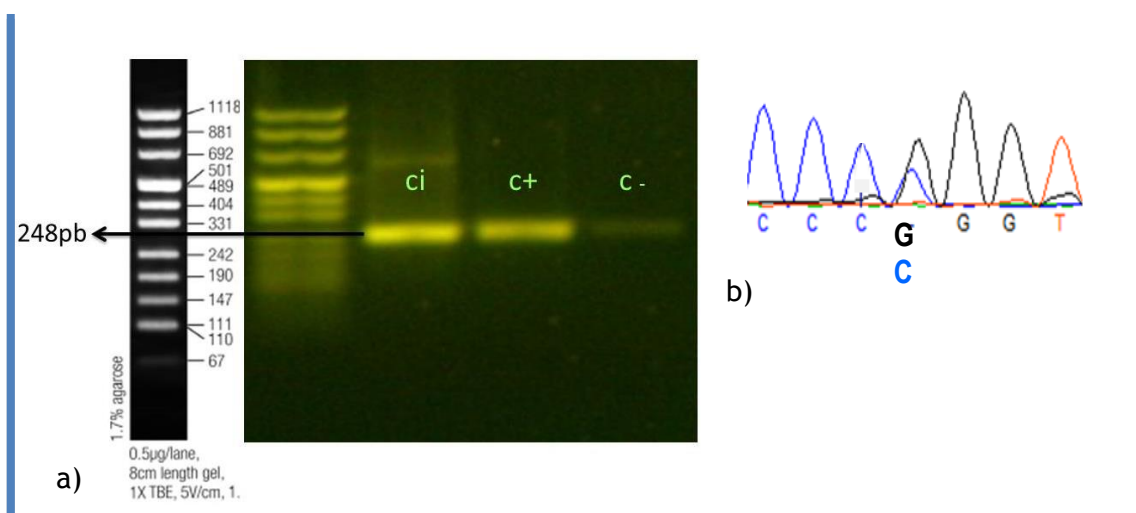


Figura 7 - a) Electroforese em gel de agarose do Exão 7 do gene *LDLR*, do caso índice, controlo positivo e controlo negativo, com comprimento de 248 pares de bases (pb). b) Leitura da sequência correspondente ao polimorfismo rs12710260, cDNA:NM_000527.3.1060+10G>C. A - Adenina; C- Citosina; G- Guanina; T - Timina; pb- pares de bases; ci -caso índice; c+ - controlo positivo; c- - controlo negativo.

No exão 7 (figura 7), existe uma substituição no intrão 7 de uma guanina por uma citosina, polimorfismo identificado como rs12710260 e com uma MAF de C=0,283. No exão 11 (figura 8) o polimorfismo rs5929 constituiu numa substituição sinónima não havendo alteração da proteína sendo a MAF de T=0,124. O exão 12 (figura 9) possui um polimorfismo conhecido como rs688 que consiste numa substituição de uma citosina por uma timina e com uma MAF de T= 0,280. Este é um polimorfismo estudado mais amplamente pela sua relação com o aumento do colesterol e associação à HF¹⁴.

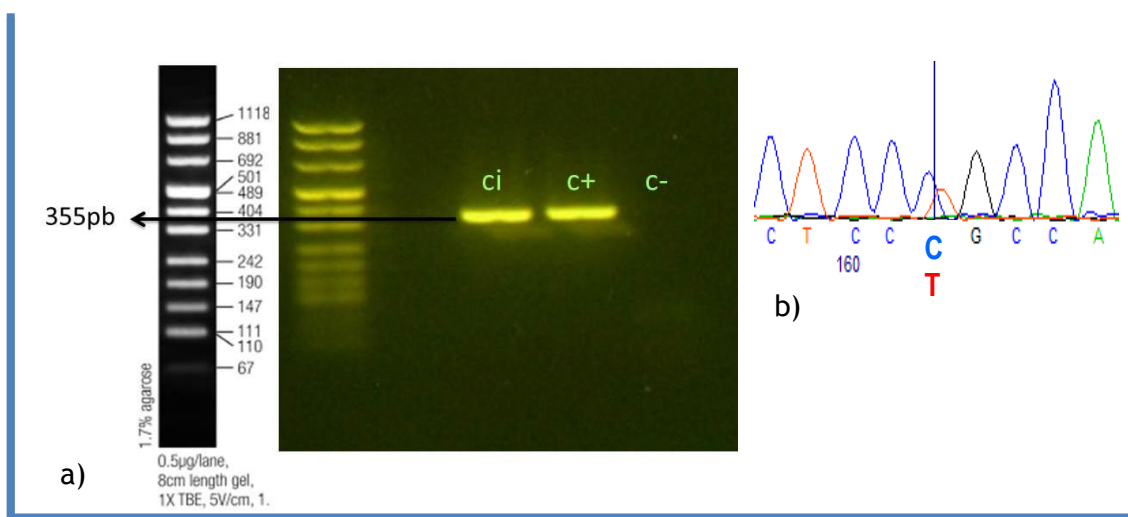


Figura 8 - a) Electroforese em gel de agarose do Exão 11 do gene *LDLR*, do caso índice, controlo positivo e controlo negativo, com comprimento de 355 pares de bases (pb). b) Leitura da sequência correspondente ao polimorfismo rs 5929, cDNA:NM_000527.3:c.1617C>T. A - Adenina; C- Citosina; G- Guanina; T - Timina; pb- pares de bases; ci -caso índice; c+ - controlo positivo; c- - controlo negativo.

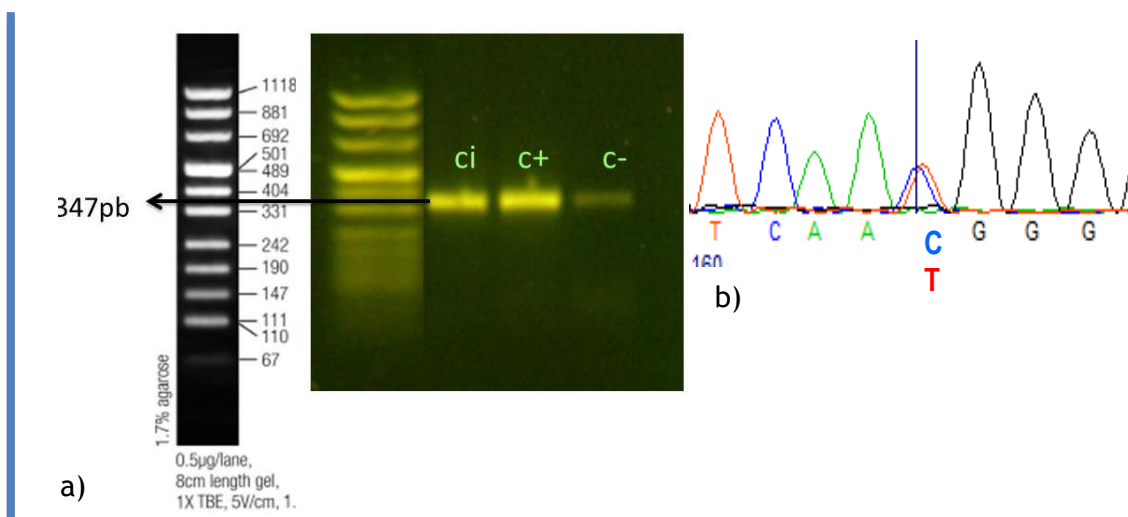


Figura 9 - a) Electroforese em gel de agarose do Exão 12 do gene *LDLR*, do caso índice, controlo positivo e controlo negativo, com comprimento de 347 pares de bases (pb). b) Leitura da sequência correspondente ao polimorfismo rs688, cDNA:NM_000527.3:c.1773C>T. A - Adenina; C- Citosina; G- Guanina; T - Timina; pb- pares de bases; ci -caso índice; c+ - controlo positivo; c- - controlo negativo.

No exão 16 encontrou-se o polimorfismo rs2738460, uma substituição de citosina por timina com MAF T=0,250 (figura 10).

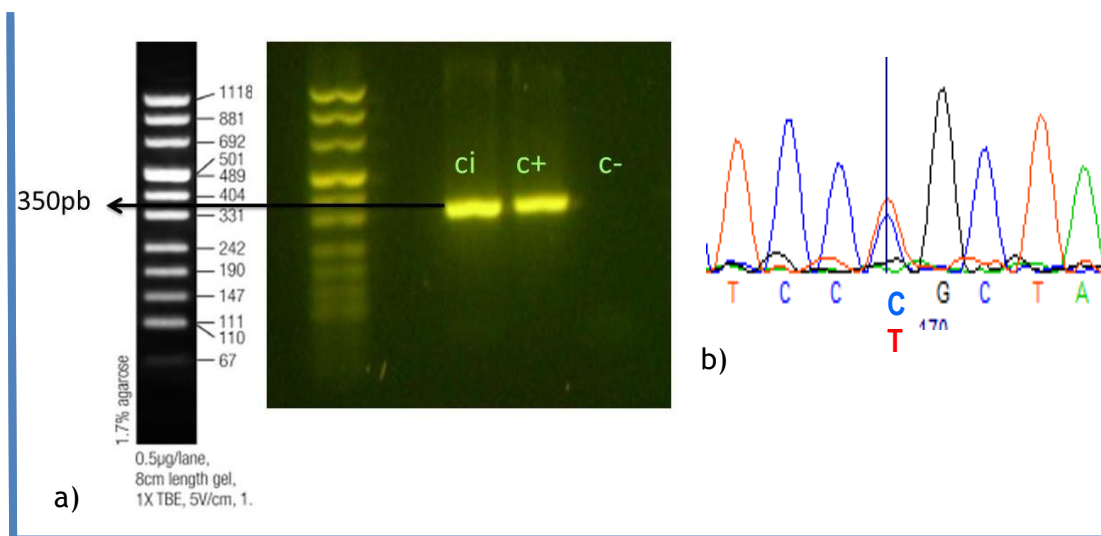


Figura 10 - a) Electroforese em gel de agarose do Exão 16 do gene *LDLR* do caso índice, controlo positivo e controlo negativo, com comprimento de 350 pares de bases (pb). b) Leitura da sequência correspondente ao polimorfismo rs2738460, cDNA:NM_000527.3:c.2389+46C>T. A - Adenina; C- Citosina; G- Guanina; T - Timina; pb- pares de bases; ci -caso índice; c+ - controlo positivo; c- - controlo negativo.

No exão 18, foram identificados dois polimorfismos: rs2116897 que constitui na substituição de guanina para adenina com uma MAF de A= 0,250 e rs6413504 representada pela alteração de uma adenina por uma guanina, com MAF de G= 0,360 (figura 11). Nos genes *APOB* e *PCSK9* não se encontraram mutações nem polimorfismos.

A pesquisa de grandes deleções ou rearranjos pela técnica de MLPA foi negativa.

O estudo do gene *APOE* feito a todos os elementos da família revelou que o aminoácido 130 é uma cisteína (TGC) e o aminoácido 176 é uma arginina (CGC) como mostra o pico da sequenciação do gene. Assim, todos os elementos da família têm dois alelos $\epsilon 3$ (c.388T>C(p.Cys130Arg) / c.3526T>C(p.Arg176Cys), o que faz um genótipo de $\epsilon 3/\epsilon 3$.

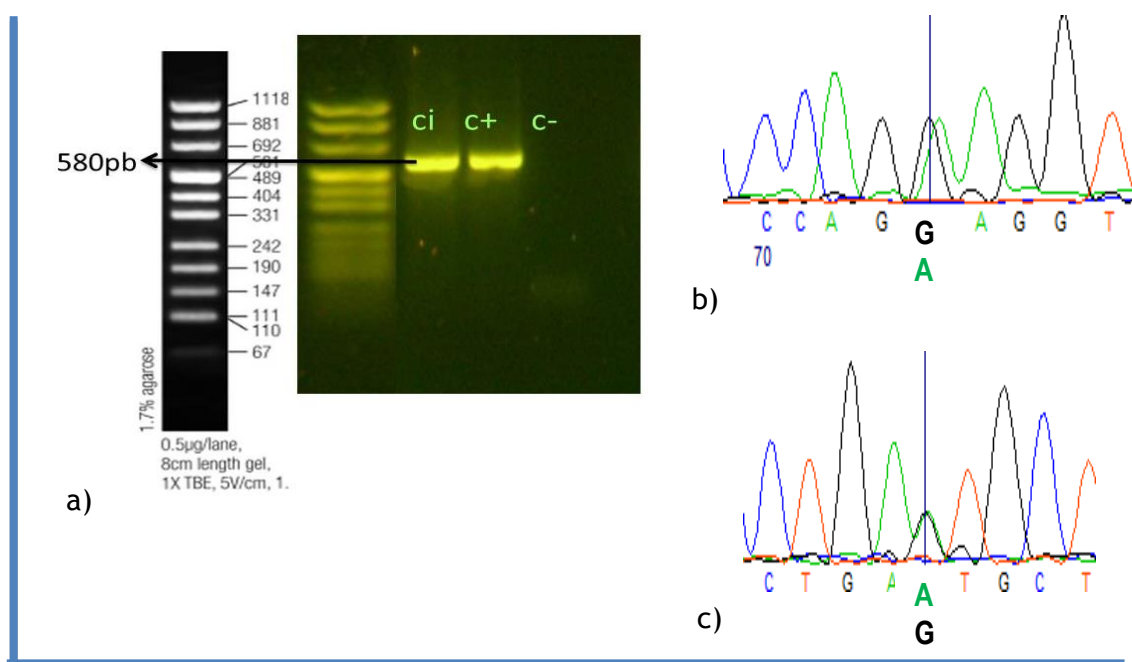


Figura 11 - a) Electroforese em gel de agarose do Exão 18 do gene *LDLR*, do caso índice, controlo positivo e controlo negativo, com comprimento de 580 pares de bases (pb). b) Leitura da sequência correspondente ao polimorfismo rs 2116897, cDNA:NM_000527.3:c.2548-80G>A. c) Leitura da sequência correspondente ao polimorfismo rs6413504, cDNA:NM_000527.3:c.2548-42A>G. A - Adenina; C- Citosina; G- Guanina; T - Timina; pb- pares de bases; ci - caso índice; c+ - controlo positivo; c- - controlo negativo.

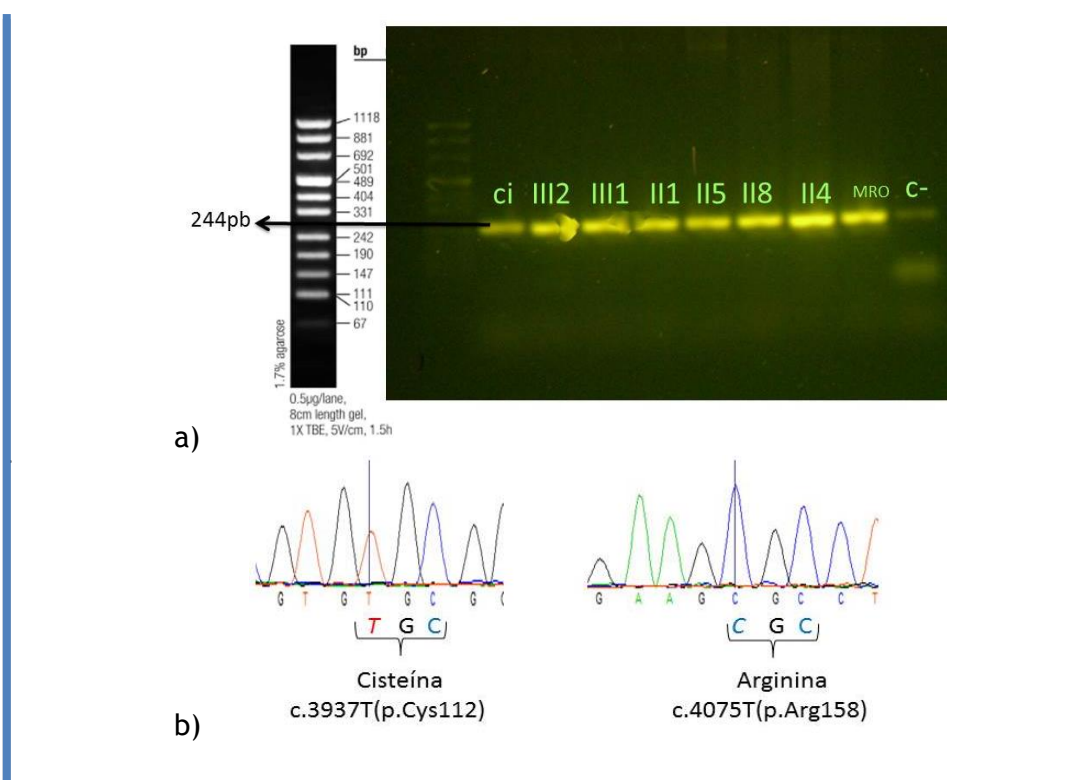


Figura 12 - a) Electroforese em gel de agarose. b) leitura da sequência do Exão 4 do gene *APOE* do caso índice. A-Adenina; C- Citosina; G-Guanina; T- Timina; Cys - cisteína; Arg - Arginina. pb- pares de bases.

No estudo dos genes da HFC, apenas no gene *USF1*, intrão 7 e exão 11, se encontraram polimorfismos. No intrão 7 detectou-se o polimorfismo rs2073658, anteriormente conhecido como USFf1-S2, em que há uma substituição de uma guanina por uma timina e apresenta uma MAF de A=0,216. O polimorfismo do exão 11, rs3737787, anteriormente conhecido como USF1-S1 refere-se a uma substituição de uma citosina por uma timina e possui uma MAF de T=0,216. Estes dois polimorfismos são importantes porque o seu papel no processo aterosclerótico e no metabolismo dos lípidos tem vindo a ser documentado^{18,19}.

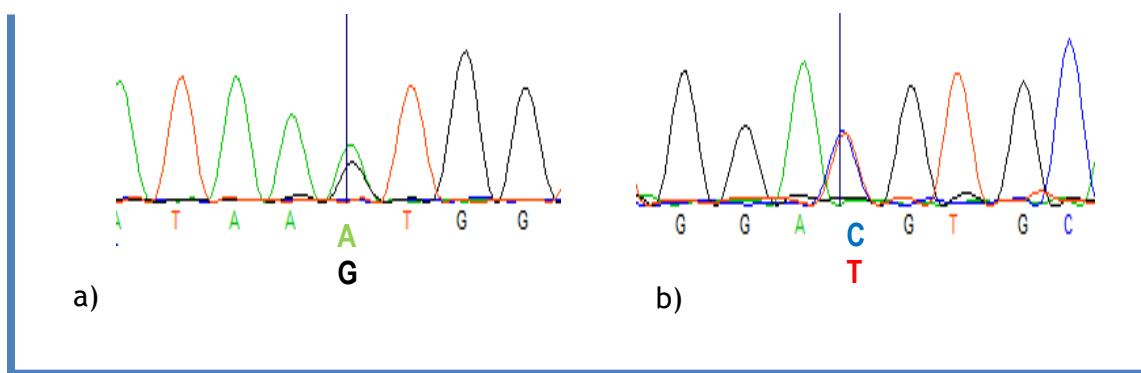


Figura 13 - Leitura de sequência do gene *USF1*. a) Intrão 7- Leitura da sequência correspondente ao polimorfismo rs2073658, substituição de G>A. b) Exão 11- Leitura da sequência correspondente ao polimorfismo rs3737787, substituição de C>T. A - Adenina; C- Citosina; G- Guanina; T - Timina.

4. Discussão/conclusão

O estudo bioquímico confirmou níveis de colesterol elevados em vários elementos da família, sendo o caso índice, um caso adequado a ser estudado molecularmente, mais pelo risco cardiovascular que apresenta, do que por cumprir exactamente os critérios quer da MedPed/OMS¹ quer os adaptados do EPHF no momento do estudo⁹.

O estudo molecular não identificou mutações, mas vários polimorfismos. A importância da distinção entre polimorfismo e mutação torna-se imperativa. Uma mutação refere-se a uma alteração específica numa sequência de DNA que altera o fenótipo e que é suficiente para causar doença¹⁸. Um polimorfismo é reconhecido como uma alteração na sequência de DNA que é neutra, ou seja, não é causadora imprescindível de doença. Uma variação polimórfica geralmente significa que há uma alteração na estrutura de DNA sem efeito no fenótipo e presente numa frequência igual ou superior a 1%¹⁸. O polimorfismo rs17242416 encontrado no intrão 2 do gene *LDLR*, apresenta uma frequência inferior a 1%. No entanto ainda não é descrito como mutação e não existe informação disponível que caracterize a mesma na sua capacidade de afectar a função da proteína que codifica. A diferenciação na nomenclatura de mutação e polimorfismo tem sido debatida e segundo a Sociedade de Variação de Genoma Humano (HGVS)¹⁹ (a qual define as linhas orientadoras da nomenclatura), devem ser usadas expressões como variantes alélicas ou variantes de sequência e classificá-las na sua capacidade de afectar ou não a função para que esse gene está determinado¹⁹. Existem vários tipos de alterações que vão determinar os vários tipos de mutação: *Missense*²⁰ - substituição de um nucleótido por outro, correspondendo a um códon que codifica um aminoácido diferente do original. Este facto leva a que a proteína obtida seja diferente da original e apresente a sua função alterada; *Nonsense*²⁰ - substituição de um nucleótido por outro determina a formação de um códon stop prematuramente, o que se traduz numa proteína geralmente não funcional; *Frameshift*²⁰ - refere-se à inserção ou deleção de pares de bases que provocam um desfasamento no quadro de leitura e a não ser que essa adição/eliminação ocorra em 3 ou múltiplos de 3 nucleótidos, as proteínas resultantes são normalmente não funcionais, *Splice-site*²¹ - estas alterações são em regiões adjacentes aos exões e podem resultar na deleção ou inserção de 1 intrão/exão ou de alguns pares de bases o que neste último caso leva à introdução de um códon stop prematuro. Também pode dar-se o caso de no local de excisão haver a exclusão de um exão originando por isso um transcrito de RNA instável ou um polipeptídeo não funcional devido à perda de um grupo de aminoácidos importantes.

Os grandes rearranjos (eliminação ou duplicação de um ou mais exões do gene) originam proteínas não funcionantes. Quando existem mutações na região promotora do gene, a proteína não é sintetizada. A ausência completa da proteína (alelo nulo) provoca um fenótipo

mais grave de doença. Aquelas que levam a defeitos estruturais (defeito de alelo) poderão originar uma proteína que ainda mantém alguma actividade, originando por isso um fenótipo menos grave²⁰.

No estudo efectuado no gene do *LDLR*, exão 12, foi encontrado um polimorfismo associado ao aumento do colesterol total e do LDL¹⁴. Segundo o estudo de Gao et al.¹⁴, rs688 promove o *splicing* alternativo do exão 12, sendo que o alelo “T” aumenta a acumulação de LDLR nos lisossomas e diminui o LDLR na superfície celular alterando assim a distribuição intracelular do LDLR. Este efeito parece ainda inibir a redução da captação do LDL mediada pelo PCSK9.

O estudo de MLPA foi negativo para grandes deleções ou rearranjos no gene *LDLR*. No gene *PCSK9* não foram encontradas mutações nem polimorfismos importantes. Quanto ao resultado da análise do gene *APOE*, o caso índice e restantes elementos da família, são $\epsilon 3/\epsilon 3$, o que segundo os estudos⁶, representa um efeito nulo no aumento de colesterol sérico⁶.

Quanto aos genes da hiperlipidemia familiar combinada, dois polimorfismos são de especial interesse no gene da *USF1*. Num estudo¹⁵ efectuado em famílias holandesas com DC e em utentes caucasianos nos Estados Unidos com DAC, o alelo comum rs3737787 foi associado aos níveis séricos de lípidos nas duas populações em estudo e à hiperlipidemia familiar combinada. Este estudo corrobora ainda a associação entre os polimorfismos rs3737787 e rs2073658 e os níveis de CT, apoB e a presença de DC. Kristiansson et al,¹⁶ numa análise acerca da associação de variantes no gene *USF1* em utentes com aterosclerose coronária, chegaram à conclusão que o gene *USF1* contribuía para a aterosclerose, através de um fenótipo de parede arterial patológica, resultando em doença arterial coronária. Os mesmos autores mencionam um estudo de coorte de Reiner et al,¹⁷ em que os polimorfismos rs3737787 fortemente correlacionados com o rs2073658, se associam ao risco de calcificação das artérias coronárias.

O diagnóstico de HF molecular na família em estudo não foi possível porque não se encontrou nenhuma mutação nos genes estudados. Segundo os últimos resultados apresentados pelo EPHF¹⁰, isto é compatível com os resultados encontrados nos estudos preliminares em que dos casos enviados para estudo, 48%¹⁰ não possuíam alterações genéticas. Este resultado encontra-se de acordo com o estudo Talmud et al²², que conclui que numa proporção substancial de pacientes com HF não é conhecida mutação genética, e que portanto, a elevação de c-LDL poderá ter uma causa poligénica²².

Qual a importância a dar aos polimorfismos como indicadores de risco cardiovascular? Certamente esta família não estará toda condicionada por factores puramente ambientais e do estilo de vida em várias gerações. Sabendo ainda que a doença tem heterogeneidade genética, podem existir mutações em genes que não foram estudados.

Torna-se imperativo investigar a susceptibilidade genética de *clusters* de polimorfismos com consequência funcional patológica. Ou seja, perceber de que modo a associação de polimorfismos num indivíduo contribui de modo cumulativo ou potenciador para elevação dos níveis de lípidos e/ou a sua associação à aterosclerose. Os estudos destas associações para os genes conhecidos da HF são escassos e podem ser a chave para uma melhor compreensão destas doenças.

Podemos então concluir que a combinação dos polimorfismos estudados com outras variáveis genéticas não estudadas e os efeitos ambientais podem ser a explicação para os níveis elevados de lípidos nesta família e que contribuem para o risco cardiovascular significativo. Assim, este estudo permitiu conduzir a uma intervenção mais adequada e precoce nos restantes elementos da família. Os participantes no estudo ficaram mais sensibilizados para o controlo adequado dos níveis de colesterol, quer farmacologicamente quer com estilos de vida saudáveis o que se traduzirá em comportamento tendo em vista a diminuição do risco cardiovascular.

O estudo funcional do polimorfismo rs17242416 é peremptório, uma vez que apresenta uma frequência inferior a 1%¹⁴ e ainda não existem estudos que avaliem se o mesmo é ou não patogénico. Por outro lado, será importante analisar esta variante em outros membros desta família a fim de determinar se existe co-segregação com a hipercolesterolemia. No futuro, esta família poderia ainda ser proposta para sequenciação completa do exoma humano²³. A mesma permite determinar variações em todas as zonas codificadas dos genes conhecidos (mais de 95% exões conhecidos²³), traduzindo-se num estudo mais completo. Esta é uma promissora tecnologia do futuro que possibilitará uma intervenção mais personalizada no futuro da medicina.

Bibliografia

- 1- European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation, Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, Agewall S, Alegria E, Chapman MJ, Durrington P, Erdine S, Halcox J, Hobbs R, Kjekshus J, Filardi PP, Riccardi G, Storey RF, Wood D; 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.
- 2- Bourbon M, Rato Q. Alterações genéticas do metabolismo lipoproteico. *RFML* 2006; serie III; 11 (4):193-201.
- 3- Bourbon M, Rato Q. Lipoproteínas, genética e aterosclerose. *RFML* 2006; serie III; 11(2):67-73.
- 4- DeMott K, Nherera L, Shaw EJ, Minhas R, Humphries SE, Kathoria M, Ritchie G, Nunes V, Davies D, Lee P, McDowell I, Neil A, Qureshi N, Rowlands P, Seed M, Stracey H, Thorogood M, Watson M. Clinical Guidelines and Evidence Review for Familial hypercholesterolaemia: the identification and management of adults and children with familial hypercholesterolaemia. 2008. Disponível em URL <http://www.nice.org.uk/nicemedia/live/12048/41700/41700.pdf>, última vez acedido em 15 de Maio de 2014.
- 5- Blasiolo DA, Davis RA, Attie AD. The physiological and molecular regulation of lipoprotein assembly and secretion. *Mol Biosyst.* 2007;3(9):608-19.
- 6- Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis.* 1988;8(1):1-21.
- 7- Shoulders CC, Jones EL, Naoumova RP. Genetics of familial combined hyperlipidemia and risk of coronary heart disease. *Hum Mol Genet.* 2004;13(1):149-60.
- 8- Santos T. Estudo Molecular de doentes com dislipidemia familiar [Tese de Mestrado]. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; 2008.
- 9- 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.
- 10- Medeiros AM, Alves AC, Francisco V, Bourbon M. Update of the Portuguese Familial Hypercholesterolaemia Study. *Atherosclerosis.* 2010;212(2):553-8.
- 11- Hipertensão arterial: definição e classificação. Norma da Direcção geral da saúde. N°20/DGCG, 2011. Disponível em URL <http://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0202011-de-28092011-atualizada-a-19032013.aspx>, última vez acedido a 15 de Maio de 2014.

- 12- Avaliação do Risco Cardiovascular SCORE (systematic coronary risk evaluation). Norma da Direcção Geral da Saúde. N°5/DGCG, 2013. Disponível em URL <http://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0052013-de-19032013.aspx>, última vez acedido a 15 de Maio de 2014.
- 13- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
- 14- Gao F, Ihn HE, Medina MW, Krauss RM. A common polymorphism in the LDL receptor gene has multiple effects on LDL receptor function. *Hum Mol Genet.* 2013;22(7):1424-31.
- 15- Lee JC, Weissglas-Volkov D, Kyttälä M, Sinsheimer JS, Jokiaho A, de Bruin TW, Lulis AJ, Brennan ML, van Greevenbroek MM, van der Kallen CJ, Hazen SL, Pajukanta P. USF1 contributes to high serum lipid levels in dutch FCHL families and U.S. Whites with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(10):2222-7.
- 16- Kristiansson K, Ilveskoski E, Lehtimäki T, Peltonen L, Perola M, Karhunen PJ. Association analysis of allelic variants of USF1 in Coronary Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(5):983-9.
- 17- Reiner AP, Carlson CS, Jenny NS, Durda JP, Siscovick DS, Nickerson DA, Tracy RP. USF1 gene variants, cardiovascular risk, and mortality in European Americans: analysis of two US cohort studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(12):2736-42.
- 18- Cotton RG, Scriver CR. Proof of "disease causing" mutation. *Hum Mutat.* 1998;12(1):1-3.
- 19- Nomenclature for the description of sequence variants. Human Genome variation society. Disponível em URL <http://www.hgvs.org/mutnomen/recs.html#general>, última vez acedido a 15 de Maio de 2014.
- 20- Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed. McGraw-Hill, Inc.; New York: 2001. pp. 2863-913.
- 21- National cancer institute at the national institutes of health. Disponível em URL <http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/cancergenomics/page19>, última vez acedido em 12 de Maio de 2014.
- 22- Talmud PJ, Shah S, Whittall R, Futema M, Howard P, Cooper JA, Harrison SC, Li K, Drenos F, Karpe F, Neil HA, Descamps OS, Langenberg C, Lench N, Kivimaki M, Whittaker J, Hingorani AD, Kumari M, Humphries SE. Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: a case-control study. *Lancet.* 2013;381(9874):1293-301.
- 23- Rabbani B, Tekin M, Mahdih N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet.* 2014;59(1):5-15.

Anexo 1 - Parecer relativo ao projecto EPHF, Comissão de ética do INSA



Comissão de Ética

Nota Interna N.º 3 /2010

De: Secretariado da Comissão de Ética

Data: 21 Dezembro 2010

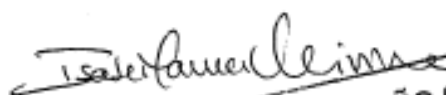
Para: Mafalda Bourbon

Assunto: Pedido de apreciação e parecer – Estudo português de hipercolesterolemia familiar

No seguimento do seu pedido de apreciação e parecer, relativo ao projecto Estudo português de hipercolesterolemia familiar , vimos por este meio informar que o mesmo mereceu parecer positivo da Comissão de Ética deste Instituto em reunião realizada no passado dia 14 de Dezembro de 2010, aproveitando para desejar o maior sucesso no desenvolvimento deste trabalho.

Com os melhores cumprimentos,

O Secretariado da Comissão de Ética


Comissão de Ética
INSA, I.P.

Anexo 2 - Consentimento informado e inquérito caso-index



Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

Adaptado do “Simon Broome Heart Research Trust”

Confidencial

Número do processo:

Número da família:

(A preencher pelo INSA)

Identificação do caso-índice

Nome completo: _____

Morada: _____

Telefone: _____

Data de Nasc.: _____

Estado Civil: _____

Natural de: _____ Naturalidade dos pais : Pai _____ / Mãe _____

Sexo: Masculino Feminino

Origem étnica (assinalar a opção adequada):

Caucasiano Asiático Africano outro

Condições de colheita e envio das amostras

Devem ser feitas as seguintes colheitas em jejum:

CASO-INDEX:

Adultos:

7.5 mL de sangue em tubo de soro com gel separador - após centrifugação (3500rpm/10minutos)

~8 mL (3x2.7mL) de sangue em tubos de EDTA

Crianças:

4 mL de sangue em tubo de soro com gel separador - após centrifugação (3500rpm/10minutos)

~6 mL (2x2.7mL) de sangue em tubos de EDTA

FAMILIARES (adultos e crianças):

4 mL de sangue em tubo de soro com gel separador - após centrifugação (3500rpm/10minutos)

~6 mL (2x2.7mL) de sangue em tubos de EDTA

Estas amostras devem ser enviadas em **correio azul**, em envelope almofadado ou numa caixa, bem envolvidas em algodão, acompanhadas por este formulário.

O tempo máximo entre a colheita das amostras e a sua análise não deverá ultrapassar os **dois dias**, o que implica que a amostra seja enviada logo após a colheita. Esta condição é de extrema importância para este estudo. Para qualquer informação complementar contactar: Doutora Mafalda Bourbon, Tel: 217 508 130 / 217 508 126.



Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge, I.P.
Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa
Portugal

tel. +351 217 519 200
fax. +351 217 526 400
http: www.insa.pt
info@insa.min-saude.pt

Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge



Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar Adaptado do “Simon Broome Heart Research Trust”

Declaração de Consentimento Informado e Esclarecido (Original)

Para que se possa compreender e actuar a nível da prevenção das doenças cardiovasculares é necessário a realização de estudos de investigação nesta área. Alguns dos factores de risco mais importantes para doenças cardiovasculares são a hipertensão arterial, a diabetes, o tabagismo e a hipercolesterolemia (dislipidemia). Algumas dislipidemias têm origem genética, nomeadamente a Hipercolesterolemia Familiar (FH). O objectivo deste estudo é determinar a causa genética da hipercolesterolemia em indivíduos com o diagnóstico clínico de Hipercolesterolemia Familiar, assim como aumentar o conhecimento sobre os mecanismos do desenvolvimento da doença cardiovascular nas pessoas afectadas. A identificação precoce da Hipercolesterolemia Familiar permite obter o diagnóstico correcto da dislipidemia fundamentando a introdução atempada de medidas terapêuticas e aconselhamento de estilos de vida de modo a melhorar o prognóstico do doente. Doentes com Hipercolesterolemia Familiar correctamente identificados e tratados podem ver a sua esperança de vida aumentada em 20/30 anos. No âmbito deste estudo é necessária a colheita de duas amostras de sangue, cerca de 15 ml no total, para a determinação de parâmetros laboratoriais de relevância e extracção de DNA para estudos moleculares. As amostras colhidas serão utilizadas apenas para os trabalhos de investigação acima referidos. Estes estudos são confidenciais e o anonimato dos participantes está assegurado de acordo com as normas éticas dos estudos genéticos: os dados referentes à sua identidade não constarão das bases de dados do estudo. Apenas serão pedidas informações sobre alguns dos seus dados pessoais e elementos da sua história clínica importantes para este estudo. Como participante no estudo pode em qualquer altura ter acesso aos seus dados clínicos e moleculares, podendo exigir ser retirado do mesmo assim que o desejar. Os resultados obtidos serão enviados para o seu médico assistente.

Declaro que fui informado dos objectivos deste estudo e aceito participar nele. Autorizo o tratamento automatizado dos meus dados pessoais.

Localidade: _____ Data: ____/____/____

Nome do Participante:

Assinatura:

_____ (Em caso do caso-índice ser menor de 18 anos, os pais devem assinar para dar o seu consentimento)

Nome do Médico Assistente ou do Investigador:

Assinatura:

Responsável pelo Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar
Doutora Mafalda Bourbon, Tel: 217 508 130 / 217 508 126



Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge, I.P
Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa
P o r t u g a l

tel. +351 217 519 200
fax. +351 217 526 400
http: www.insa.pt
info@insa.min-saude.pt

Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge



Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar Adaptado do “Simon Broome Heart Research Trust”

Declaração de Consentimento Informado e Esclarecido (Duplicado)

(Este duplicado deverá ser entregue ao participante do estudo)

Para que se possa compreender e actuar a nível da prevenção das doenças cardiovasculares é necessário a realização de estudos de investigação nesta área. Alguns dos factores de risco mais importantes para doenças cardiovasculares são a hipertensão arterial, a diabetes, o tabagismo e a hipercolesterolemia (dislipidemia). Algumas dislipidemias têm origem genética, nomeadamente a Hipercolesterolemia Familiar (FH). O objectivo deste estudo é determinar a causa genética da hipercolesterolemia em indivíduos com o diagnóstico clínico de Hipercolesterolemia Familiar, assim como aumentar o conhecimento sobre os mecanismos do desenvolvimento da doença cardiovascular nas pessoas afectadas. A identificação precoce da Hipercolesterolemia Familiar permite obter o diagnóstico correcto da dislipidemia fundamentando a introdução atempada de medidas terapêuticas e aconselhamento de estilos de vida de modo a melhorar o prognóstico do doente. Doentes com Hipercolesterolemia Familiar correctamente identificados e tratados podem ver a sua esperança de vida aumentada em 20/30 anos. No âmbito deste estudo é necessária a colheita de duas amostras de sangue, cerca de 15 ml no total, para a determinação de parâmetros laboratoriais de relevância e extracção de DNA para estudos moleculares. As amostras colhidas serão utilizadas apenas para os trabalhos de investigação acima referidos. Estes estudos são confidenciais e o anonimato dos participantes está assegurado de acordo com as normas éticas dos estudos genéticos: os dados referentes à sua identidade não constarão das bases de dados do estudo. Apenas serão pedidas informações sobre alguns dos seus dados pessoais e elementos da sua história clínica importantes para este estudo. Como participante no estudo pode em qualquer altura ter acesso aos seus dados clínicos e moleculares, podendo exigir ser retirado do mesmo assim que o desejar. Os resultados obtidos serão enviados para o seu médico assistente.

Declaro que fui informado dos objectivos deste estudo e aceito participar nele. Autorizo o tratamento automatizado dos meus dados pessoais.

Localidade: _____ Data: _____/_____/_____

Nome do Participante:

Assinatura:

(Em caso do caso-índice ser menor de 18 anos, os pais devem assinar para dar o seu consentimento)

Nome do Médico Assistente ou do Investigador:

Assinatura:

Responsável pelo Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

Doutora Mafalda Bourbon, Tel: 217 508 130 / 217 508 126



Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge, I.P.
Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa
P o r t u g a l

teff. +351 217 519 200
fax. +351 217 526 400
http: www.insa.pt
info@insa.min-saude.pt

Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge



Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar

Adaptado do “Simon Broome Heart Research Trust”

Confidencial

Número do processo:

Número da família

(A preencher pelo INSA)

Razão primária de inclusão no estudo:

(assinalar a opção adequada)

- Parente afectado
- Parente com doença coronária crónica
- Caso-index tem doença coronária crónica
- caso-index sofre de outras doenças vasculares
- Sinais físicos
- Screening
- Outros

Critérios para admissão no estudo (segundo os critérios abaixo mencionados):

- Hipercolesterolemia familiar confirmada
- Hipercolesterolemia familiar possível

Critérios para diagnóstico:

Hipercolesterolemia familiar confirmada é definida como:

- (a) **crianças menores de 10 anos:** Colesterol total acima de 200 mg/dL (5,18 mmol/L) ou LDL colesterol acima de 120 mg/dL (3.10 mmol/L);
crianças menores de 16 anos: Colesterol total acima de 260 mg/dL (6,7 mmol/L) ou LDL colesterol acima de 155 mg/dL (4.0 mmol/L)
Adultos: Colesterol total acima de 290 mg/dL (7,5 mmol/L) ou LDL colesterol acima de 190 mg/dL (4.9 mmol/L).

e

- (b) Xantomas nos tendões no caso-index ou parente (pais, filhos avós, irmãos, tios)

ou

- (c) Evidência genética de mutação no receptor de LDL ou APOB

Hipercolesterolemia familiar possível é definida como:

(a)

e

- (b) História familiar de enfarte do miocárdio antes dos 50 anos em avós e tios ou antes dos 60 anos nos pais, irmãos e filhos

ou

- (c) História familiar de nível elevado de colesterol nos pais, irmãos ou filhos; ou colesterol total acima de 290 mg/dL (7,5 mmol/L) nos avós e/ou tios.



Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge, I.P.
Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa
Portugal

telef. +351 217 519 200
fax. +351 217 526 400
http: www.insa.pt
info@insa.min-saude.pt

Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge



Identificação do Médico Assistente:

Nome: _____

Telefone: _____ email: _____

Hospital: _____

Serviço: _____

Morada: _____

História médica do caso-index

Valores antes do tratamento

Colesterol mg/dl	LDL mg/dl	HDL mg/dl	TG mg/dl	ApoB mg/dl	ApoAI mg/dl	Lp(a) mg/dl

Xantomas nos tendões:

(assinale se o caso index alguma vez apresentou xantomas)

	Presente	Ausente		Presente	Ausente
Dorso da mãos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Pretibiais	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cotovelos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Dorso dos pés	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
			Tendão de Achilles	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Olhos

	Presente	Ausente
<i>Lipaemia retinalis</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Arco corneano	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Xantelasma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>



Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge, I.P.
Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa
Portugal

teff. +351 217 519 200
fax: +351 217 526 400
http: www.insa.pt
info@insa.min-saude.pt



Assinalar se o caso-index tem ou teve algumas das seguintes situações:

	Confirmado	Possível	
Angina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Idade de início (anos): _____
Enfarte do miocárdio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Idade do 1º enfarte: _____
CABG	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Se sim, quando? _____
Angioplastia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Se sim, quando? _____
Outras doenças vasculares	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Se sim, quando? _____
Hipertensão	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
A.V.C.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Idade do 1º A.V.C.: _____
A.I.T.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Claudicação	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Pancreatite	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doença da tiroide	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doença renal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Diabetes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Idade de início (anos): _____
Tratamento da Diabetes:	Insulina	<input type="checkbox"/>	
	Oral	<input type="checkbox"/>	
	Insulina e oral	<input type="checkbox"/>	
	Dieta	<input type="checkbox"/>	

Informação médica da consulta mais recente

Data: _____ Terapêutica: Sim Não

Colesterol (mg/dl)	LDL (mg/dl)	HDL (mg/dl)	TG (mg/dl)	ApoB (mg/dl)	ApoAI (mg/dl)	Lp(a) (mg/dl)

Altura: _____
Peso: _____ IMC: _____

Pressão arterial: Sístole _____ Diástole _____

Álcool: Número de unidades por semana: _____
(1 unidade = 1 cerveja ou um copo de vinho)

Fumador? Sim Quantos cigarros por dia? _____
Não Se é um ex-fumador há quantos anos deixou de fumar? _____

Faz exercício? Sim Que tipo de exercício? _____ Quantas vezes por semana? _____
Não



Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge, I.P.
Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa
Portugal

teff. +351 217 519 200
fax. +351 217 526 400
http: www.insa.pt
info@insa.min-saude.pt



História familiar do caso-índice (preenchimento obrigatório)

Parentesco	Colesterol elevado	Presença de xantomias	Triglicerídeos elevado	Idade do 1º enfarte do miocárdio	Vivo (V) Morto (M) Desc.(?)	Idade presente ou na morte	Causa de morte
Pai Nome:	mg/dl		mg/dl				
Mãe Nome:	mg/dl		mg/dl				
Irmão M/F Nome:	mg/dl		mg/dl				
Irmão M/F Nome:	mg/dl		mg/dl				
Irmão M/F Nome:	mg/dl		mg/dl				
Filho M/F Nome:	mg/dl		mg/dl				
Filho M/F Nome:	mg/dl		mg/dl				
Filho M/F Nome:	mg/dl		mg/dl				
Cônjuge Nome:	mg/dl		mg/dl				

Preencher com SIM e NÃO quando os valores não são conhecidos

NOTA: Preencher também o Anexo A caso envie amostras de familiares

Árvore genealógica



Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge, I.P.
Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa
Portugal

telef. +351 217 519 200
fax. +351 217 526 400
http: www.insa.pt
info@insa.min-saude.pt

Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge



Tratamento:

Dieta Estanois e Fitoesteróis

LDL Aferese Medicamentos

Terapia actual para baixar os lípidos

Estatinas Qual? _____ Dosagem _____
Data do início do tratamento _____

Resinas Qual? _____ Dosagem _____
Data do início do tratamento _____

Fibratos Qual? _____ Dosagem _____
Data do início do tratamento _____

Ácido nicotínico
ou derivado Qual? _____ Dosagem _____
Data do início do tratamento _____

Inibidor da absorção
intestinal do colesterol Qual? _____ Dosagem _____
Data do início do tratamento _____

Outro Qual? _____ Dosagem _____
Data do início do tratamento _____

Outras observações:

A preencher pelo INSA

Data: ___/___/___

Col.Total mg/dl	LDL mg/dl	HDL mg/dl	TG mg/dl	Lp (a) mg/dl	sdLDL mg/dl	Apo B mg/dl
Apo AI mg/dl	Apo AII mg/dl	Apo AIV mg/dl	ApoAV mg/dl	Apo CII mg/dl	Apo CIII mg/dl	Apo E mg/dl

Anexo 3 - Protocolo de extracção de DNA a partir de sangue fresco (método de “salting out”)

Adaptado de Miller, SA. 1988 Nucl Acids Res¹³.

Material:	Equipamento:	Reagentes
Tubos de falcon Pipetas de pasteurs Eppendorfs Gelo	Centrifuga refrigerada Pipetador automático Micropipetas Vórtex Banho térmico (55°C) Agitador	Tampão RBC lysis (gelado) RBC: 155mM NH ₄ Cl; 20mM KHCO ₃ ; 0,1mM Na ₂ EDTA; pH 7,4 Tampão SE (75mM NaCl; 25mM Na ₂ EDTA; pH8) Proteinase K SDS 10% NaCl saturado (6M) Etanol 100% e 70% Tampã

Protocolo:

- 1- Lise de eritrócitos
 - a. Transferir 10 mL sangue (colhido com EDTA) para um tubo de falcon de 50 mL identificado
 - b. Lavar os tubos de colheita com 10mL de tampão de lise RBC gelado
 - c. Deitar 20 ml De tampão de lise de RBC gelado no tubo de falcon
 - d. Agitar no vórtex e incubar no gelo durante 15 minutos realizando inversões frequentes
 - e. Centrifugar a 2500 rpm durante 10 minutos, a 4°C
 - f. Decantar e rejeitar o sobrenadante sem perder o pellet de células
 - g. Enquanto o pellet estiver vermelho repetir os passos c a f
- 2- Lise de leucócitos
 - a. Agitar o pellet no vórtex até que esteja completamente ressuscitado
 - b. Adicionar 5 mL de tampão SE + 12,5µL proteinase K + 500 µL SDS 10%
 - c. Incubar overnight (mínimo 6 horas) a 55°C
- 3- Precipitação de proteínas
 - a. Adicionar 3 mL de NaCl saturado (6M)
 - b. Incubar a 55°C durante 10 minutos
 - c. Agitar no vórtex durante 25 segundos
 - d. Centrifugar a 4000 rpm, durante 30 minutos, a 15°C

4- Precipitação do DNA

- a. Decantar o sobrenadante (evitando espuma) para um novo tubo de falcon de 50mL identificado
- b. Adicional etanol 100% frio em cerca de 2X o volume do sobrenadante
- c. Inverter gentilmente o tubo de falcon cerca de 50X, observando a formação do novelo de DNA
- d. Centrifugar a 4500 rpm, durante 5 minutos a 4°C
- e. Decantar e rejeitar o sobrenadante, observando sempre o pellet de DNA no fundo do tubo
- f. Colocar o falcon virado para baixo sobre o papel absorvente
- g. Adicional 10 mL etanol a 70% frio, inverter algumas vezes
- h. Centrifugar a 4500 rpm. Durante 5 minutos, a 4°C
- i. Descartar o sobrenadante e transferir o pellet de DNA para um tubo de microcentrífuga de 1,5mL
- j. Deixar secar cerca de 30 minutos
- k. Adicionar 1mL de tampão TE
- l. Deixar em agitação lenta e permanente durante a noite à temperatura ambiente
- m. Quantificar no nanodrop ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
- n. Retirar 200 μL de DNA para um tubo de 500 μL devidamente identificado e armazenar.

Anexo 4 - Protocolo de análise dos genes *LDLR* e *APOB*

1. Reacção de PCR

LDLR(Exões:Promotor,1,2,4,5,6,7,8,9,10,11, 12,13,14,15,16,17,18) Apo B (exão 26 e exão 29)		LDLR Exão 3	
Reagentes	Volumes	Reagentes	Volumes
dNTP's Mix 100mM	4µL	dNTP's Mix 100mM	4µL
Buffer 10x Bioline	2,5µL	Buffer 10x Platinum	2,5µL
Mg 2+ Bioline	0,75µL	Mg 2+ Platinum	0,75µL
Primer Foward (10µmol)	1µL	Primer Foward (10µmol /µL)	1µL
Primer Reverse (10µmol)	1µL	Primer Reverse (10µmol /µL)	1µL
Taq Bioline	0,125µL	TaqPlatinum	0,08µL
Água estéril	14,625µL	Água estéril	15,67µL
Volume total	24µL	Volume total	24µL

Programa

Temperatura (°C)	Duração	Nº de ciclos
95	3'	
94	45"	
[57-63)	30"	X35
72	1'	
72	30'	

2. Purificação dos produtos para sequenciação

Reagentes	Volumes
Produto de PCR	2,5µL
ExoSAP	1µL

Programa

Temperatura (°C)	Duração
37	15'
80	15'
4	∞

3. Primers de PCR e sequenciação

Exão	Sequencias 5'3'	Região Amplificada (pb)	Temperatura De ligação (Blometra) °C	Primers PCR	Primer SEQ
Promotor e Exão 1	F: ACAAATCAAGTCGCCTGCCCA R: GCCATTACCCACAAAGTCTCC	480	59	SPR+1F SPR+1R	MB257
2	F:TCCCATACCCAGAGAGTCCATA R:CAGCCGCCATCATCAAAAAG	587	58	R2F R2R	R2F
3	F:GGTTTCACTATATTGGCCAGG R:CTCCCCAGGACTCAGATAGG	327	59	LDL 3R1 MB260	LDL 3F1
4	F:GTACAGATGAGGAACTGAG R:TTGGCATGTTGTTGGAAATCC	677	57	EX4F EX4R	R4F
5	F:GCAAAGGCCCTGCTTCTTT R:GAGGCTCTGAGAAGTCAAGT	342	58	EX5FNEW EX5RNEW	EX5FNEW
6	F:ATTACAGGCACAAACCACGCTG R:GCAGAGTGGAGTTCACAAAACC	370	59	EX6F EX6R	EX6F
7	F:GCGAAGGGATGGGTAGGG R:GCATGAGGGGTTTGGTTG	248	58	MB316 MB317	MB316
8	F:ATCTCCTGAGAGGCTGGGCTGTCT R:CCTGGTCAGGGGATATGAGTCTGT	361	59	MB30 MB31	MB30
9	F:AAGGGGATGGGGAGGCACTCTTG R:CCTCATCTCACCTGCGGGCCA	397	59	EX9+10F MB277	EX9+10F
10	F:CCTTGGCCCGCAGGTGAGA R:GTGCTGGGATTACAGGTGCTTTGA	403	62	MB34 MB35	MB34
11	F:GCCACATTTGGAGTTTGGGGTTC R:AGCAGCTTGGGCTTGTCACAGA	355	60	EX11F EX11R	EX11R
12	F:GGTGCTTTTCTGCTAGGTCC R:TTTTCTGCGGTCATCTTGGCT	347	59	EX12F EX12R	EX12F
13	F:CTAGTTGTGGAGAGAGGGTGGC R:GCGGAGTCAGGGCAGGAACGAG	275	60	EX13F EX13R	EX13F
14	F:GAAACCTCCTTGTGGAACTCT R:GAAAAGTATGGTTATCCCGACT	388	58	EX14F EX14R	EX14F
15	F:CCAAGGTCATTTGAGACTTTCTG R:GAGAGAAGGTCAGCAAGGGAGTG	388	60	EX15F EX15R	EX15F
16	F:GTCCTCTGCCTGCTCCATTCTT R:ATCCTCCATCTGACCCCTTAGC	350	60	EX16F EX16R	EX16F
17	F:GAGCTGGGTCTCTGGTCTCG R:GCGCACAGAAGCATTCACTC	500	60	R17F R17R	R17F
18	F:GAGCGGTGGGAAGTGAAT R:TGGTGCCATCTGCTGTTGTGTG	580	59	EX18F EX18R	EX18F
ApoB 26	F:GGAGCAGTTGACCACAAGCTTAGCTTGAA R:GGGTGGCTTTGCTTGTATGTTCTCCGT	343	59	P61 P62	P61
ApoB 29	F:CCAAGATGAGATCAACACAATC R:AACCTGACTTGAGAGTTGGG	334	59	MB63 MB64	MB63

Anexo 5 - Protocolo de análise do gene *PCSK9*

1. Reacção de PCR

	PCSK9										
	P+ 1	2	3	4+5	6	7	8	9	10	11	12
Mg 2+	0,75	1,5	1,5	0,75	0,5	1,5	1,5	0,75	1,5	0,75	0,75
DMSO	0,24	0,24	1,4	X	X	X	X	X	X	X	X
H2O	14,385	13,635	12,475	14,625	14,875	13,875	13,875	14,625	13,875	14,39	14,625
dNTP's	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Buffer 10x	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
primer F	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Primer R	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Taq	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
DNA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Programa											
5'	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95
45''	94	94	94	94	94	94	94	94	94	94	94
30''	63	54,5	55	60	57	65	64	63	63	62	58
1'	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72
7'	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72
inf	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

2. Purificação dos produtos para sequenciação

Reagentes	Volumes
Produto de PCR	2,5µL
ExoSAP	1µL

Programa

Temperatura (°C)	Duração
37	15'
80	15'
4	∞

1. Primers e temperaturas de annealing utilizados para amplificação dos exões do gene de *PCSK9*.

Exão	Sequencias 5 - '3'	Região Amplificada (pb)	Temperatura De ligação (Blometra) °C	Primers PCR	Primer SEQ
Promotor e Exão 1	F: GGAGGGCGAGGCCGAAACCTGAT R: CTCGGCGACCTGCACTCCACTTCC	760	63	MB1 MB3	MB1
2	F:GCTGGGTTTCTTCCATGTATCAT R:CCGATAAGTGCTCAATACATACTTGCT	340	54,5	MB261 MB262	MB261
3	F:CTCTATGCCAGACCGTGTTG R:GTGCTGAGTCCCAAGCC	400	55	890 891	890
4 + 5	F: AGGTTGACTTTATGCTCATTCCCT R:TAGGAGACATTAGCTCTCCCTGG	740	60	MB263 MB264	MB263
6	F:TGCAGCAGCATTTCAC R:TCCAAAGCCAGAAGGGTTC	400	57	892 893	892
7	F:GGCCTGAGTCTGCCTCTGC R:ACCCTGACTGCCAAAGGGGC	330	65	MB98 MN99	MB98
8	F:CACTGGCAGGAGTCCCCTGC R:AGGTCACACAGACCTCCCAAGC	320	64	MB100 MB101	MB101
9	F:GTAAGGAGGATGATGCCACC R:TTACAGAAGAGCTGGAGTCTGG	450	63	MB199 MB200	MB199
10	F:AGCTCCTTGTCCTCCAGAAG R:GAGTATGGAAGTCAAGTCAGG	400	57	896 897	896
11	F:GGCTCAGAGAGGTTGAATGG R:GCATCTACCTGGCAAACCG	340	62	MB6 MB7	MB6
12	F:GTGGGAGATACCGTTGTGTCC R:TGGGGAGGAGGCACCCAGAGT	400	58	874 875	874

Anexo 6 - Protocolo de análise do gene *APOE*

1. Reacção de PCR

Master Mix 1	
Reagente	Volume
Mix dNTP's 100mM	2 µL
Primer PA1 (20µmol/µL)	2 µL
Primer PA2 (20µmol/µL)	2 µL
S3(resolution solution,5M)	2,5 µL
S5 (PCR Grade Water)	8,5 µL
Volume total	17 µL

Master Mix 2	
Reagente	Volume
S2 (Buffer, 5x conc.)	5 µL
S1 Enzyme mix 2U/µL	0,5 µL
S5 (PCR grade water)	2 µL
Volume total	7,5 µL

Temperatura (°C)	Duração	Nº de ciclos
95	5'	
95	30"	
58	40"	X38
72	45"	
72	5'	
8	∞	

2. Purificação dos produtos de PCR

Reagentes	Volumes
Produto de PCR	2,5µL
ExoSAP	1µL

Programa

Temperatura (°C)	Duração
37	15'
80	15'
4	∞

3. Sequênciação de Apo E

Utilização do primer: MB183

2. Purificação dos produtos de PCR

Reagentes	Volumes
Produto de PCR	2,5µL
ExoSAP	1µL

programa

Temperatura (°C)	Duração
37	15'
80	15'
4	∞


3. Primers de PCR e sequenciação

Exões LPL	Sequencias 5 - '3'	Região Amplificada (pb)	Temperatura De ligação (Blometra) °C	Primers PCR	Primer SEQ
1	F: GCCAATATGGTGATGAGGTTT R: CTTCTTCTCATCCTCAGTTTCG	422	56	MB102 MB103	MB102
2	F: GTGGGTTGCCTGTGAACCTA R: GCAGGCCAGTCAGGATAC	311	58	MB104 MB105	MB104
3	F: CAATGGGTTTCCAATCAAGT R: TTCTGGCTCCAGTCAAAAAC	353	54	MB106 MB107	MB106
4	F: GGCAGAACTGTAAGCACCT R: TCAGAATGACAGTCTTTTCACC	209	57	MB108 MB109	MB108
5	F: AGTGCAATCAAATGATGAGC R: TGGCCAAATGTGTATATGAAA	433	57	MB110 MB111	MB110
6	F: CCTATTTAGACATGCCAATG R: TGTCCAATGGACAGAATC	414	54	MB112 MB113	MB112
7	F: TGAATTGCCTGACTATTTGG R: CTGCTCAGACCAAGGGTTAT	265	57	MB114 MB115	MB114
8	F: TTGTTGGACATTTTTGTGC R: TGGGGTCTAAAGTGAAGG	360	59	MB116 MB117	MB116
9	F: TCCTGACAGAACTGTACCTTTG R: ATGAAGCTGCCTCCCTTAG	248	57	MB118 MB119	MB118
10	F: ACAGGCGGGAATTGTAAAAC R: AACGTTGGAGGATGTGCTAT	300	58	MB120 MB121	MB120
Promotor	F: AACAGGATTCGTCAAAGA R: CTAGAAGTGGGCAGCTTTC	435	55	MB134 MB135	MB134


Exões Apo A-IV	Sequencias 5 - '3'	Região Amplificada (pb)	Temperatura De ligação (Blometra) °C	Primers PCR	Primer SEQ
1	F: GAGTCACACTGAGGAAGGAG R: CATCCTGCACTACTCAGAGC	313	56	MB136 MB137	MB136
2	F: CTAAGCTCAGACAGGGAAAA R: TTTAAGAATTCCCCGTCAC	298	58	MB138 MB139	MB138
3'	F: GAACTCGGTACCTCTGAGC R: ACTCTCTCCATGCACTGT	451	56	MB140 MB141	MB140
3''	F: GACAACCTGCGAGAGCTT R: AGCTCTGCCAGTGAATTCT	500	56	MB142 MB143	MB142
3'''	F: CTTCCAGATGAAGAAGAACG R: CAGAACTTCTTTGGGACAGA	551	55	MB144 MB145	MB144

Exões Apo A-V	Sequencias 5 - '3'	Região Amplificada (pb)	Temperatura De ligação (Blometra) °C	Primers PCR	Primer SEQ
1+2	F: AGGGGTAACAGGATTTTCG R: CAGCTGTCTCCTCCCTTC	447	55	MB146 MB147	MB146
3	F: AAGGAGATGATGGAGGCTA R: GGCGTATGGGTGGAAGAG	475	57	MB148 MB149	MB148
3'	F: GAGTTGGAGGAGGTGAAGG R: AGACAAGGAGCTGGGAATG	845	60	MB235 MB236	MB235
Promotor	F: ACTGTAGACGGAGTGGTGT R: AGGGTTAAAGACCAACCACA	241	57	MB185 MB186	MB185
Exões Apo C-II	Sequencias 5 - '3'	Região Amplificada (pb)	Temperatura De ligação (Blometra) °C	Primers PCR	Primer SEQ
2	F: CACAGAGCAGGATCTCAGTC R: AAGATGCTTGGAGCTCATT	227	55	MB154 MB155	MB154
3	F: TCTTCTTCTTCTCCTTTTC R: GATCGAGTCGGTGGTATG	280	56	MB156 MB157	MB156
4	F: CCTCCTCCCTCTAACCATCT R: GAGGAGGATGCAAGAGCTAC	229	58	MB237 MB238	MB237
Exões Apo C-III	Sequencias 5 - '3'	Região Amplificada (pb)	Temperatura De ligação (Blometra) °C	Primers PCR	Primer SEQ
2	F: CCTTCTGAGAGCCCGTATTA R: CTGCTTGACCACCCATTG	297	57	MB160 MB161	MB160
3	F: CAATGGGTGGTCAAGCAG R: ATTCCATTGTTGGGATCTCA	288	57	MB162 MB163	MB162
4	F: TGTCCGTCCAGTGAAGTTGAG R: CTGACCTGGAGTCTGTCCA	532	55	MB187 MB188	MB187
Exões USF1	Sequencias 5 - '3'	Região Amplificada (pb)	Temperatura De ligação (Blometra) °C	Primers PCR	Primer SEQ
Intrão 7	F: ACCCCTGGCTAATTTTTGTA R: GTTTCTCATCCCGAGTCGT	290	58	MB239 MB240	MB239
Exão 11	F: ACAGGGGGAAGTTCAGAAG R: AGCCCCAGAGTTTAGTGTGT	200	57	MB168 MB169	MB168

Anexo 8 - Diploma de apresentação do EPHF na Unidade Local de Saúde da Guarda



Unidade Local de Saúde da Guarda,
EPE
Unidade de Saúde Familiar
A ribeirinha



Para os devidos efeitos se declara que
Sílvia Cristina Coelho do Amaral,
realizou, na Unidade de Saúde Familiar "A Ribeirinha" –
Guarda, uma apresentação subordinada ao tema
"Hipertensão arterial Familiar"

A Coordenadora da USF
[Signature]
(Dra. Isabel Coelho)

Ministério da Saúde
Unidade Local de Saúde - Guarda/EPE
USF "A RIBEIRINHA"

Guarda, 4 de Outubro de 2013

USF | Silveiros
Impressão Administrativa nº22