



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

HELOISA PAMPLONA CUNHA

**RASTREAMENTO EM CASCATA DA
HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR: OTIMIZAÇÃO DE UM
MÉTODO DE GENOTIPAGEM E ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO
DOS PACIENTES**

**Florianópolis/SC
2018**

Heloisa Pamplona Cunha

**RASTREAMENTO EM CASCATA DA
HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR: OTIMIZAÇÃO DE UM
MÉTODO DE GENOTIPAGEM E ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO
DOS PACIENTES**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmácia na Área de concentração Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Thaís C. Marques Sincero

**Florianópolis/SC
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cunha, Heloisa Pamplona

Rastreamento em cascata da hipercolesterolemia familiar: otimização de um método de genotipagem e estratificação de risco dos pacientes / Heloisa Pamplona Cunha ; orientador, Edson Luiz da Silva, coorientador, Thais Cristine Marques Sincero, 2018. 240 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Hipercolesterolemia Familiar. 3. Rastreamento em cascata. 4. Genotipagem. I. Silva, Edson Luiz da. II. Sincero, Thais Cristine Marques. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

“Rastreamento em cascata da hipercolesterolemia familiar: otimização de um método de genotipagem e estratificação de risco dos pacientes”

POR

Heloisa Pamplona Cunha

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



Prof(a). Dr(a). Maria Luiza Bazzo (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Fabíola Branco Filippin Monteiro (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Tales de Carvalho (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Edson Luiz da Silva (UFSC – Orientador)


Prof(a). Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 13 de julho de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, especialmente meus pais, Neri e Arlete e à Tata, pelo exemplo, apoio e incentivo para perseguir meus sonhos. Pelas orações e pensamentos positivos.

À minha avó Áurea, *in memoriam*, pelo amor e exemplo de determinação e otimismo, que nos deixou pouco antes de ver a neta doutora.

Aos meus avós Erica, Ângelo e José, à Tia Laura e à Dinda Dulce, *in memoriam*, que onde quer que estejam, sei que guiam meus caminhos.

Ao Alexandre, o melhor companheiro, por entender minha rotina, aceitar minha ausência, me apoiar e confiar no meu amor.

Ao professor Edson Luiz da Silva, meu orientador, pela presença constante e inúmeros ensinamentos. Pela paciência, dedicação e por acreditar em mim!

À professora Thaís Cristine Marques Sincero, minha coorientadora. Pelos ensinamentos e por acreditar neste projeto.

À professora Isabela de Carlos Back Giuliano, médica cardiologista, por viabilizar os contatos com as secretarias de Saúde e com os pacientes, auxiliar nas coletas de dados e apoio logístico com a equipe multidisciplinar que participou das coletas de dados.

Aos enfermeiros, psicólogos, nutricionistas e educadores físicos que fizeram parte da equipe multidisciplinar e auxiliaram na coleta de dados dos pacientes.

A todos os pacientes que, voluntariamente, concordaram em participar do estudo.

A equipe do Laboratório em Amsterdam, onde realizei o estágio sanduíche, especialmente ao professor Joep Defesche e aos técnicos Janine, Hester, Ellen, Laura, Eliana, Lisette, Anika, Linda, Richard, Dion, Niek, Marluce, Sander, Jessica, Laurence, por me receberem e dividir comigo seus conhecimentos em laboratório.

Às amigas, Bruna, Kerol, Fabíola, Dei, Giu e Paola, pelo apoio, compreensão e torcida.

Aos colegas do laboratório de pesquisa, especialmente as alunas de Iniciação Científica Marina, Elizandra e Marcela, pela amizade, e colaboração durante as análises.

Às colegas de pós-graduação Caetana Paes Zamparette e Daniela Tartari, por me ensinarem as técnicas de Biologia Molecular.

À Camille Mertins Ribeiro e Vanessa Silva da Silva, técnicas do Laboratório Multiusuário para estudos em Biologia (LAMEB), pela ajuda na etapa de sequenciamento do DNA.

Ao Sandro Wopereis, Farmacêutico do Hospital Universitário, pela ajuda nas análises de PCR-as, Apo B e Lp(a).

Às prefeituras dos municípios de Papanduva-SC e Bom Despacho-MG, e suas respectivas Secretarias de Saúde, por apoiarem e permitirem a realização do estudo.

Aos professores Tales de Carvalho, Fabiola Branco Filippin Monteiro e Maria Luiza Bazzo, membros da banca avaliadora, por aceitarem o convite e contribuírem para o melhoramento do trabalho.

A todos que, perto ou longe, torcem por mim e me apoiam nesta jornada!

Heloisa Pamplona Cunha

Mesmo quando tudo parece desabar,
cabe a mim decidir entre rir ou chorar,
ir ou ficar, desistir ou lutar, porque
descobri, no caminho incerto da vida,
que o mais importante é o decidir.

Cora Coralina

RESUMO

A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença genética com defeitos nos genes *LDLR*, *APOB* ou *PCSK9* e seus portadores apresentam concentrações de colesterol total (CT) e LDL-c acentadamente elevadas. O grau de suspeição dos portadores é baixo e a mortalidade precoce é elevada quando não tratada. A forma mais eficiente de triagem é o rastreamento dos parentes de pacientes já diagnosticados (caso-índice) e, apesar de o diagnóstico genético ser padrão de referência, há falta de métodos acessíveis na rotina clínica. Assim, este estudo teve como objetivo diagnosticar pacientes com HF no Brasil a partir da otimização de um método para a identificação de mutações no *LDLR*. A identificação dos casos índices foi feita de acordo com a Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar. A partir das mutações encontradas, foi feita a triagem nos parentes dos casos índices. Além disto, foi realizada a avaliação dos marcadores de risco para doenças cardiovasculares. O método permitiu a obtenção de sequências com qualidade adequada para a identificação de mutações. Inicialmente, 210 indivíduos participaram do estudo, porém, 87 foram excluídos e, assim, 123 indivíduos (5 a 89 anos) participaram do rastreamento, sendo 35 provenientes de Papanduva-SC e 88 de Bom Despacho-MG. O diagnóstico de HF foi confirmado em 53 indivíduos e 14 mutações foram encontradas (oito patogênicas: 632A>T; 661G>A; 666C>A; 670G>A; 682G>A; 862G>A; 901G>A; 919G>A e seis polimorfismos não associados à HF: 928A>T; 1413A>G; 1773C>T; 1959T>C; 2177C>T; 2232A>G). Apenas a mutação 682G>A já fora descrita no Brasil, enquanto as mutações 901G>A e 928A>T foram descritas pela primeira vez no mundo. Dentre os 53 indivíduos com HF e que estão em “alto risco” cardiovascular, 42 foram reclassificados como em “muito alto risco”. Os indivíduos com HF apresentaram CT, LDL-c e não-HDL-c maiores que aqueles sem HF ($p < 0,0001$). Tratamentos hipolipemiantes eram realizados em 50% dos portadores e em 5,7% dos indivíduos sem HF ($p = 0,0001$). O rastreamento genético em cascata se mostrou efetivo para ampliar o número de diagnósticos e permitiu iniciar tratamento e acompanhamento adequados aos pacientes. Ainda há necessidade de triar geneticamente outras famílias brasileiras visando à ampliação dos diagnósticos. Assim, o presente estudo ajudou a obter mais informações sobre as bases moleculares da HF no Brasil e a expandir o espectro de mutações no *LDLR*.

Palavras-chave: Hipercolesterolemia familiar; genotipagem; rastreamento em cascata.

ABSTRACT

Familial hypercholesterolemia (FH) is a genetic disease with defects in the *LDLR*, *APOB* or *PCSK9* gene, and the carriers have total cholesterol (TC) and LDL-c levels markedly increased. The suspicion of these carriers is low and early mortality is high when untreated. The most efficient way of screening is tracing the relatives of patient already diagnosed (index case). Genetic diagnosis is the reference standard, however, there is a lack of accessible methods in the clinical routine. Thus, this study aimed to diagnose patients with FH in Brazil using an optimized method for the identification of the *LDLR* mutations. The identification of index cases was performed according to the I Brazilian Guideline for Familial Hypercholesterolemia. Based on the mutations found, the relatives of the index cases were screened. Furthermore, we performed the assessment of risk markers for cardiovascular diseases. The method developed showed favorable sensitivity and specificity for the identification of mutations. Initially, 210 subjects participated in the study; however, 87 were excluded, thus, 123 subjects (5 to 89 years old) participated in the screening, 35 from Papanduva-SC and 88 from Bom Despacho-MG. The diagnosis of FH was confirmed in 53 individuals and 14 mutations were found (eight pathogenic: 632A>T; 661G>A; 666C>A; 670G>A; 682G>A; 862G>A; 919G>A and six polymorphisms: 928A>T; 1413A>G; 1773C>T; 1959T>C; 2177C>T; 2232A>G). Only the mutation 682G>A had been described previously in Brazil and the mutations 901G>A and 928A>T were first described worldwide. Of the 53 individuals with FH and classified as "high risk" cardiovascular, 42 were reclassified as "very high risk". Individuals with FH had higher TC, LDL-c, and non-HDL-c levels than those without the diagnosis of FH ($p < 0.0001$). Lipid-lowering treatment was performed by 50% of subjects with FH and 5.7% of subjects without FH ($p = 0.0001$). The genetic cascade screening was effective in increasing the number of diagnosed cases. Based on the definitive diagnosis of FH, it was possible to provide adequate lipid-lowering treatment and follow-up. There is a need to genetically screen other Brazilian families in order to continue the expansion of the diagnoses. Therefore, the present study helped to obtain more information on the molecular bases of FH in Brazil and to expand the spectrum of mutations in *LDLR*.

Keywords: Familial hypercholesterolemia; genotyping; cascade screening.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Principais genes envolvidos na Hipercolesterolemia Familiar	30
Figura 2 Captação da partícula de LDL e reciclagem do LDL-R.	31
Figura 3 Ligação específica da LDL com o LDL-R através da Apo B-100.....	32
Figura 4 Degradação do LDL-R através da ação da PCSK9.....	33
Figura 5 Sinais clínicos de Hipercolesterolemia Familiar.....	35
Figura 6 Estimativa percentual de casos diagnosticados de HF por país.	37
Figura 7 Eletroforese em gel de agarose 1,5% representativa da amplificação dos exons do gene <i>LDLR</i> para cada par de iniciadores desenhado.....	66
Figura 8 Recrutamento dos voluntários.	67
Figura 9 Heredograma da família de Papanduva-SC.	69
Figura 10 Fragmento da mutação encontrada na posição 666 do exon 4 do gene <i>LDLR</i>	78
Figura 11 Fragmento da mutação encontrada na posição 1413 do exon 10 do gene <i>LDLR</i>	79
Figura 12 Fragmento da mutação encontrada na posição 1773 do exon 12 do gene <i>LDLR</i>	79
Figura 13 Fragmento da mutação encontrada na posição 862 do exon 6 do gene <i>LDLR</i>	80
Figura 14 Fragmento da mutação encontrada na posição 928 do exon 6 do gene <i>LDLR</i>	80
Figura 15 Fragmento da mutação encontrada na posição 919 do exon 6 do gene <i>LDLR</i>	81

Figura 16 Fragmento da mutação encontrada na posição 901 do exon 6 do gene <i>LDLR</i>	81
Figura 17 Fragmento da mutação encontrada na posição 632 do exon 4 do gene <i>LDLR</i>	83
Figura 18 Fragmento da mutação encontrada na posição 2332 do exon 15 do gene <i>LDLR</i>	83
Figura 19 Heredograma da família A de Bom Despacho-MG.....	113
Figura 20 Heredograma da família B de Bom Despacho-MG.....	113
Figura 21 Heredograma da família 2A de Bom Despacho-MG.....	114
Figura 22 Fragmento da mutação encontrada na posição 670 do exon 4 do gene <i>LDLR</i>	115
Figura 23 Fragmento da mutação encontrada na posição 862 do exon 6 do gene <i>LDLR</i>	116
Figura 24 Fragmento da mutação encontrada na posição 919 do exon 6 do gene <i>LDLR</i>	116
Figura 25 Fragmento da mutação encontrada na posição 2232 do exon 15 do gene <i>LDLR</i>	116
Figura 26 Fragmento da mutação encontrada na posição 661G>A, 670G>A e 682G>A do exon 4 do gene <i>LDLR</i>	118
Figura 27 Heredograma da família 2B Bom Despacho-MG	120
Figura 28 Fragmento da mutação encontrada na posição 2177C>T do exon 15 do gene <i>LDLR</i>	121
Figura 29 Heredograma da família 2C de Bom Despacho-MG.....	123
Figura 30 Heredograma da família 2D de Bom Despacho-MG.....	126
Figura 31 Representação esquemática da localização das mutações encontradas em cada exon do <i>LDLR</i> de pacientes de Papanduva-SC e Bom Despacho-MG.	152

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características do perfil lipídico sérico e depósito de colesterol para o diagnóstico de HF na família de Papanduva-SC.	73
Tabela 2 Características bioquímicas séricas dos membros avaliados da família de Papanduva-SC.	86
Tabela 3 Características clínicas dos indivíduos estudados da família de Papanduva-SC.	90
Tabela 4 Características do perfil lipídico sérico e depósito de colesterol para o diagnóstico de HF na família de Bom Despacho-MG.....	101
Tabela 5 Características bioquímicas séricas dos membros da família de Bom Despacho-MG.....	134
Tabela 6 Características clínicas dos indivíduos estudados da família de Bom Despacho-MG.....	142
Tabela 7 Características bioquímicas dos membros estudados das famílias de Papanduva-SC e de Bom Despacho-MG de acordo com a presença ou não de HF.	154
Tabela 8 Características clínicas dos membros estudados das famílias de Papanduva-SC e de Bom Despacho-MG de acordo com a presença ou não de HF	157
Tabela 9 Características gerais dos membros estudados das famílias de Papanduva-SC e de Bom Despacho-MG de acordo com a presença ou não de HF.	158
Tabela 10 Avaliação nutricional dos indivíduos de Papanduva-SC e de Bom Despacho-MG que participaram do estudo.	159

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Algoritmo para diagnóstico da Hipercolesterolemia Familiar.	39
Quadro 2 Características dos iniciadores desenhados para a genotipagem do gene <i>LDLR</i>	65
Quadro 3 Concentração final dos reagentes utilizados na amplificação.	66
Quadro 4 Características do histórico familiar e clínico para o diagnóstico da HF na família de Papanduva-SC.	70
Quadro 5 Histórico de dosagens prévias de parâmetros lipídicos e conhecimento sobre dislipidemia na família de Papanduva-SC.	76
Quadro 6 Diferenças entre o diagnóstico clínico e genético, e mutações encontradas em cada indivíduo	84
Quadro 7 Características do histórico familiar e clínico para o diagnóstico da HF na família de Bom Despacho-MG.	94
Quadro 8 Histórico de dosagens prévias de parâmetros lipídicos e conhecimento sobre dislipidemia da família de Bom Despacho-MG.	109
Quadro 9 Diferenças entre o diagnóstico clínico e genético, e mutações encontradas em cada indivíduo de Bom Despacho-MG.	129
Quadro 10 Características das mutações identificadas em pacientes de Papanduva-SC e Bom Despacho-MG.	150

LISTA DE ABREVIATURAS

Apo A	- Apolipoproteína A
Apo B	- Apolipoproteína B
AVC	- Acidente vascular cerebral
CC	- Circunferência da cintura
CT	- Colesterol total
DAC	- Doença arterial coronariana
DCV	- Doença cardiovascular
DM2	- Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
HDL-c	- Colesterol da lipoproteína de alta densidade
IAM	- Infarto agudo do miocárdio
IDL	- Lipoproteína de densidade intermediária
IMC	- Índice de massa corporal
LDL-c	- Colesterol da lipoproteína de baixa densidade
Sd-LDL-c	- Colesterol da fração pequena e densa da partícula de LDL
Lp (a)	- Lipoproteína a
não-HDL-c	- Colesterol das outras lipoproteínas que não a HDL
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PA	- Pressão arterial
PAD	- Pressão arterial diastólica
PAS	- Pressão arterial sistólica
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PCR-as	- Proteína C reativa de alta sensibilidade
SUS	- Sistema único de saúde
TCLE	- Termo de consentimento livre e esclarecido
TG	- Triglicérides
VLDL	- Lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 Doença cardiovascular e aterogênese	25
2.2 Metabolismo lipoprotéico	27
2.3 Hipercolesterolemia Familiar	29
2.3.1 Definição e etiologia	29
2.3.2 Sinais e sintomas	34
2.3.3 Epidemiologia	35
2.3.4 Diagnóstico	37
2.3.5 Rastreamento universal	39
2.3.6 Rastreamento em cascata	40
2.3.7 Rastreamento genético em cascata	41
2.3.8 Fatores de risco clássicos na hipercolesterolemia familiar	43
2.3.9 Tratamento	44
3 OBJETIVOS	51
3.1 OBJETIVO GERAL	51
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4 METODOLOGIA	53
4.1 CASUÍSTICA	53
4.2 PADRONIZAÇÃO DA GENOTIPAGEM DO GENE <i>LDLR</i>	54
4.2.1 Padronização da Extração de DNA	55
4.2.2 Desenho de iniciadores e amplificação gênica	56
4.2.3 Purificação e sequenciamento do DNA	57
4.3 ANÁLISES LABORATORIAIS E CLÍNICAS	58
4.3.1 Análises bioquímica	58
4.3.2 Análise antropométrica e aferição da pressão arterial	59
4.4 RASTREAMENTO EM CASCATA.....	60
4.4.1 Diagnóstico do caso-índice	60
4.4.2 Triagem dos parentes de 1º, 2º ou 3º grau do caso-índice	60
4.4.3 Estratificação do risco cardiovascular	61
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
5 RESULTADOS	63
5.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO GENOTÍPICO.....	63
5.1.1 Padronização da amplificação gênica	63
5.2 RASTREAMENTO EM CASCATA.....	66
5.2.1 Família de Papanduva-SC	68
5.2.1.1 Avaliação bioquímica e clínica dos pacientes de Papanduva-SC	85
5.2.2 Família de Bom Despacho – MG	93
5.2.2.1 Avaliação bioquímica e clínica dos pacientes de Bom	

Despacho-MG	132
5.2.3 Risco cardiovascular para pacientes com HF dos municípios de Papanduva-SC e Bom Despacho-MG.....	148
5.2.4 Mutações identificadas nos pacientes de Papanduva-SC e Bom Despacho-MG	149
5.2.5 Comparação entre pacientes com e sem HF de Papanduva-SC e Bom Despacho-MG	153
6 DISCUSSÃO	161
6.1 DIFICULDADES NO DIAGNÓSTICOS DE HF	161
6.2 RASTREAMENTO EM CASCATA DE FAMÍLIAS BRASILEIRAS	164
6.2.1 Rastreamento em cascata em Papanduva-SC.....	165
6.2.2. Rastremanto em cascata em Bom Despacho-MG	176
6.2.3 Mutações identificadas no Brasil e no mundo	180
6.3 IMPACTOS DO DIAGNÓSTICO DE HF	182
6.4 NOVAS PERSPECTIVAS PARA O DIAGNÓSTICO DE HF.....	184
6.5 RISCO CARDIOVASCULAR DE PACIENTES COM HF.....	185
6.6 AVALIAÇÃO ALIMENTAR	190
6.7 AVALIAÇÃO PSICOSSOCIAL.....	193
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	197
8 CONCLUSÕES	199
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	201
APÊNDICE I Termos de consentimento livre, esclarecido e revogável	219
APÊNDICE II Termo de assentimento.....	221
APÊNDICE III Questionário de informações sobre o paciente.....	223
APÊNDICE IV Características gerais dos membros da família de Papanduva-SC.....	230
APÊNDICE V Características gerias dos membros da família de Bom Despacho-MG.....	232
ANEXO I Parecer do Comitê de ética em pesquisa com seres humanos.....	235
ANEXO II Código genético.....	240

1 INTRODUÇÃO

A hipercolesterolemia familiar (HF) é um problema global de saúde reconhecido pela OMS (HARADA-SHIBA *et al*, 2012; PANG, 2016). Os portadores de HF apresentam concentrações séricas de colesterol total e LDL-c acentuadamente elevadas, o que causa maior risco cardiovascular (SANTOS *et al*, 2012). Estima-se que a HF afete 30 milhões de pessoas em todo o mundo, entretanto, o grau de suspeição dos pacientes ainda é baixo e a mortalidade precoce é elevada quando a HF não é tratada (GOLBERG *et al*, 2011; HARADA-SHIBA *et al*, 2012; HOVINGH *et al*, 2013; NORDESTGAARD *et al*, 2013; WATTS *et al*, 2014; PANG, 2016). A forma mais eficiente de triagem é o rastreamento dos parentes de primeiro, segundo e terceiro grau de pacientes com diagnóstico clínico e/ou genético da doença (denominados “caso-índice”) (GOLBERG *et al*, 2011; SANTOS *et al*, 2012; FARNIER; BRUCKERT, 2012; LANGSLET; OSE, 2013; WATTS *et al*, 2014). A detecção de uma mutação patogênica é o padrão ouro para o diagnóstico da HF. No entanto, instituições ou laboratórios onde os testes genéticos estão disponíveis são limitados e, em alguns países, o teste molecular é raramente executado, devido à falta de disponibilidade, de padronização de métodos e do alto custo (SANTOS; FRAUCHES; CHACRA, 2015; MEHTA *et al*, 2016). Em estudos preliminares em nosso laboratório, identificamos a falta da descrição de detalhes específicos nas metodologias publicadas para o diagnóstico de HF dificultando, assim, a reprodução dos métodos e estudos nesta área. Além disso, com base nas metodologias disponíveis, amplifica-se e sequencia-se o gene em regiões muito próximas ao início e fim dos exons, o que possibilita a perda de qualidade das sequências nessas regiões e a consequente dificuldade em identificar mutações. Assim, torna-se necessário otimizar e divulgar um método para a identificação de mutações relacionadas à HF por genotipagem do *LDLR*, o principal gene envolvido com a doença, que permita sequenciar completamente cada exon do gene, evitando problemas de qualidade da sequência e permitindo a viabilidade de execução ao utilizar técnicas simples e disponíveis em laboratórios de pesquisa e de menor porte, particularmente em países em desenvolvimento.

Considerando a potencialidade de controle da progressão da aterosclerose nos pacientes jovens, o diagnóstico e o tratamento precoce da HF podem ser de grande impacto na prevenção da morbimortalidade da doença cardiovascular prematura (SANTOS *et al*, 2012;

LANGSLET; OSE, 2013; WATTS *et al*, 2014). No Brasil, estima-se que existam 400.000-670.000 portadores de HF, sendo que apenas 1% desses possui diagnóstico definitivo (JANNES *et al*, 2015). Deste modo, justifica-se a realização da triagem genética em cascata dos parentes dos casos-índices, visando aumentar o número de diagnósticos, bem como associar o fenótipo com cada mutação identificada, avaliando a severidade de cada mutação e seu prognóstico.

Em virtude do alto impacto causado pelas DCVs e, sobretudo, da aterosclerose em indivíduos com HF, o desenvolvimento deste estudo tem importância para a saúde pública no país, contribuindo para o aumento do número de diagnósticos e, conseqüentemente, permitindo um correto acompanhamento e tratamento a fim de prevenir a morbimortalidade dos pacientes e de gerações futuras com HF. A validação e publicação de um método factível e detalhado pode aumentar e/ou incentivar a realização de mais pesquisas nessa área em outras regiões do país e do mundo, contribuindo para a expansão do número de diagnóstico de HF.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇA CARDIOVASCULAR E ATEROGENÊSE

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são doenças multifatoriais relacionadas a fatores de riscos não modificáveis como idade, sexo e raça; e modificáveis como tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, alimentação inadequada, sedentarismo, obesidade e dislipidemias. Desigualdades sociais, diferenças no acesso aos bens e serviços e no acesso à informação, baixa escolaridade e baixa renda, também são considerados determinantes para essas doenças (MENDIS; PUSKA; NORRVING, 2011). Das 56 milhões de mortes no mundo em 2012, 38 milhões foram devidas a DCNT, e há expectativa que este número aumente para 52 milhões em 2030 (WHO, 2014). No Brasil, as DCNT constituem problema de saúde de maior magnitude, correspondendo a 72% das causas de mortes e 75% dos gastos com atenção à saúde no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2013). Dentre as DCNT, as doenças cardiovasculares (DCV) correspondem a maior porcentagem de mortes no mundo (46%), seguida por câncer (21,7%) e doenças respiratórias (10,7%) (WHO, 2014).

As DCV incluem doenças do coração, doenças dos vasos sanguíneos e doenças vasculares cerebrais, e podem ser divididas em (MENDIS; PUSKA; NORRVING, 2011):

- Doenças devido à aterosclerose: doença arterial coronariana (DAC; ex. infarto do miocárdio); doença cerebrovascular (ex. acidente vascular cerebral - AVC); doenças da aorta e outras artérias (ex. hipertensão).
- Outras doenças cardiovasculares: doença cardíaca congênita; doença reumática do coração; cardiomiopatia; arritmias.

As DCV são a principal causa de morte no mundo, responsáveis por mais de 17,5 milhões de mortes em 2012, sendo que 7,4 milhões se deveram à DAC e 6,7 milhões ao AVC (WHO, 2014). As previsões para 2015 eram 20 milhões de mortes relacionadas às DCV (WHO, 2007). Esse número deve aumentar para 22,2 milhões em 2030 (WHO, 2014). Nas Américas, as DCV também são a principal causa de morbidade e mortalidade e afetam cada vez mais as populações em idade ativa, contribuindo de forma desproporcional à perda de anos potenciais de vida saudável e aumentando o impacto econômico e social (OPAS, 2009; OPAS, 2012). Na América do Sul, a Guiana tem a maior taxa de mortalidade por DCV, seguida por Suriname, Brasil e Paraguai

(DEATON *et al.*, 2011). Proporção considerável de mortes por doença cerebrovascular (~ 22%) ocorre prematuramente a cada ano na América Latina. Essa carga de mortalidade precoce representa, em média, 90 mil mortes entre pessoas com menos de 65 anos de idade (de um total de mais de 400 mil mortes por esse grupo de causas) (OPAS, 2009). A mortalidade causada por doenças do aparelho circulatório no Brasil, em 2008, seguiu o panorama mundial e correspondeu a 31,8% do total de mortes (BRASIL, 2013b). É importante mencionar que nas últimas quatro décadas, a taxa de mortalidade por DCV diminuiu nos países de alta renda, devido ao melhor manejo e consequente redução dos fatores de risco cardiovascular, como por exemplo hipertensão, dislipidemia e tabagismo (O'FLAHERTY; BUCHAN; CAPEWELL, 2012; WHO, 2014). Embora a carga dos fatores de risco seja menor nos países de baixa renda, as taxas de DCV e morte são substancialmente mais altas nestes países do que nos países de renda alta, sendo que mais de 80% das mortes cardiovasculares ocorrem em países de baixa e média renda. A falta de acesso aos serviços básicos na atenção primária, a falta de acompanhamento por exames laboratoriais e de medicamentos, padrões inadequados de prática clínica e baixa adesão ao tratamento são algumas das principais razões para as lacunas no tratamento (WHO, 2014).

A aterosclerose, alteração vascular inflamatória crônica, é um dos principais processos patológicos subjacentes que culminam com complicações debilitantes e até fatais das DCV (MENDIS; PUSKA; NORRVING, 2011; SHAO *et al.*, 2016; SOEKI; SATA, 2016). Na aterogênese, inicialmente, com a elevação de lipoproteínas plasmáticas potencialmente aterogênicas, como a lipoproteína de baixa densidade (LDL), a lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e os remanescentes de quilomícrons, ocorre deposição dessas lipoproteínas na camada íntima dos vasos de médio e grande calibre, que associado a outros fatores de risco que agridem o endotélio, levam ao comprometimento dos vasos (NAKASHIMA *et al.*, 2007; MORITA, 2016; SHAO *et al.*, 2016; SOEKI; SATA, 2016). Como consequência, ocorre aumento da permeabilidade da camada endotelial favorecendo ainda mais a entrada das lipoproteínas do plasma para o espaço subendotelial e, em seguida, a oxidação das partículas de LDL por espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. O depósito de lipoproteínas na parede arterial é proporcional à concentração dessas lipoproteínas no plasma (GRADINARU *et al.*, 2015; MORITA, 2016; SHAO *et al.*, 2016; SOEKI; SATA, 2016). Além disto, a LDL oxidada pode inibir a produção de óxido nítrico, um mediador químico com

propriedades antiaterogênicas, incluindo o vaso relaxamento (GRADINARU *et al*, 2015).

Além do aumento da permeabilidade vascular, ocorre aumento da síntese de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial e do processo inflamatório estimulado pela presença de LDL oxidada. As moléculas de adesão são responsáveis pela aderência de monócitos na parede arterial (GRADINARU *et al*, 2015; MORITA, 2016; SHAO *et al*, 2016; SOEKI; SATA, 2016). Em seguida, ocorre infiltração de monócitos do sangue circulante para o espaço subendotelial onde se diferenciam em macrófagos, os quais, através de receptores *scavenger*, captam as LDL oxidadas de maneira não controlada e dão origem às chamadas *células espumosas*, que são o principal constituinte das lesões ateroscleróticas (NAKASHIMA *et al*, 2007; GRADINARU *et al*, 2015; MORITA, 2016; SHAO *et al*, 2016; SOEKI; SATA, 2016). Os macrófagos secretam fatores de crescimento e citocinas que colaboram com a progressão da lesão. Ocorre a multiplicação de células de músculo liso que aumentam a matriz extracelular e diminuem o tamanho do lúmen vascular. As células de músculo liso aumentam a produção de colágeno, que dão origem a uma capa fibrosa ao redor da lesão, chamada de placa aterosclerótica. Mediadores inflamatórios aumentam a expressão de metaloproteinases da matriz, que degradam o colágeno e podem causar o rompimento da placa e promover a formação de trombos plaquetários, que obstruem a luz do vaso causando complicações clínicas, como o infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral (GRADINARU *et al*, 2015; SHAO *et al*, 2016; SOEKI; SATA, 2016).

2.2 METABOLISMO LIPOPROTÉICO

Do ponto de vista fisiológico e clínico, os lipídeos biologicamente relevantes são os fosfolipídeos, o colesterol, os triglicerídeos e os ácidos graxos. As lipoproteínas permitem a solubilização e o transporte dos lipídios e são estruturas compostas por lipídeos e proteínas, as quais são denominadas apolipoproteínas (apo). Existem quatro grandes classes de lipoproteínas separadas em dois grupos: *i*) as ricas em triglicerídeos (TG), representadas pelos quilomícrons e pelas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL); *ii*) as ricas em colesterol, incluindo a lipoproteína de densidade baixa (LDL) e as de densidade alta (HDL) (GIAMMANCO *et al*, 2015; BARTER; RYE, 2016; MORITA, 2016). Existe ainda uma classe de lipoproteínas de densidade intermediária

(IDL) e a lipoproteína (a) (Lp(a)), que resulta da ligação covalente de uma molécula de apolipoproteína (a) (apo(a)) à partícula de LDL (BARTER; RYE, 2016; MORITA, 2016).

Os triglicerídeos representam a maior parte das gorduras ingeridas e são hidrolisados pelas lipases pancreáticas em ácidos graxos livres, monoacilglicerol e diacilglicerol, que em seguida são emulsificados pelos sais biliares formando as micelas, que são absorvidas pelas células intestinais (GIAMMANCO *et al*, 2015). Após serem absorvidas, as partículas lipídicas, particularmente os ácidos graxos, dão origem aos quilomícrons, que contêm Apo B-48, o componente aminoterminal da Apo B-100 (GIAMMANCO *et al*, 2015; MORITA, 2016). Os quilomícrons são secretados pelas células intestinais para o sistema linfático e alcançam a circulação onde sofrem hidrólise pela lipase lipoproteica, liberando ácidos graxos, glicerol e colesterol não esterificado. Após a lipólise, os ácidos graxos são capturados por células musculares e adipócitos. Remanescentes de quilomícrons e ácidos graxos também são capturados pelo fígado, onde são utilizados na formação de VLDL, que contêm a Apo B-100 como apolipoproteína principal (GIAMMANCO *et al*, 2015; BARTER; RYE, 2016; MORITA, 2016). A VLDL é secretada pelo fígado na circulação periférica, onde sofre hidrólise pela ação da lipase lipoproteica (GIAMMANCO *et al*, 2015; BARTER; RYE, 2016; MORITA, 2016). Os ácidos graxos assim liberados podem ser armazenados no tecido adiposo ou prontamente utilizados pelo músculo esquelético. A VLDL, progressivamente depletada de triglicerídeos, transforma-se em remanescentes removidos pelo fígado por receptores específicos. Uma parte da VLDL dá origem à IDL, que é removida rapidamente do plasma. O processo de catabolismo continua envolvendo a ação da lipase hepática e resultando na formação da LDL. Durante a hidrólise da VLDL, essa lipoproteína também está sujeita a trocas lipídicas com a HDL e LDL (BARTER; RYE, 2016; MORITA, 2016).

A LDL tem conteúdo residual de triglicerídeos e é composta principalmente de colesterol e uma única apolipoproteína, a Apo B-100. A LDL é captada por células hepáticas ou periféricas por meio dos receptores de LDL (LDL-R). No interior das células, o colesterol livre pode ser esterificado para depósito (MESMIN; MAXFIELD, 2010; BARTER; RYE, 2016; MORITA, 2016).

As partículas de HDL são formadas no fígado, no intestino e na circulação e seu principal conteúdo proteico é representado pela Apo AI e AII. O processo de esterificação do colesterol, que ocorre

principalmente na HDL, é fundamental para sua estabilização e transporte no plasma. A HDL transporta o colesterol até o fígado em um processo denominado transporte reverso do colesterol (MESMIN; MAXFIELD, 2010; WUSTNER; SOLANKO, 2015; BARTER; RYE, 2016; MORITA, 2016).

O acúmulo de quilomícrons e/ou de VLDL no plasma resulta em hipertrigliceridemia e o acúmulo de lipoproteínas ricas em colesterol, como a LDL, resulta em hipercolesterolemia. A dislipidemia, especialmente o aumento do LDL-colesterol (LDL-c), é fator de influência reconhecido, determinante e fundamental na progressão da aterosclerose quando concentrações séricas de colesterol total, LDL-c e triglicerídeos encontram-se elevados e, contrariamente, o HDL-colesterol (HDL-c) encontra-se diminuído (BARTER; RYE, 2016; MORITA, 2016).

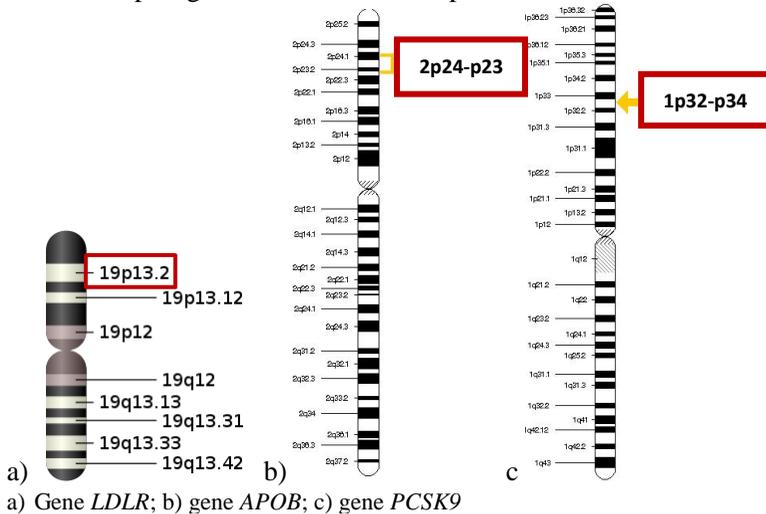
2.3 HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR (HF)

O aumento nas concentrações séricas de LDL-c manifesta-se de forma grave e precoce nos pacientes com hipercolesterolemia familiar (HF). Quando não tratados, a maioria desses pacientes heterozigotos apresentará eventos relacionados à aterosclerose até os 60 anos, enquanto a maioria dos pacientes homozigotos apresentará risco de eventos desde a 2ª década de vida (SANTOS *et al*, 2012).

2.3.1 Definição e etiologia

A HF é uma doença genética relacionada ao metabolismo das lipoproteínas, cujo modo de herança é autossômico dominante (GOLBERG, 2011; HARADA-SHIBA *et al*, 2012; MASANA, 2013; WATTS, 2014; ESC-EAS, 2014; BRAUTBAR, 2015). O defeito primário geralmente é decorrente de alterações no gene *LDLR*, que codifica o receptor de LDL (LDL-R) (FRANCKE; BROWNS; GOLDSTEIN, 1984; GOLBERG *et al*, 2011; HARADA-SHIBA *et al*, 2012; HOVINGH *et al*, 2013; WATTS *et al*, 2014). O gene *LDLR* (Figura 1a) se localiza no cromossomo 19p13.2 e compreende 18 exons e aproximadamente 45 mil pares de bases que codificam uma proteína composta de 860 resíduos de aminoácidos e vários domínios funcionais (FRANCKE; BROWNS; GOLDSTEIN, 1984; LEIGH *et al*, 2008; BRAUTBAR *et al*, 2015).

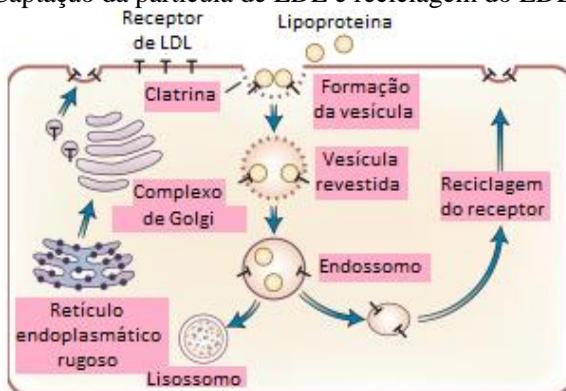
Figura 1 Principais genes envolvidos na Hipercolesterolemia Familiar.



Fonte: <https://familialhypercholesterolemia.weebly.com/about.html>

A transcrição do gene *LDLR* é controlada por um mecanismo de retroalimentação em resposta a variações no conteúdo intracelular de esteróis e na demanda celular de colesterol (FRANCKE; BROWNS; GOLDSTEIN, 1984). Existem mais de 1.700 mutações do gene *LDLR* documentadas e essas representam a maioria dos casos da doença (aprox. 80%) (HOVINGH *et al*, 2013; BRAUTBAR *et al*, 2015; WIEGMAN *et al*, 2015). Localizado na superfície das células hepáticas, a partícula de LDL se liga ao receptor e facilita a sua captação, realizada por endocitose mediada pelo receptor (Figura 2). A LDL é degradada nos lisossomos e o colesterol é liberado na célula para uso metabólico. Quando os receptores de LDL são defeituosos, a remoção de LDL do plasma diminui, e a concentração plasmática de LDL-c aumenta (FRANCKE; BROWNS; GOLDSTEIN, 1984; HOVINGH, *et al*, 2013; BRAUTBAR *et al*, 2015; WIEGMAN *et al*, 2015). Como as partículas de LDL circulam por mais tempo no plasma dos pacientes com HF, elas estão mais sujeitas à oxidação e a outras transformações, resultando na captação aumentada da LDL modificada pelos macrófagos, deflagrando mecanismos pró-aterogênicos (GOLBERG *et al*, 2011; HARADASHIBA *et al*, 2012; HOVINGH *et al*, 2013; WIEGMAN *et al*, 2015).

Figura 2 Captação da partícula de LDL e reciclagem do LDL-R.



A partícula de LDL se liga ao LDL-R na superfície do hepatócito e sofre endocitose e consequente degradação lisossomal. O receptor de LDL é enviado de volta à superfície do hepatócito.

Fonte<http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Receptores+de+LDL&lang=3>

A penetrância de HF é de quase 100%, significando que metade da descendência de um indivíduo afetado pode apresentar LDL-c elevado desde o nascimento, sem diferenças entre os sexos (SANTOS *et al*, 2012; MASANA *et al*, 2013; WATTS, 2014; BRAUTBAR *et al*, 2015). Em pacientes heterozigotos (HFHe), um gene defeituoso para o receptor de LDL é herdado de um dos pais e um gene normal, do outro. Como dois genes funcionais são necessários para manter o nível plasmático normal de LDL-c, nos pacientes heterozigóticos ocorre aumento na concentração de LDL-c para aproximadamente duas vezes o normal ainda na infância e IAM pode ocorrer antes dos 35 anos. Os pacientes homozigotos (HFHo) herdam dois genes defeituosos, assim, os pacientes têm hipercolesterolemia grave e, geralmente, sofrem IAM antes dos 20 anos ou até mesmo na infância (FRANCKE, BROWNS, GOLDSTEIN, 1984; HARADA-SHIBA *et al*, 2012; HOVINGH *et al*, 2013). Pacientes homozigóticos com menos de 2% da atividade normal do LDL-R são classificados como receptor negativo e pacientes com 2% a 25% da atividade normal do LDL-R são classificados como receptor defeituoso. Existem cinco principais classes de defeitos no gene *LDLR* (MASANA *et al*, 2013):

- Classe I: receptor de LDL não é sintetizado;

- Classe II: receptor de LDL não é devidamente transportado do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi e há menor expressão na superfície celular;

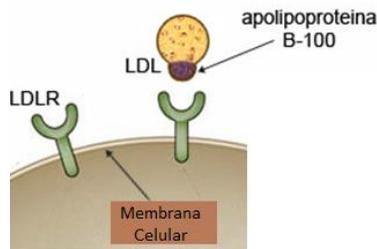
- Classe III: o receptor de LDL não se liga corretamente ao LDL na superfície da célula devido a defeito na Apo B-100 ou no receptor de LDL;

- Classe IV: proteínas transportadoras ligam-se normalmente à LDL, mas não se situam nas depressões revestidas e, portanto, a LDL não é internalizada;

- Classe V: o receptor de LDL não é capaz de liberar as partículas de LDL nos endossomas, assim, não é enviado de volta para a superfície celular.

A partícula de LDL se liga ao LDL-R através da Apo B-100, que é reconhecida pelo receptor e, assim, defeitos nessa apolipoproteína também causam hipercolesterolemia (Figura 3) (INNERARITY *et al*, 1987; SORIA *et al*, 1989). A hipercolesterolemia devida à mutação no gene *APOB* é referida como Defeito Familiar de Apo B (HARADA-SHIBA *et al*, 2012; MASANA *et al*, 2013). A Apo B-100 defeituosa possui menor afinidade pelo LDL-R, levando à reduzida taxa de depuração da LDL (INNERARITY *et al*, 1987; SORIA *et al*, 1989). O gene *APOB* está localizado no cromossomo 2p24-p23 e possui 29 exons. Mutações no gene da Apo B são menos comuns e menos graves que mutações no *LDL-R* (GOLBERG *et al*, 2011; HARADA-SHIBA, M *et al*, 2012; HOVINGH *et al*, 2013). Os portadores de Apo B defeituosa apresentam concentração de LDL-c entre 20 e 25% menor que os portadores de mutação no *LDL-R* (MASANA *et al*, 2013).

Figura 3 Ligação específica da LDL com o LDL-R através da Apo B-100.

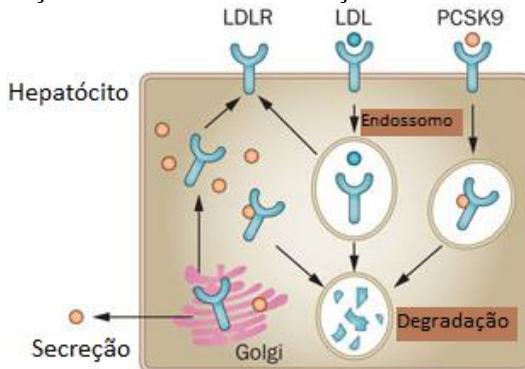


A apolipoproteína B-100 é a parte específica da partícula de LDL que se liga ao LDL-R.

Fonte<http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Apolipoprote%C3%A9+B-100&lang=2>

Mutações no gene da pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (*PCSK9*) também podem causar hipercolesterolemia familiar (ABIFADEL *et al*, 2003; QIAN *et al*, 2007). A *PCSK9* é uma proteína da família das pró-proteínas convertases, anteriormente chamada convertase 1, regulada por apoptose neuronal (NARC-1) e, como outras convertases, está envolvida na clivagem proteolítica de uma grande variedade de proteínas (MAXWELL; BRESLOW, 2005; SEIDAH; KHATIB; PRAT, 2006). O gene *PCSK9* localiza-se no cromossomo 1p32-p34, é constituído por 12 exons e 3617 pb que traduzem uma proteína com 692 aminoácidos. Em 2003, foi identificada a primeira mutação neste gene, que corresponde à alteração no nucleotídeo 625 levando à substituição da arginina por serina no códon 127 (ABIFADEL *et al*, 2003). A *PCSK9* participa do catabolismo do LDL-R, assim, mutações com ganho de função no gene da *PCSK9* podem acelerar o catabolismo do LDL-R causando a HF (ABIFADEL *et al*, 2003; QIAN *et al*, 2007) (Figura 4). Mutações na *PCSK9* são a causa menos comum de HF, representando cerca de 5% dos casos (GOLBERG *et al*, 2011; HARADA-SHIBA *et al*, 2012).

Figura 4 Degradação do LDL-R através da ação da *PCSK9*.



A *PCSK9* se liga ao LDL-R promovendo sua endocitose e consequente degradação.

Fonte <<http://www.nature.com/nrendo/journal/v9/n2/full/nrendo.2012.254.html>

>

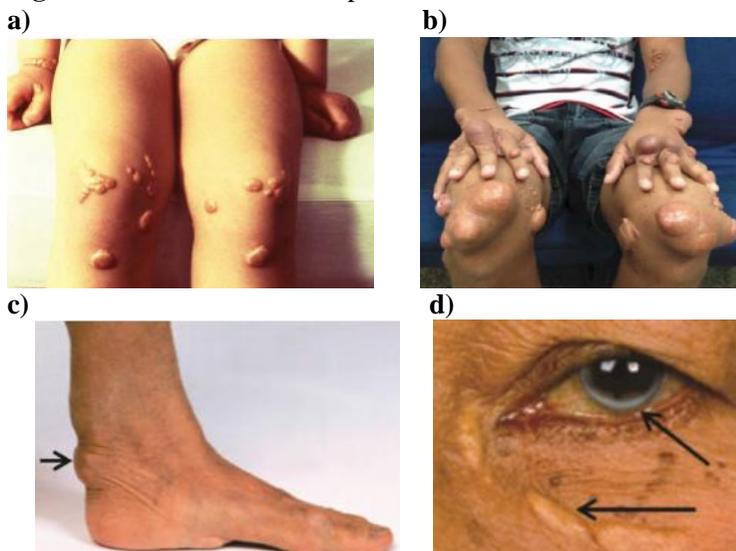
Em síntese, a HF é resultante de defeitos de remoção da LDL da circulação e o fenótipo clínico é muito semelhante entre as três formas mais comuns de HF (GOLBERG *et al*, 2011; HARADA-SHIBA *et al*, 2012; HOVINGH *et al*, 2013).

2.3.2 Sinais e sintomas

A doença se caracteriza por concentrações elevadas de colesterol, especialmente o LDL-c (HARADA-SHIBA *et al*, 2012; HOVINGH *et al*, 2013; WATTS *et al*, 2014; PANG; LANSBERG; WATTS, 2016). A concentração de colesterol total e LDL-c em pacientes com HFHe varia entre 350-550 mg/dL e 200-400 mg/dL, respectivamente, enquanto nos pacientes com HFHo pode variar entre 650-1000 mg/dL e 600 mg/dL, respectivamente (GOLBERG *et al*, 2011; HOVINGH *et al*, 2013; MASANA *et al*, 2013).

O depósito de colesterol nos tecidos leva à presença de sinais clínicos característicos, como xantomas tendinosos, especialmente nos cotovelos, tendão de Aquiles e nas mãos e xantelasma ao redor dos olhos (Figura 5 a, b, c, d) (HARADA-SHIBA *et al*, 2012; HOVINGH *et al*, 2013; MASANA *et al*, 2013). Os xantomas no tendão de Aquiles tendem a aparecer em 50% dos pacientes antes dos 30 anos de idade (HARADA-SHIBA *et al*, 2012). Nos últimos anos, devido à possibilidade de tratamentos eficazes de HF na juventude, a presença de xantomas tem diminuído (MASANA *et al*, 2013). A deposição de colesterol pode ocorrer ao redor da córnea, levando à formação de arco corneal e, quando presente nas primeiras décadas de vida, pode ser útil no diagnóstico (Figura 5d) (HOVINGH *et al*, 2013; MASANA *et al*, 2013). Xantomas e arco corneal são patognomônicos para HFHe e HFHo (HOVINGH *et al*, 2013). Entretanto, a ausência de xantomas não exclui o diagnóstico de HF, pois 20 a 30% dos pacientes diagnosticados não apresentam xantomas, especialmente antes dos 20 anos (HARADA-SHIBA *et al*, 2012). Comparado com HFHe, esses sintomas são muito mais graves e ocorrem mais cedo em pacientes com HFHo (HARADA-SHIBA *et al*, 2012; McCRINDLE, 2012; HOVINGH *et al*, 2013). Xantomas podem ser observados no nascimento ou se desenvolver durante a infância nos indivíduos com HFHo (McCRINDLE, 2012; HOVINGH *et al*, 2013).

Figura 5 Sinais clínicos de Hipercolesterolemia Familiar.



Xantomas tendinosos em crianças (a) e adulto (b), xantoma no tendão de Aquiles (c), xantelasma e arco corneal (d). **Fonte** Harada-Shiba *et al*, 2012; Hovingh *et al*, 2013; Rocha *et al*, 2013.

O depósito de colesterol nas artérias aumenta o risco de DAC prematura (HARADA-SHIBA *et al*, 2012; HOVINGH *et al*, 2013). A espessura da camada íntima da artéria carótida está associada a fatores de risco cardiovasculares e ao grau da aterosclerose. Em crianças com HF, pode ser verificada a presença de disfunção endotelial e aumento da espessura da camada íntima da artéria carótida, o que é preditor de aterosclerose prematura na vida adulta (HARADA-SHIBA *et al*, 2012).

2.3.3 Epidemiologia

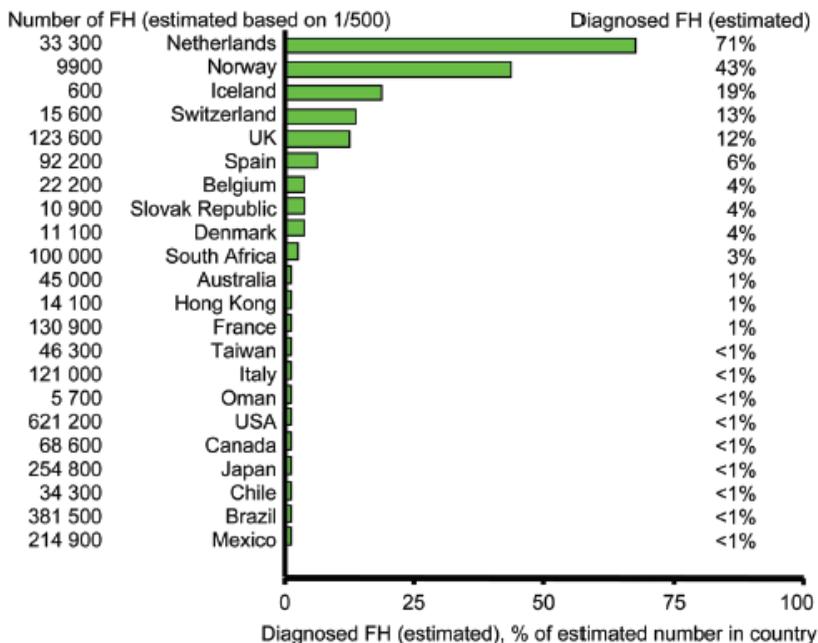
A HF é um problema de saúde mundial reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e é uma das doenças monogênicas herdadas mais comuns na população geral (HARADA-SHIBA *et al*, 2012; PANG, 2016). Estima-se que a doença afete 30 milhões de pessoas no mundo (PANG, 2016). A frequência da HF na sua forma heterozigótica é de cerca de 1:500 indivíduos, sendo muito rara na forma homozigótica, com frequência estimada de 1:1.000.000 indivíduos (FRANCKE; BROWNS; GOLDSTEIN, 1984; GOLBERG *et al*, 2011; HARADA-SHIBA *et al*, 2012; HOVINGH *et al*, 2013;

BRAUTBAR *et al*, 2015). Entretanto, a HF é mais prevalente em algumas populações, devido ao efeito "fundador", como os sul-africanos (1:100), libaneses (1:170), franco-canadenses (1:270) (HOVINGH *et al*, 2013; BRAUTBAR *et al*, 2015).

Ocorre alta incidência de doença aterosclerótica prematura (em homens abaixo de 55 anos e em mulheres abaixo de 65 anos), reduzindo a expectativa de vida em muitas famílias de portadores de HF, especialmente em função da DAC (HARADA-SHIBA *et al*, 2012; WATTS *et al*, 2014). Cerca de 90% dos homens e 50% das mulheres com HF heterozigótica terão um evento cardiovascular antes dos 65 anos de idade (MASANA *et al*, 2013). Pacientes heterozigotos não medicados têm cerca de 20 vezes mais risco de DAC que aqueles que se encontram sob tratamento (HARADA-SHIBA *et al*, 2012; BAYS *et al*, 2016).

Com base nos resultados de vários estudos, menos de 20% dos indivíduos com HF são diagnosticados, especialmente crianças, e desses, apenas uma minoria recebe tratamento adequado (GOLBERG *et al*, 2011; HARADA-SHIBA *et al*, 2012; HOVINGH *et al*, 2013; NORDESTGAARD *et al*, 2013; WATTS *et al*, 2014). As exceções são os países que implementaram programas de rastreio onde, com base na prevalência de 1:500 e na população de cada país, a Holanda apresenta 71% dos casos diagnosticados, a Noruega 43%, a Suíça 13%, o Reino Unido 12% e a Espanha 6%. Ainda assim, esses números são subestimados. Por exemplo, na Noruega, onde a prevalência é de 1:300 casos, na prática significa diagnóstico de 26% dos casos ao invés de 43% (Figura 6) (NORDESTGAARD *et al*, 2013).

Figura 6 Estimativa percentual de casos diagnosticados de HF por país.



Fonte. Nordestgaard *et al.*, 2013.

2.3.4 Diagnóstico

A identificação de indivíduos portadores de HF e de seus familiares, de suas manutenções ao longo da vida e o início precoce de terapia hipolipemiante são aspectos importantes na prevenção da DCV prematura e do risco de morte nessa população. Os critérios clínicos e laboratoriais para o diagnóstico da HF são arbitrários e baseiam-se nos seguintes dados: sinais clínicos de depósitos extravasculares de colesterol (xantomas, arco corneal antes dos 45 anos); taxas elevadas de LDL-c ou colesterol total no plasma; história familiar de hipercolesterolemia e/ou doença aterosclerótica prematura e; identificação de mutações e polimorfismos genéticos que favoreçam o desenvolvimento da HF (GOLBERG *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2012; HARADA-SHIBA *et al.*, 2012; HOVINGH *et al.*, 2013; NORDESTGAARD, 2013; WATTS *et al.*, 2014; GENEST *et al.*, 2014; WIEGMAN *et al.*, 2015).

Existem vários critérios para diagnosticar a HF fenotipicamente, mas nenhum deles é acordado internacionalmente. Dentre os principais critérios utilizados, destacam-se o *The Dutch Lipid Clinic Network Criteria* (DLCNC) da Holanda, o *Simon Broome criteria*, do Reino Unido e o *Make early diagnosis to prevent early death* (MEDPED), dos Estados Unidos. O DLCNC utiliza um sistema de pontos com base nas concentrações de colesterol do indivíduo, histórico pessoal e familiar de DAC prematura, exame físico e mutações detectadas para prever a probabilidade de um diagnóstico possível, provável ou definitivo de HF. Esses critérios são cada vez mais aceitos como simples e abrangentes. Além disto, o escore numérico não é altamente dependente da concentração de LDL-c e pode ser mais sensível na detecção de casos índice, considerando um score > 5 como um diagnóstico altamente provável. O sistema Simon Broome é comparável ao DLCNC na predição de HF, e considera as concentrações de colesterol, exame físico e histórico familiar, mas não emprega o arco corneal. Um diagnóstico definitivo de HF é feito se um indivíduo apresentar concentrações elevadas de colesterol e xantomas de tendão ou uma mutação. Um diagnóstico possível ocorre se o indivíduo possuir altas concentrações de colesterol e história familiar de hipercolesterolemia ou DAC prematura. Esse critério pode apresentar resultados falso-negativos em indivíduos que não são claramente hipercolesterolêmicos. O sistema MEDPED, utiliza *cut offs* de colesterol total e LDL-c e exige estritamente que as concentrações de colesterol sejam conhecidas em outros membros da família. Assim como o Simon Broome, também pode ser menos específico na predição de mutações (WATTS *et al.*, 2014; SHARIFI; FUTEMA; NAIR; HUMPHRIES, 2017).

De acordo com a I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar, o diagnóstico de HF no Brasil é feito baseando-se no algoritmo apresentado no Quadro 1, o qual se fundamenta nos critérios DLCNC.

A coleta de sangue para a determinação da concentração de colesterol total e LDL-c visando rastrear a HF é de fundamental importância para o diagnóstico do maior número possível de casos e, conseqüentemente, reduzir o impacto da HF na morbi-mortalidade cardiovascular na população geral. O rastreamento pode ser realizado por meio de dois métodos: rastreamento universal e rastreamento em cascata (GOLBERG *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2012).

Quadro 1 Algoritmo para diagnóstico da Hipercolesterolemia Familiar.

Parâmetro	Ponto
Histórico familiar	
Parente de 1º grau portador de DAC prematura (homens < 55 e mulher < 60 anos) OU	1
Parente adulto de 1º ou 2º grau com colesterol total maior que 290 mg/dL	1
Parente de 1º grau portador de xantoma tendinoso e/ou arco corneal OU	2
Parente de 1º grau menor de 16 anos com colesterol total maior que 260 mg/dL	2
Histórico clínico	
Paciente portador de DAC prematura (homens < 55 e mulher < 60 anos)	2
Paciente portador de doença arterial cerebral ou periférica prematura (homens < 55 e mulher < 60 anos)	1
Exame físico	
Xantoma tendinoso	6
Arco corneal < 45 anos	4
Concentração de LDL-c (mg/dL)	
≥ 330 mg/dL	8
250 - 329 mg/dL	5
190 - 249 mg/dL	3
155 - 189 mg/dL	1
Análise do DNA	
Presença de mutação do gene do LDLR, da Apo B-100 ou da PCSK9	8
Diagnóstico de HF	
Certeza: 8 pontos	
Provável: 6-8 pontos	
Possível: 3 – 5 pontos	

2.3.5 Rastreamento universal

Acima de 10 anos, toda criança deve ter dosado, ao menos uma vez, seu colesterol total, independentemente da presença de fatores de risco. A obtenção das concentrações de lipídeos plasmáticos também deve ser considerada a partir dos 2 anos de idade nas seguintes situações (SANTOS *et al.*, 2012):

- Histórico familiar de DAC prematura (homens < 55 anos ou mulheres < 65 anos);
- Pais com colesterol total superior a 240 mg/dL;

- Se a criança apresentar manifestações clínicas de dislipidemias (xantomas, xantelasma, arco corneal, dor abdominal recorrente, pancreatite);

- Se a criança apresentar outros fatores de risco, como hipertensão arterial sistêmica, obesidade, tabagismo, diabetes *mellitus*, nascidos pequenos para a idade gestacional, dieta rica em gorduras saturadas e/ou ácidos graxos *trans*;

- Se a criança utilizar medicamentos ou se for portadora de doenças que cursam com dislipidemia (ex. hipotireoidismo, doença de Cushing).

A periodicidade recomendada para a determinação dos lipídeos plasmáticos é debatida. De forma geral, se o perfil lipídico for normal, mas existirem outros critérios de possível HF, como história familiar de doença aterosclerótica precoce, o exame pode ser repetido após um ano. Na ausência desses fatores, o exame pode ser repetido em até cinco anos. Outros dados, como idade, presença de outros fatores de risco para aterosclerose, grau de controle dos fatores de risco, hábitos de vida e eventual uso de medicamentos que possam interferir com o metabolismo lipídico, podem ser considerados para individualizar a periodicidade das dosagens lipídicas (SANTOS *et al*, 2012).

Quando considerado o valor de LDL-c isolado, o ponto de corte com maior sensibilidade e especificidade para suspeita de HF na infância é 150 mg/dL. O ponto de partida para se considerar a possibilidade diagnóstica de HF é a concentração ≥ 190 mg/dL em adultos maiores de 20 anos (SANTOS *et al*, 2012). Na população geral, a probabilidade de HF é de aproximadamente 80% na presença de LDL-c ≥ 250 mg/dL em indivíduos ≥ 30 anos; ou LDL-c ≥ 220 mg/dL em indivíduos entre 20-29 anos; ou LDL-c ≥ 190 mg/dL em indivíduos < 20 anos (SANTOS *et al*, 2012). Antes de se fazer o diagnóstico de HF, no entanto, devem ser afastadas causas secundárias de hipercolesterolemia, incluindo hipotireoidismo e síndrome nefrótica. Vale notar que a presença de hipertrigliceridemia não exclui o diagnóstico de HF (GOLBERG *et al*, 2011; SANTOS *et al*, 2012; WATTS *et al*, 2014).

2.3.6 Rastreamento em cascata

O rastreamento em cascata envolve a determinação do perfil lipídico nos parentes do paciente diagnosticado com HF, denominado “caso-índice” (GOLBERG *et al*, 2011; SANTOS *et al*, 2012; FARNIER; BRUCKERT, 2012; LANGSLET; OSE, 2013; WATTS *et*

al, 2014). As chances de identificação de outros portadores de HF a partir de um caso-índice são de 50% nos familiares de primeiro grau, 25% nos de segundo grau e 12,5% nos de terceiro grau (LANGSLET; OSE, 2013). O rastreamento em cascata pode ser útil quando o diagnóstico é incerto (SANTOS *et al*, 2012; LANGSLET; OSE, 2013). À medida que novos casos vão sendo identificados, novos parentes vão sendo recomendados para o rastreamento. O rastreamento em cascata aumenta o número de diagnósticos e diminui a idade com que o indivíduo é diagnosticado, havendo maior chance de tratamento precoce e diminuição do risco cardiovascular global, sendo considerado, portanto, altamente custo-efetivo (SANTOS *et al*, 2012; LANGSLET; OSE, 2013; WATTS *et al*, 2014).

2.3.7 Rastreamento genético em cascata

O gene causal da HF não pode ser predito clinicamente, sendo necessário teste genético para a sua verificação. Pelo grande número de mutações possíveis, o método de diagnóstico genético deve incluir o sequenciamento da região codificadora dos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*. Quando encontrada a mutação causal, o teste fornece resposta definitiva para o diagnóstico da HF (SANTOS *et al*, 2012; WATTS *et al*, 2014; GENEST *et al*, 2014; BRAUTBAR *et al*, 2015; BAYS *et al*, 2016).

Estudos envolvendo o rastreamento genético em cascata de indivíduos com mutações causadoras de HF demonstraram que, enquanto parentes com a mutação apresentam concentrações de LDL-c em média duas vezes maior quando comparada aos parentes que não carregam a mutação, uma significativa proporção dos indivíduos possui concentrações abaixo do *cutoff* diagnóstico e, assim, possuem um diagnóstico genético de HF, mas não clínico. Esses indivíduos podem apresentar outros genes favoráveis ou estilo de vida que reduzem o impacto da mutação, mas, ainda assim, eles devem ser acompanhados e beneficiados com tratamento hipolipemiante (NORDESTGAARD *et al*, 2013).

Sendo padrão de referência para o diagnóstico confirmatório de HF, o teste genético pode ser particularmente útil nos casos de familiares com diagnóstico clínico equivocado ou, apenas com concentração sérica de LDL-c sugestiva de HF. Testes genéticos também podem ser importantes para a identificação de uma mutação causadora de HF em famílias recém-identificadas ou com forte suspeita

de HF (GOLBERG *et al*, 2011; SANTOS *et al*, 2012; FARNIER; BRUCKERT, 2012; WATTS *et al*, 2014; GENEST *et al*, 2014; BRAUTBAR *et al*, 2015). A identificação de uma mutação que causa HF pode fornecer motivação adicional para alguns pacientes iniciarem o tratamento adequado. A identificação do gene defeituoso pode esclarecer alguns aspectos do fenótipo e permitir o diagnóstico e tratamento precoce, além de fornecer valor prognóstico que pode influenciar as estratégias de tratamento (VAN AALST COHEN, 2006; GOLBERG *et al*, 2011; HOVINGH, 2013; BRAUTBAR *et al*, 2015).

Os testes genéticos, no entanto, têm limitações. A taxa de identificação de mutação por meio do teste genético é de até 50% nos pacientes hipercolesterolêmicos com diagnóstico possível de HF, enquanto em pacientes com HF definitiva, a taxa de identificação pode chegar a 86% (GOLBERG *et al*, 2011; WATTS *et al*, 2014). A ampla variação no número de diagnósticos deve-se ao diagnóstico clínico equivocado, à falta de sensibilidade da técnica utilizada ou aos casos de HF relacionados a genes ainda desconhecidos (VAN AALST-COHEN *et al*, 2006). É importante ressaltar que o teste genético negativo não exclui a HF. Além disto, indivíduos com LDL-c elevado permanecem em alto risco e devem ser tratados, independentemente dos resultados dos testes genéticos (GOLBERG *et al*, 2011; WATTS *et al*, 2014).

Em resumo, os indivíduos diagnosticados por meio de teste genético como portadores de HF passam a ser os casos-índice, devendo ser rastreados a partir desses os parentes de 1º grau e, subsequentemente, os parentes de 2º e 3º grau, numa abordagem genética combinada à análise do perfil lipídico, anamnese e exame físico. Isso é referido como rastreamento genético em cascata (SANTOS *et al*, 2012; HOVINGH *et al*, 2013; WATTS *et al*, 2014; BRAUTBAR *et al*, 2015). Pode-se, no entanto, como estratégia mais custo-efetiva, realizar como primeira abordagem, o teste genético buscando a mesma alteração do caso-índice (HOVINGH *et al*, 2013).

Em 1994, foi iniciado na Holanda um programa de rastreamento genético em cascata que provou ser altamente efetivo no diagnóstico de pacientes com HF (HOVINGH *et al*, 2013). Em 2010, programas de rastreio em 39 países, dentre eles Noruega, Dinamarca, Espanha, Austrália e Nova Zelândia, identificaram 50.000 pacientes com HF. No entanto, estima-se que existam 4,4 milhões de portadores de HF nesses países, o que indica que ainda é necessário mais trabalho e intensificação dos programas de rastreio (HOVINGH *et al*, 2013). Iniciativas locais também obtiveram sucesso em aumentar o número de

diagnósticos na Áustria, Polônia, Alemanha, Irlanda, Portugal, Itália, Suíça e Taiwan (HOVINGH *et al*, 2013). No Brasil, existe a estimativa de 400.000 a 670.000 portadores de HF, sendo menos de 1% diagnosticados (JANNES *et al*, 2015).

Os avanços em testes genéticos adicionaram uma perspectiva diferente à doença, porque eles fornecem um diagnóstico mais preciso e precoce da HF e também fornecem informações sobre o fenótipo e o prognóstico, que não poderiam ser conhecidas a partir das concentrações de lipídeos apenas. Além disto, permite a identificação de casos silenciosos na população, diminuindo a incidência de doença cardiovascular prematura (FAHED; NEMER, 2011).

2.3.8 Fatores de risco clássicos na Hipercolesterolemia Familiar

Os fatores de risco clássicos para DCV também apresentam importância na estratificação de risco nos portadores de HF (SANTOS *et al*, 2012). Há risco maior de homens apresentarem evento cardiovascular em comparação às mulheres com HF (JANSEN *et al*, 2004). A associação de tabagismo com HF apresenta chance maior de DAC para os portadores tabagistas. Diabetes *mellitus*, hipertensão arterial e HDL-c baixo também conferem maior risco na população com HF, devendo, portanto, ser corretamente diagnosticadas e tratadas (JANSEN *et al*, 2004).

Segundo a I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (2012), portadores de HF, com qualquer uma das seguintes características, devem ser considerados como de “muito alto risco”:

- Doença cardiovascular estabelecida (ex. história prévia de IAM, AVC, doença arterial periférica, revascularização miocárdica, angina);
- Tabagista;
- Histórico familiar de doença coronariana prematura (parentes de 1º ou 2º grau com início da doença antes dos 45 anos no sexo masculino e antes dos 55 anos no sexo feminino);

Também estão em “muito alto risco” os portadores de HF que apresentarem dois ou mais dos seguintes fatores de risco:

- Idade maior que 30 anos se homem e maior que 40 anos se mulher;
- LDL-c basal maior que 250 mg/dL;
- Ser do sexo masculino;
- Histórico familiar de DAC prematura (parentes de 1º grau antes dos 55 anos no sexo masculino, antes dos 65 anos no sexo feminino);
- Síndrome metabólica;

- HDL-c baixo (menor que 40 mg/dL para homens e menor que 50 mg/dL para mulheres);
- Hipertensão arterial sistêmica (maior que 140 x 90 mmHg ou em tratamento medicamentoso);
- Aumento da lipoproteína (a) (maior que 60 mg/dL);
- Exame físico apresentar sinais (ex. xantoma de tendão).

2.3.9 Tratamento

O objetivo do tratamento de pacientes com HF é a redução das concentrações plasmáticas de LDL-c para diminuir o risco de DCV (SANTOS *et al*, 2012). Mudanças de estilo de vida, compreendendo dieta saudável, redução do peso corporal em excesso, cessação do tabagismo e atividade física moderada são sempre recomendadas para a prevenção de DCV. Entretanto, em razão das elevadas concentrações de LDL-c que caracterizam a HF, as mudanças no estilo de vida têm menor impacto nos lipídeos nos portadores de HF do que na população em geral (GOLBERG *et al*, 2011; HARADA-SHIBA *et al*, 2012; McCRINDLE 2012; SANTOS *et al*, 2012; WATTS *et al*, 2014; PATEL; SCOPELLITI; SAVELLONI, 2015; VOGT, 2015). No entanto, recomendações dietéticas podem produzir benefícios, reduzindo as concentrações séricas de colesterol e triglicérides, favorecendo a reatividade vascular, mantendo o controle de peso corporal e evitando outras doenças concomitantes, como o diabetes *mellitus* e a hipertensão arterial, e deve ser incentivada a todos os portadores de HF, especialmente crianças (HARADA-SHIBA *et al*, 2012; SANTOS *et al*, 2012; McCRINDLE, 2012; WATTS *et al*, 2014; PATEL; SCOPELLITI; SAVELLONI, 2015; VOGT, 2015).

Em adultos, as estatinas podem reduzir as concentrações de LDL-c em pacientes homozigotos, diminuindo a síntese e a secreção de lipoproteínas contendo Apo B em portadores receptor-negativo e aumentando a atividade do LDL-R residual em portadores com receptor-defeituoso (WATTS *et al*, 2014; VOGT, 2015; BARTER; RYE, 2016). Estatinas potentes, como atorvastatina (10-80 mg) e rosuvastatina (10-40 mg) são a primeira escolha para obter redução de 50% das concentrações basais de LDL-c em portadores de HF (AHN; CHOI, 2015; PATEL; SCOPELLITI; SAVELLONI, 2015; BARTER; RYE, 2016). Os potenciais efeitos adversos das estatinas estão relacionados à miopatia e elevação de enzimas hepáticas. Para pacientes que não podem usar estatinas, é indicada a terapia combinada de niacina,

ezetimiba ou colestiramina (WATTS *et al*, 2014; AHN; CHOI, 2015; PATEL; SCOPELLITI; SAVELLONI, 2015; BARTER; RYE, 2016).

Os principais efeitos colaterais da colestiramina relacionam-se ao aparelho digestivo, interferindo na motilidade intestinal e causando constipação e meteorismo, além da exacerbação de hemorroidas preexistentes. O fármaco diminui a absorção de vitaminas lipossolúveis (A, D, K e E) e de ácido fólico, sendo eventualmente necessária a suplementação desses elementos (SANTOS *et al*, 2012; WATTS *et al*, 2014). A ezetimiba tem um mecanismo específico de inibir a absorção do colesterol no enterócito e, portanto, não interfere na absorção de outros agentes. A redução do afluxo de colesterol a partir do intestino para o fígado resulta em aumento compensador da expressão de receptores hepáticos de LDL e aumento da captação das partículas de LDL circulantes (WATTS *et al*, 2014; PATEL; SCOPELLITI; SAVELLONI, 2015; VOGT, 2015; BARTER; RYE, 2016). A niacina reduz o afluxo de ácidos graxos para o fígado e, como consequência, leva a menor produção de VLDL, precursora da LDL, diminuindo assim a concentração destas partículas circulantes. A tolerabilidade é um fator limitante no uso da niacina, mesmo na forma de liberação prolongada, por sua ação em receptores de prostaglandina na derme resultando em vasodilatação intensa e rubor facial ou prurido. Esse efeito colateral motiva aumentos progressivos a cada quatro ou oito semanas até a dose máxima tolerada (PATEL; SCOPELLITI; SAVELLONI, 2015; VOGT, 2015; BARTER; RYE, 2016).

Em geral, nos casos de HF, os tratamentos hipolipemiantes convencionais não são eficazes para reduzir drasticamente as concentrações de colesterol, assim, a LDL deve ser removida de forma intensa do plasma por meio de plasmaférese ou LDL-aférese (GOLBERG *et al*, 2011; WATTS *et al*, 2014; PATEL; SCOPELLITI; SAVELLONI, 2015; VOGT, 2015). O LDL-c aumenta novamente rapidamente nos primeiros dias após a aférese, portanto, ela deve ser repetida regularmente, geralmente, a cada semana ou quinzenalmente (VOGT, 2015). A LDL-aférese é indicada para pacientes que após seis meses de tratamento medicamentoso apresentem os seguintes critérios: pacientes com HF homozigótica com LDL-c > 300 mg/dL (ou não-HDL-c > 330 mg/dL); pacientes com HF heterozigótica com LDL-c > 300 mg/dL (ou não-HDL-c > 330 mg/dL) e com zero ou 1 fator de risco; pacientes com HF heterozigótica com LDL-c > 200 mg/dL (ou não-HDL-c > 230 mg/dL) com dois ou mais fatores de risco ou lipoproteína (a) > 50 mg/dL; pacientes de HF heterozigótica com LDL-c > 160

mg/dL (ou não-HDL-c > 190 mg/dL) com DCV estabelecida e outras doenças cardiovasculares ou diabetes (SANTOS *et al*, 2012). O transplante hepático pode ser alternativo para pacientes com HF homozigóticos refratários ao tratamento farmacológico. Entretanto, deve-se sempre discutir os riscos e os benefícios do procedimento (PATEL; SCOPELLITI; SAVELLONI, 2015).

Para crianças com HF, recomenda-se mudança de estilo de vida (SANTOS *et al*, 2012; McCRINDLE, 2012; WATTS *et al*, 2014). Em crianças com concentrações limítrofes de LDL-c, recomenda-se seis meses de Dieta tipo I: até 30% das calorias de gorduras, até 10% de gorduras saturadas, até 100 mg/kcal de colesterol, no máximo 300 mg/dL. Para crianças com LDL-c acima de 130 mg/dL, a dieta deve ser mais restrita, tipo II: até 20% das calorias de gorduras, até 7% de gorduras saturadas, até 60 mg/kcal de colesterol, no máximo 200 mg/dL (SANTOS *et al*, 2012). Após mudança de estilo de vida, a terapia hipolipemiante pode ser iniciada em crianças com mais de dois anos de idade, salvo casos graves e com avaliação individualizada. O tratamento tem como objetivo alcançar a meta de concentração de 110 mg/dL de LDL-c, ou no mínimo 130 mg/dL, e reduzir xantomatose, diminuir o risco de pancreatite e prevenir o aparecimento de DAC (GOLBERG *et al*, 2011; SANTOS *et al*, 2012; McCRINDLE, 2012).

O uso de estatinas diminui significativamente o colesterol total, o LDL-c e a Apo B sem, aparentemente, ocorrência significativa de efeitos adversos relacionados ao desenvolvimento sexual e toxicidade muscular ou hepática, podendo ser utilizada a partir dos oito anos de idade (GOLBERG *et al*, 2011; SANTOS *et al*, 2012; McCRINDLE, 2012; WATTS *et al*, 2014; VOGT, 2015). As estatinas podem diminuir o LDL-c em cerca de 30% e aumentar o HDL-c em 5% e, conseqüentemente, atenuar o espessamento médio-intimal e melhorar a função endotelial. O uso de ezetimibe como monoterapia diminui em cerca de 30% os valores de LDL-c em crianças com HF heterozigótica. Recomenda-se seu uso como monoterapia a partir dos 5 anos e em associação com estatina acima de 8 anos, diminuindo os efeitos colaterais destas (SANTOS *et al*, 2012).

Os sequestradores dos ácidos biliares, como a colestiramina, podem ser utilizados em qualquer idade. Diminuem cerca de 10-15% do LDL-c e podem ser associados com estatinas, em horários de administração diferentes. Pelo risco de desnutrição relacionado às vitaminas lipossolúveis, recomenda-se monitoração nutricional e suplementação destas. A ingestão de 1,6 g/dia de fitoesteróis por

crianças com HF heterozigótica resultou em reduções de 10,2% no LDL-c e 7,4% no CT. Redução semelhante foi observada em adultos após a ingestão diária de 2,5 g de fitoesteróis (MORUISI; OOSTHUIZEN; OPPERMANN, 2006; SANTOS *et al*, 2012).

Vários novos fármacos para diminuir as concentrações lipídicas séricas estão atualmente em desenvolvimento. Fármacos com mecanismo de ação independente do LDL-R tendem a ser mais efetivos no tratamento da HF (AHN; CHOI, 2015; VOGT, 2015).

O mipomersen é um medicamento composto por oligonucleotídeo antissenso (ASO), ou seja, pequenas sequências de nucleotídeos (DNA ou RNA) que se ligam especialmente ao RNA mensageiro e inibem a síntese proteica por interferir na tradução da mensagem carregada por esse último. Essas moléculas inibem a síntese hepática de Apo B100 e, conseqüentemente, reduzem as concentrações plasmáticas de VLDL, LDL e Lp(a) (AHN; CHOI, 2015; PATEL; SCOPELLITI; SAVELLONI, 2015; VOGT, 2015).

Em ensaios clínicos de fase III, o mipomersen reduziu significativamente a concentração sérica de lipoproteínas aterogênicas, incluindo LDL-c (28 e 25%), apoB (26 e 27%) e Lp[a] (21 e 31%) após 26 semanas de tratamento com dose semanal de 200 mg subcutânea de mipomersen (RAAL *et al*, 2010; STEIN *et al*, 2012). O principal efeito colateral do mipomersen é o acúmulo de triglicérides no fígado e aumento das transaminases, devido à diminuição da liberação de triglicérides do fígado à circulação através da VLDL. Os efeitos adversos mais comuns são reações locais à injeção (84%), sintomas de gripe (30%), náuseas (14%) e dor de cabeça (12%) (RAAL *et al*, 2010; STEIN *et al*, 2012; AHN; CHOI, 2015; PATEL; SCOPELLITI; SAVELLONI, 2015; VOGT, 2015). Embora o mipomersen não esteja associado a nenhuma interação conhecida de medicamentos clinicamente relevantes, recomenda-se monitorização de transaminases quando o medicamento é usado concomitantemente com outros medicamentos hepatotóxicos. Os pacientes devem minimizar o consumo de álcool durante o uso de mipomersen devido ao aumento do risco de esteatose hepática (PATEL; SCOPELLITI; SAVELLONI, 2015).

Apesar dos efeitos promissores de redução de lipídeos pelo mipomersen, esse agente foi aprovado pela FDA em 2013 somente para o tratamento de pacientes com HFHo severa (PATEL; SCOPELLITI; SAVELLONI, 2015). O medicamento foi registrado em 2014, no México, Argentina, Coréia do Sul e Peru. A Comissão Europeia (EMA) negou a autorização de comercialização do medicamento na Europa em

2012 e reiterou a negativa em 2013 devido a potencial hepatotoxicidade do medicamento (EMA, 2018; BRASIL, 2016). O medicamento não possui registro de comercialização no Brasil, ou seja, sua eficácia e segurança ainda não foram avaliadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dessa forma, não está disponível para compra ou distribuição no país (BRASIL, 2016).

O lomitapide é um inibidor da proteína de transferência de triglicerídeos microsossomal (MTP), responsável pela transferência de triglicerídeos, fosfolipídeos e éster de colesterol para a Apo B no retículo endoplasmático de hepatócitos e enterócitos, permitindo a formação da VLDL e quilomícrons, respectivamente (CUCHEL *et al.*, 2007; VOGT, 2015). A inibição da MTP leva à diminuição da produção de VLDL e, conseqüentemente, diminuição do LDL-c. Além disto, a inibição da MTP no enterócito leva à diminuição dos triglicerídeos plasmáticos devido a menor absorção das gorduras provenientes da alimentação e que dariam origem aos quilomícrons. Por outro lado, há acúmulo de triglicerídeos no fígado, e por isso uma dieta pobre em gorduras deve ser adotada para evitar esteatose hepática e efeitos gastrointestinais (AHN; CHOI, 2015; PATEL; SCOPELLITI; SAVELLONI, 2015; VOGT, 2015).

Em um estudo com escalonamento de dose, observou-se redução de 51% de LDL-c e de 56% de Apo B, após tratamento com 1,0 mg/kg de lomitapide durante 4 semanas (CUCHEL *et al.*, 2007). Esses efeitos foram semelhantes às 26 semanas de tratamento com dose média de 40 mg de lomitapide por dia (50% da redução de LDL-c) (CUCHEL *et al.*, 2013). O LDL-c foi reduzido em 44% na 56ª semana e 38% na 78ª semana (CUCHEL *et al.*, 2013). Oito de 23 indivíduos atingiram concentrações de LDL-c abaixo de 2,6 mmol/L (100 mg/dL), o alvo recomendado para pacientes com alto risco de DCV e que raramente é alcançado em pacientes com HFHo (CUCHEL *et al.*, 2013). Um único caso atingiu LDL-c abaixo de 1,8 mmol/L (CUCHEL *et al.*, 2013).

A maioria dos eventos adversos do uso de lomitapide foram avaliados de leve a moderados. Conforme previsto pelo seu mecanismo de ação, os efeitos adversos mais comuns foram os distúrbios gastrointestinais (principalmente diarreia, náuseas, vômitos e dispepsia) e problemas hepáticos (CUCHEL *et al.*, 2013; AJUFO, RADER, 2016). A eficácia e a segurança do lomitapide foram confirmadas em um estudo de longa duração (BLOM *et al.*, 2017). Entretanto, o lomitapide foi relacionado com interações medicamentosas envolvendo o CYP3A4, uma enzima da superfamília do citocromo P450, responsável pelo

metabolismo de diversos fármacos (PATEL; SCOPELLITI; SAVELLONI, 2015).

Em dezembro de 2012, o lomitapide obteve aprovação da FDA para uso em adultos com HFHo, com posterior aprovação na Europa (AJUFO, RADER, 2016). O medicamento não possui registro da ANVISA no Brasil.

O alirocumab e o evolocumab são anticorpos monoclonais totalmente humanos e específicos para a PCSK9. Esses medicamentos inativam a pró-proteína, impedindo-a de se ligar ao LDL-R e, assim, aumentam a expressão de LDL-R na superfície dos hepatócitos para promover aumento na absorção do LDL-c circulante e redução subsequente nas concentrações plasmáticas de LDL-c (PATEL; SCOPELLITI; SAVELLONI, 2015).

Após 24 semanas de tratamento com 75 mg quinzenalmente, o alirocumab diminuiu a concentração de LDL-c em 53,2%, comparado com 20,3% com ezemitiba. Ocorreu também diminuição significativa da Apo B (40,8%), Lp (a) (17,7%) e não HDL-c (47,1%), enquanto o HDL-c aumentou 8% após tratamento com alirocumab (ROTH *et al*, 2014).

Reduções significativas no LDL-c ocorreram após duas semanas de tratamento com evolocumab em dose quinzenal (140 mg) ou mensal (420 mg). Após 12 semanas, as concentrações de LDL-c diminuíram em média 57,0% com evolocumab quinzenal em comparação com 0,1% para o placebo ou 17,8 % para ezetimibe. Para os pacientes que receberam dose mensal de evolocumab, a redução média após 12 semanas foi de 56,1% versus 1,3% para o placebo ou 18,6% para ezetimibe (KOREN *et al*, 2014). O evolocumab também diminuiu significativamente a Apo B (47%), Lp (a) (20%) e o não HDL-c (50%). Além disto, observaram-se aumentos significativos de HDL-c com evolocumab (4,5%) (KOREN *et al*, 2014).

As reações no local da injeção, como eritema, prurido, inchaço, descoloração, hematoma e erupções cutâneas, foram os eventos adversos mais comumente relatados em ensaios clínicos com inibidores de PCSK9. A incidência de nasofaringite também foi maior em comparação com o placebo. Aumentos nas enzimas hepáticas e creatina quinase também foram relatados, mas a incidência geral permaneceu baixa e similar à incidência em grupos placebo. Eventos neurocognitivos também foram relatados, mas com prevalência muito baixa e semelhante ao placebo (PATEL; SCOPELLITI; SAVELLONI, 2015).

Em julho de 2015, a FDA aprovou o alirocumab e em agosto de 2015, o evolocumab recebeu aprovação (PATEL; SCOPELLITI; SAVELLONI, 2015). Na Europa, ambos foram aprovados em julho de 2015 (EMA, 2017; EMA, 2017b). O alirocumab foi aprovado pela ANVISA em 2016, e registrado como produto biológico novo, de acordo com a Resolução RDC 55, de 16 de dezembro de 2010. As indicações do medicamento são para adultos com hipercolesterolemia primária (HF heterozigótica ou não familiar) ou dislipidemia mista, como adjuvante à dieta; e para pacientes incapazes de atingir as concentrações ideais de LDL-c com o máximo da dose de estatinas, em combinação à estatina ou à estatina associada a outras terapias hipolipemiantes; ou pacientes intolerantes à estatina, seja como monoterapia ou em associação a outra terapia hipolipemiante (ANVISA, 2017). O evolocumab foi autorizado pela ANVISA em 2016 e também foi registrado como produto biológico novo. No Brasil, o evolocumab é indicado para adultos com hipercolesterolemia primária ou mista, como adjuvante à dieta, em combinação à estatina ou estatina mais outras terapias hipolipemiantes em pacientes incapazes de atingir os níveis de LDL-c com o máximo de dose de estatina; ou isoladamente ou em combinação com outras terapias hipolipemiantes em pacientes intolerantes às estatinas. O produto é ainda indicado para adultos ou adolescentes a partir de 12 anos com HF homozigótica em combinação com outras terapias hipolipemiantes (REPATHA, 2016).

Neste contexto, justifica-se o melhoramento de métodos laboratoriais para uso rotineiro do diagnóstico genético da Hipercolesterolemia Familiar, bem como a ampliação de estudos para a detecção precoce de portadores da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar e aplicar uma metodologia para genotipagem do gene *LDLR* visando o rastreamento genético em cascata de pacientes com hipercolesterolemia familiar (HF).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a extração de DNA de leucócitos e células epiteliais bucais para posterior amplificação e sequenciamento;
- Desenhar iniciadores específicos para amplificação de cada exon do gene *LDLR*;
- Padronizar a amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) dos fragmentos de cada exon do gene *LDLR*;
- Sequenciar os produtos de amplificação dos exons do gene *LDLR*;
- Triar, por meio do perfil lipídico sérico e dados clínicos, indivíduos com suspeita de HF (caso-índice);
- Nos casos índices, realizar a genotipagem para a identificação de mutações no gene *LDLR*;
- De acordo com as mutações identificadas, realizar o rastreamento genético em cascata nos parentes de 1º, 2º e 3º grau dos casos-índices;
- Realizar análises *in silico* para identificar o possível efeito das mutações encontradas no metabolismo lipídico;
- Estratificar o risco cardiovascular de pacientes com diagnóstico genético de HF através de aferição das medidas antropométricas (peso, altura e circunferência abdominal); aferição da pressão arterial e; quantificação dos parâmetros laboratoriais glicose, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, colesterol da fração pequena e densa da LDL (sd-LDL-c), apo B, Lp (a), triglicerídeos, PCR-as, AST, ALT, ureia e creatinina.

4 METODOLOGIA

4.1 CASUÍSTICA

Para este estudo, contamos com a parceria das Secretarias de Saúde dos municípios de Papanduva-SC e de Bom Despacho-MG, que são apoiadas pelas Sociedades de Cardiologia, Endocrinologia e Pediatria, e que identificaram pacientes com suspeita de HF que estavam interessados em ser voluntários para a confirmação do diagnóstico e rastreamento dos familiares. Os municípios de Papanduva-SC e de Bom Despacho-MG foram escolhidos tendo em vista o diagnóstico preliminar de suspeita de pacientes com HF realizado por profissionais médicos. Inicialmente, foram incluídos no estudo todos os indivíduos que demonstraram interesse, sendo excluídos aqueles que não participaram das coletas de sangue ou não responderam os questionários. Para os indivíduos que coletaram amostras biológicas mais de uma vez, foi considerado somente os resultados da primeira coleta. Indivíduos com diagnóstico de síndrome nefrótica ou hipotireoidismo também não foram incluídos. Uma equipe multidisciplinar, composta por médicos, enfermeiros, psicólogos, nutricionistas e educadores físicos, participou da coleta de dados.

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina sob o CAAE 54585416.1.0000.0121 e está cadastrado no Registro Brasileiro de ensaios Clínicos – REBEC (RBR-8HFQSM). Todos os procedimentos realizados estão de acordo com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Todos os indivíduos envolvidos no estudo assinaram, previamente, o Termo de Consentimento Livre, Esclarecido e Revogável ou Termo de Assentimento (no caso de menores, o voluntário e o responsável assinaram o termo de assentimento) (Apêndice I e II).

Os ensaios foram realizados em duas etapas:

- 1) Padronização da genotipagem do gene *LDLR*;
- 2) Análise clínica, bioquímica e genotipagem (conforme padronizado na etapa 1) de pacientes com suspeita de HF e seus familiares.

Para a padronização de todas as etapas da genotipagem (Etapa 1), foram utilizadas uma das seguintes amostras biológicas *i*) sangue periférico de 42 indivíduos, com idade entre 5 e 89 anos, 47,6%

homens, coletado em tubo contendo EDTA para obtenção do DNA genômico a partir de leucócitos ou, alternativamente, *ii) swab* bucal de 42 indivíduos, idade entre 5 e 75 anos, 52,4% homens, para a obtenção de DNA das células da mucosa bucal.

Para as análises bioquímicas da etapa 2, amostras de sangue foram coletadas de indivíduos com suspeita de HF e seus parentes, após jejum de 12-14 h, utilizando-se sistemas a vácuo, em tubos sem anticoagulantes e com EDTA, por profissionais especializados. Os tubos sem anticoagulante foram centrifugados a 750 x g, por 10 min para separação do soro, que foi congelado, assim como o sangue total, a -80 °C para posterior análise observando-se os períodos de estabilidade de cada analito bioquímico descritos nas recomendações dos fabricantes. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Lipídeos, Antioxidantes e Aterosclerose do Departamento de Análises Clínicas da UFSC e no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC.

Para a genotipagem dos pacientes da etapa 2, foram coletados inicialmente *swabs* bucais. Entretanto, como o rendimento da extração de DNA a partir de leucócitos se sangue periférico foi muito superior, a coleta das amostras para genotipagem passou a ser realizada exclusivamente a partir de sangue total com EDTA. As etapas de amplificação gênica, sequenciamento e análise das sequências obtidas foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA), o Laboratório Multiusuário para Estudos em Biologia (LAMEB) e o Laboratório de Bioinformática da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.2 PADRONIZAÇÃO DA GENOTIPAGEM DO GENE *LDLR*

Inicialmente, o ensaio de genotipagem foi idealizado para ser realizado com a utilização de kits comerciais e/ou metodologias descritas na literatura para a extração e amplificação de DNA. Porém, todos os ensaios apresentaram resultados inconsistentes ou de baixo rendimento. Por exemplo, para a extração de DNA utilizando-se colunas NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel GmbH & Co, Duren, Alemanha) e com o volume de sangue preconizado pelo fabricante, obteve-se baixa concentração de DNA. A utilização de volume maior de sangue provocou saturação da coluna sem, contudo, aumentar a concentração de DNA, a qual se mostrou insuficiente para o completo sequenciamento

do *LDLR*. Assim, foram necessárias novas padronizações para o método de genotipagem, as quais estão descritas a seguir.

4.2.1 Padronização da Extração de DNA

O protocolo inicial utilizado para a extração de DNA foi baseado no método descrito por Sambrook e colaboradores (2001) para purificação de DNA total com fenol-clorofórmio e modificado por nós para melhor rendimento conforme descrito a seguir. A liberação do DNA de leucócitos de 200 μL sangue periférico foi realizada pela adição de 800 μL de tampão de lise celular (4:1, v/v) contendo Tris-HCl (10 mM, pH 7,4), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA 25 mM; pH 8,0), dodecilsulfato de sódio 1% (SDS), cloreto de sódio (NaCl 10 mM); e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Proteinase K (PK). A liberação de DNA das células de epitélio bucal foi realizada por procedimento semelhante, porém utilizando um *swab* bucal e 1 mL do tampão de lise. A mistura foi incubada a 42 °C *overnight*, ou a 56 °C durante 2 h, com resultados semelhantes. Posteriormente, foram feitas várias etapas de desnaturação de proteínas celulares na fase orgânica adicionando à solução o mesmo volume de uma mistura de fenol (pH \geq 7,8) e clorofórmio (1:1, v/v), sendo os tubos agitados por inversão durante 10 min. Após centrifugação (10 min, 14.000 x g, 4 °C ou à temperatura ambiente (TA)), a fase aquosa foi transferida para novo microtubo e o procedimento foi repetido com fenol:clorofórmio (1:1, v/v) e, depois, apenas com clorofórmio. Para precipitação do DNA, adicionou-se à fase aquosa isopropanol para concentração final de 70% e a mistura foi mantida a -80 °C por 30 min ou a -20 °C por 1 h. Após centrifugação por 30 min a 14.000 x g, o sobrenadante foi descartado e, para a remoção de sais, o sedimento foi lavado duas vezes com 500 μL de etanol 70% gelado e a mistura foi centrifugada por 10 min a 14.000 x g. A evaporação do álcool foi realizada em estufa a 35 °C. Depois de extraído, o DNA foi hidratado com 100 μL de água livre de nucleases incubado 1 h a 37 °C com 1 μL de RNase (20 mg/mL).

A quantificação do DNA e a verificação da pureza foram realizadas por espectrofotometria a 260, 280 e 230 nm (Nanovue Plus Spectrophotometer, GE Healthcare Life Sciences. Biochrom LTD. Cambridge. England). Esses comprimentos de onda foram utilizados porque os ácidos nucleicos possuem absorção máxima em 260 nm; as proteínas, o grupamento fenol e contaminantes absorvem em 280 nm; enquanto outros contaminantes orgânicos, como ureia, EDTA e

carboidratos, têm absorção máxima em 230 nm. A literatura sugere que os valores ideais das relações 260/280 e 260/230 sejam de aproximadamente 1,8 a 2,0 e 2,0 a 2,2, respectivamente (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

4.2.2 Desenho de iniciadores e amplificação gênica

Para a amplificação do gene *LDLR*, oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos foram desenhados utilizando os softwares Primer Select (DNASTAR Lasergene v. 6.0) e Primer Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). A sequência NG_009060.1 (Homo sapiens low density lipoprotein receptor (*LDLR*), RefSeqGene (LRG_274) on chromosome 19) depositada no NCBI foi utilizada como referência.

O desenho dos iniciadores seguiu algumas diretrizes específicas: *i*) a presença de 40-60% de bases C+G, com uma distribuição homogênea das quatro bases ao longo do iniciador (ex. sem sequências de polipurina ou polipirimidina e sem repetições de dinucleotídeos); *ii*) o comprimento dos iniciadores foi de 18-25 pb e não houve diferença de mais de 3pb em cada par de iniciadores; *iii*) nos iniciadores não houve sequências invertidas repetidas ou sequências autocomplementares maiores que 3pb; *iv*) os iniciadores não eram complementares entre si; a T_m (*melting temperature*) dos iniciadores de um par não variaram mais que 5 °C entre si; *v*) a T_m do produto de amplificação não variou mais que 10 °C da T_m do par de iniciadores; *vi*) e, preferencialmente, a extremidade 3' de cada iniciador finalizava com G ou C.

As regiões de interesse dos genes em estudo foram amplificadas por meio da PCR utilizando-se pelo menos 40 ng do DNA extraído para uma reação de 10 µL; tampão de reação NH₄SO₄; 1,5 mM de MgCl₂; 200 µM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP); 1 µM dos iniciadores específicos (senso e antisenso) e 5 U/µL de DNA polimerase em uma reação com volume final de 10 µL. As reações foram feitas utilizando o termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). As condições de reação foram padronizadas e/ou otimizadas conforme o resultado obtido com cada par de iniciadores.

Os produtos de amplificação obtidos pela PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE (Tris 89 mM; Ácido Bórico 89 mM; 2 mM EDTA), corados com brometo de etídio a 0,5 µg/mL, e utilizando para comparação do tamanho dos produtos o padrão de tamanho molecular de 100 pb *ladder* (Invitrogen, Califórnia,

EUA). As amostras dos produtos amplificadas que apresentaram bandas intensas e do tamanho esperado foram submetidas à purificação para posterior sequenciamento.

4.2.3 Purificação e sequenciamento do DNA

A purificação do DNA amplificado (20 μ L) foi feita utilizando 100 μ L de isopropanol para precipitar o DNA. A solução foi agitada em vórtex e armazenada a -20 °C por 15 a 60 min, dependendo da intensidade da banda. Em seguida, a solução foi centrifugada por 30 min a 14000 x g e o álcool foi descartado. Ao precipitado foram adicionados 100 μ L de etanol 70% para reidratação e eliminação dos sais e a mistura foi agitada em vórtex e centrifugada por 10 min a 14000 x g. O procedimento com etanol 70% foi repetido, o álcool foi descartado e o tubo foi deixado na estufa a 35 °C por 20-30 min para completa evaporação do etanol. O produto purificado foi hidratado com 30 μ L de água livre de nucleases e a qualidade das bandas foi avaliada em gel de agarose 1,5%. A quantificação do DNA e a verificação da pureza foram realizadas novamente por espectrofotometria (Nanovue Plus Spectrophotometer, GE Healthcare Life Sciences. Biochrom LTD. Cambridge, England).

Os produtos amplificadas foram sequenciados em equipamento Hitachi 3500 Genetic Analyzer (AB Applied Biosystems®, Foster City/EUA), sendo utilizado o Kit BigDye® Terminator (AB Applied Biosystems®), de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram realizadas na presença dos iniciadores senso e antissenso específicos de cada produto de PCR, em reações separadas, nas seguintes condições: desnaturação a 96 °C por 60 s seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 15 s; ligação dos iniciadores a 50 °C por 15 s e extensão a 60 °C por 240 s. Posteriormente, os produtos marcados foram precipitados utilizando etanol/EDTA para a retirada dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados. Os produtos purificados foram ressuspensos em 10 μ L de formamida e eletroinjetados. A montagem dos *contigs* e a análise da qualidade foram realizados por meio do pacote Phred/Phrap/Consed (<http://www.phrap.org>). A confirmação da identidade dos fragmentos foi realizada utilizando o algoritmo BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) e o software *BioEdit* *Sequence* *Alignment* *Editor* (www.bioedit.software.informer.com). As mutações foram descritas numerando-se os nucleotídeos com base no cDNA, sendo o nucleotídeo

1 a adenina do códon ATG de iniciação. A sequência de referência NM_000527.4 foi utilizada para o gene *LDLR*. A qualidade da sequência foi avaliada através do valor de Phred, um indicador em escala logarítmica relacionado à probabilidade de erro no nucleotídeo identificado. Valores Phred 10 indica uma chance de erro em 10 nucleotídeos, ou 90% de certeza; Phred 20 indica uma chance de erro em 100, ou 99%; Phred de 30 indica uma chance de erro em 1000 nucleotídeos, ou 99,9%, e assim por diante.

Os bancos de dados The Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) e Leiden Open Variation Database (LOVD) (www.ucl.ac.uk/ldlr/LOVDv.1.1.0/) foram utilizados para identificar se as mutações encontradas foram descritas previamente e se foram relacionadas com a HF. As variantes do *LDLR* foram avaliadas por ferramentas de predição de mutação *in silico* como PolyPhen2 (*Polymorphism Phenotyping*, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), *Sorting Intolerant From Tolerant* (SIFT, <http://provean.jcvi.org/>) e *Mutation Taster* (www.mutationtaster.org). As variáveis avaliadas como provavelmente patogênicas ou causadoras de doenças pelas ferramentas de predição foram posteriormente avaliadas seguindo os padrões e diretrizes da *American College of Medical Genetics* (ACMG) (RICHARDS, *et al.*). A frequência de mutação foi avaliada no banco de dados do *Exome Aggregation Consortium* (ExAC) (<http://exac.broadinstitute.org/gene/ENSG00000130164>).

4.3 ANÁLISES LABORATORIAIS E CLÍNICAS

4.3.1 Análises bioquímicas

Os conjuntos de reagentes para as determinações de CT, HDL-c, LDL-c, TG, glicose, ureia, creatinina, AST e ALT, foram obtidos da empresa Siemens (*Siemens Healthcare Diagnostic Inc* - EUA) e as análises bioquímicas foram realizadas em equipamento automatizado *Dimension* (Siemens Healthcare Diagnostics Products GMBH - Alemanha).

A concentração sérica de CT, triglicerídeos e glicose foi determinada pelo método colorimétrico de ponto final utilizando a reação enzimática de Trinder. O HDL-c e o LDL-c foram determinados por métodos homogêneo. A fração pequena e densa da LDL (sd-LDL) foi determinada após a precipitação seletiva das demais lipoproteínas

com heparina e cloreto de magnésio, conforme procedimento descrito por Hirano *et al.* (2003) e modificado por Cavalcante e Silva (2012). A quantificação do sd-LDL-colesterol foi feita através do método LDL-c homogêneo. O não-HDL-colesterol foi estimado pela diferença entre o CT e o HDL-c [Não-HDL-c = CT – HDL-c].

A concentração sérica de ureia e creatinina foi determinada por método colorimétrico e de ponto final. A atividade das enzimas aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT) foi determinada através de método cinético.

As concentrações de PCR-as, apolipoproteína B e Lp(a) foram avaliadas por imunonefelometria utilizando anticorpos monoclonais específicos. O procedimento foi realizado no aparelho automatizado Nefelômetro Behring BN II (Siemens Healthcare Diagnostics Products GMBH - Alemanha), com conjunto de reagentes *Siemens Healthcare Diagnostic Inc* - EUA.

4.3.2 Análise antropométrica e aferição da pressão arterial

Foram aferidos o peso (kg) e a altura (m) em equipamento constituído de balança e estadiômetro (Welmy, São Paulo-SP, Brazil). Para a aferição do peso corporal, os voluntários estavam descalços e vestindo roupas leves, permanecendo de pé sobre a balança, com os pés unidos, o peso igualmente distribuído em ambos os pés e os braços estendidos ao lado do corpo. Para a aferição da altura, os voluntários permaneceram de pé no centro da balança, com os braços estendidos ao lado do corpo, com a cabeça erguida e livre de adereços e olhando para um ponto fixo na altura dos olhos. As pernas estavam paralelas e formando um ângulo reto com os pés. Idealmente, com os calcanhares encostados, as panturrilhas, os glúteos, as escápulas e parte posterior da cabeça (região do occipital) no estadiômetro. A régua foi posicionada até o ponto mais alto da cabeça com pressão suficiente para comprimir o cabelo (BRASIL, 2011). O índice de massa corporal (IMC) foi estimado segundo a equação [peso (kg)/altura ao quadrado (m²)] e a estratificação foi feita com base nas curvas de crescimento para a determinação do percentil de IMC por idade em crianças (CDC, 2002; GIULIANO *et al.*, 2005) ou nos valores estabelecidos pela OMS nos adultos, sendo considerado sobrepeso $IMC \geq 25$ e obesidade $IMC \geq 30$ (WHO, 2014).

A medida da circunferência da cintura (CC) foi realizada com o voluntário de pé, ao final da expiração, no ponto médio entre o último

arco costal e a crista ilíaca superior utilizando fita métrica inelástica (BRASIL, 2011).

A aferição da pressão arterial (PA) foi realizada com esfigmomanômetro e manguito, após repouso de 5 min e, preferencialmente, no braço direito. Os valores da PA foram estratificados conforme o sexo, a idade e o percentil de altura nas crianças (GIULIANO *et al*, 2005) ou nos valores estabelecidos pela OMS nos adultos, definido como hipertensão arterial quando a pressão sistólica e/ou diastólica excede 140/90 mmHg (WHO, 2014).

4.4 RASTREAMENTO EM CASCATA

4.4.1 Diagnóstico do caso-índice

O diagnóstico do caso índice suspeito de HF foi feito de acordo com a descrição na I Diretriz Brasileira de HF (SANTOS *et al*, 2012), com base em:

- Informações pessoais, como sinais, sintomas e histórico familiar (questionário do Apêndice III);
- Histórico de tratamento (questionário do Apêndice III);
- Resultados de parâmetros laboratoriais (coleta de sangue);
- Identificação de prováveis portadores conforme a I Diretriz Brasileira de HF;
- Genotipagem para *LDLR*.

4.4.2 Triagem dos parentes de 1º, 2º ou 3º grau do caso-índice

Após a identificação dos casos-índices, foi feita a triagem dos parentes de 1º, 2º ou 3º grau através de:

- Informações pessoais, como sinais, sintomas e histórico familiar (questionários do Apêndice III);
- Histórico de tratamento (questionários do Apêndice III);
- Resultados de parâmetros laboratoriais (coleta de sangue);
- Identificação de prováveis portadores conforme a I Diretriz Brasileira de HF;
- Genotipagem do gene cuja mutação foi encontrada no caso-índice (coleta de sangue ou *swab* bucal).

4.4.3 Estratificação do risco cardiovascular

Os indivíduos diagnosticados com HF foram submetidos à estratificação de risco e controle clínico realizado por equipe multidisciplinar com:

- Avaliação do tratamento, dieta e tabagismo (questionários);
- Avaliação da atividade física (questionário IPAC);
- Avaliação psicológica (Escala Beck)
- Avaliação antropométrica: peso, estatura e circunferência abdominal, para estabelecimento de obesidade e obesidade abdominal;
- Avaliação clínica: aferição da pressão arterial para identificação de pré-hipertensão e hipertensão arterial;
- Análise laboratorial: colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, triglicerídeos, sd-LDL, AST, ALT, ureia, creatinina, PCR-as, glicose, Apo B e Lp (a).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados quantitativos foram apresentados na forma de média e desvio padrão e os categóricos foram apresentados na forma de valor absoluto e percentual.

Para a análise estatística dos parâmetros analisados, os dados foram, primeiramente, submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados quantitativos sem distribuição Gaussiana foram transformados logaritmicamente e o teste de normalidade foi aplicado novamente. A comparação das concentrações de parâmetros bioquímicos séricos entre indivíduos com e sem mutações e entre as diferentes mutações identificadas foi feita através do teste *t* de Student ou do teste Mann-Whitney para dados com distribuição normal ou não-Gaussiana, respectivamente. O teste de Fisher foi utilizado para a comparação das prevalências. Diferenças com $P \leq 0,05$ foram consideradas significativas. As análises foram realizadas utilizando-se o software *SigmaPlot* v. 12.0 (Systat Software Inc. (SSI), San Jose, Califórnia, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO GENOTÍPICO

5.1.1 Padronização da amplificação gênica

Em 42 amostras de sangue analisadas, o método proposto permitiu a extração de 100 μL de DNA com concentrações variando entre 17,0 e 664,0 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ($72,2 \pm 98,9 \text{ ng}/\mu\text{L}$). Os valores mínimos e máximos para a relação 260/280 foram 1,1 e 1,7 ($1,6 \pm 0,1$), respectivamente, e para 260/230 foram 0,5 e 1,7 ($1,0 \pm 0,4$), respectivamente. Em 42 amostras de *swab* bucal analisadas, o método permitiu extração de concentrações de DNA variando entre 10,3 e 104 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ($42,5 \pm 21,9 \text{ ng}/\mu\text{L}$). Os valores mínimos e máximos para a relação 260/280 foram 1,3 e 1,9 ($1,6 \pm 0,2$) e para 260/230 foram 0,6 e 1,6 ($0,8 \pm 0,2$), respectivamente. O período máximo de armazenamento avaliado foi de 18 meses, a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, apresentando a mesma qualidade de amplificação de amostras frescas. Apesar de a literatura sugerir valores ideais das relações 260/280 e 260/230 maiores que aqueles encontrados no presente estudo, as amostras com relações inferiores (menor grau de pureza) também foram amplificadas com sucesso.

Para a amplificação do DNA foram avaliadas as enzimas Taq DNA polimerase Affymetrix (Affymetrix, Inc., Ohio, EUA); Taq DNA polimerase com sulfato de amônio Fermentas (Thermo Fisher Scientific, San Jose, EUA); Taq DNA polimerase com KCl Fermentas (Thermo Fisher Scientific, San Jose, EUA); Taq Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, San Jose, EUA); Taq DNA polimerase Invitrogen Platinum (Thermo Fisher Scientific, CA, EUA) e Taq DNA polimerase Invitrogen Platinum de alta fidelidade (Thermo Fisher Scientific, CA, EUA).

A amplificação foi padronizada conforme as seguintes condições: desnaturação a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min, seguida por 30 ciclos (40 s a $95 \text{ }^\circ\text{C}$; 40 s na temperatura otimizada para ligação de cada par de iniciador; 40 s na temperatura de extensão da enzima preconizada pelo fabricante) +5 min na temperatura de extensão. O Quadro 2 apresenta as características dos iniciadores desenhados.

A amplificação dos exons 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9-10, 11, 12, 13-14, 15, 16, 17 (hibridização dos iniciadores em $57 \text{ }^\circ\text{C}$) do gene *LDLR* foi feita utilizando a enzima Taq DNA polimerase com Sulfato de Amônio da marca Fermentas (Thermo Scientific, temperatura de extensão $72 \text{ }^\circ\text{C}$). Para a amplificação dos exons 7 (hibridização dos iniciadores em

66 °C ou 68 °C) e 18 (hibridização dos iniciadores em 60 °C) foi necessária a utilização da enzima Taq DNA polimerase de alta fidelidade (Taq DNA polimerase Invitrogen Platinum de alta fidelidade; temperatura de extensão 68 °C). A concentração mínima de 40 ng de DNA, para reação de 10 µL, se mostrou ideal para a amplificação e as concentrações de cada reagente são apresentadas no quadro 3. Sendo assim, para amostras com concentração de DNA > 40 ng/µL, uma única etapa de extração de DNA utilizando 200 µL de sangue total foi suficiente para a amplificação de todos os exons do *LDLR*.

Em 469 purificações realizadas, obteve-se DNA com concentrações variando entre 18,0 e 336,0 ng/µL ($119,2 \pm 60,3$ ng/µL). Os valores mínimos e máximos para a relação 260/280 foram, respectivamente, 1,3 e 2,5 ($1,6 \pm 0,1$) e para a razão 260/230 foram 0,6 e 2,4 ($1,7 \pm 0,3$), respectivamente. Todas as amostras foram amplificadas com sucesso.

Quadro 2 Características dos iniciadores desenhados para a genotipagem do gene *LDLR*.

Exon	Iniciador senso	Iniciador antissenso	Tamanho do produto
1	ACCCAAATACAACAAATCAAGTCG	GGGCTCCCTCTCAACCTATTC	413 bp
2	TTTTCCCATACCCAGAGAGTC	TCATTCTCTCCCCACCTCCTAAT	651 bp
3	CCTCAGTGGGTCTTTCCTTTGAGTGACAG	ACAGGATCACGGGGATCACGACCA	489 bp
4	GCTGGTGTGGGAGACTTCAC	AATCCACTTCGGCACCTAAATC	536 bp
5	CAGTTGGAACCACAGGCTGTACCAC	CAAGTCACTTGCCCACAGACGC	469 bp
6	CTTAATGAATCCATTTGCATGCGTTCTTATGTG	GCAAGCCGCCTGCACCGAGACT	266 bp
7	AACTCCTGGCACCCACCATTTCTACTTTCTGT	CAGAGGGGGCCAGGGCTCAGTC	740 bp
8	GTTGGGTTCCCGTGGTGAATGAT	CCGGTCAGGGGATATGAGTCTGTG	431 bp
9-10	GCCGCACCCTGCAGGATGACACAA	CCCTCTGCAGCCCTCAGCGTCGT	616 bp
11	ITCCAGAATTCGTTGCACGCATTG	CTTCAGGGAGCAGCTTGGGCTTGT	301 bp
12	AGCTGCCTCTCCAGGTGCTTTTCTG	TCTGCGTTCATCTTGGCTTGAGTGA	358 bp
13-14	TGGCCTGTGTCTCATCCCAGTGTTT	GTCAAGCCCCTGTGCTGATGTGTC	653 bp
15	GTCATTTGAGACTTTCGTCATTAGGCG	GCAAAGAGGGCAAGAAGTGTATTAGACC	460 bp
16	GAGTCCTACAACCTCGATAAECTCACAAAT	CCACATCCTCCATCTGACCCCTTA	464 bp
17	GCAAGGCGATCTCTAAACAAACATAAAAG	CCAAGGCCATTGTCCGCTGAC	463 bp
18	GCAGGAGGCTACCAGGCAG	CATTGCATGGGCACTGTCC	458 bp

Quadro 3 Concentração final dos reagentes utilizados na amplificação.

Reagente	Para uso
H ₂ O	QSP 10 µL
Buffer NH ₄ SO ₄	1 x
dNTP	0,2 mM
MgCl ₂ 25mM*	1,5 mM
Taq DNA polimerase	1 U
Primer senso	1 pmol/µL
Primer antissenso	1 pmol/µL
DNA	≥ 40 ng

QSP, quantidade suficiente para. * Substituído por MgSO₄ 50 mM quando utilizada a enzima de alta fidelidade.

Normalmente, o produto de PCR pode ser armazenado a -20 °C para posterior purificação e sequenciamento. O período máximo de armazenamento avaliado foi de 18 meses, apresentando boa qualidade de sequenciamento. A Figura 7 apresenta as bandas representativas de alguns produtos amplificados e purificados. O tamanho dos fragmentos foi estimado em comparação com um padrão de 100 pares de bases.

Figura 7 Eletroforese em gel de agarose 1,5% representativa da amplificação dos exons do gene *LDLR* para cada par de iniciadores desenhado.



Eletroforese em gel de agarose 1.5 % com a apresentação de bandas específicas para cada iniciador. 1, Exon 1; 2, Exon 2; 3, Exon 3; 4, Exon 4; 5, Exon 6; 6, Exon 8; 7, Exons 9 and 10; 8, Exon 11; 9, Exon 12; 10, Exons 13 and 14; 11, Exon 15; 12, Exon 16; 13, Exon 17; 14, padrão de 100 pb .

5.2 RASTREAMENTO EM CASCATA

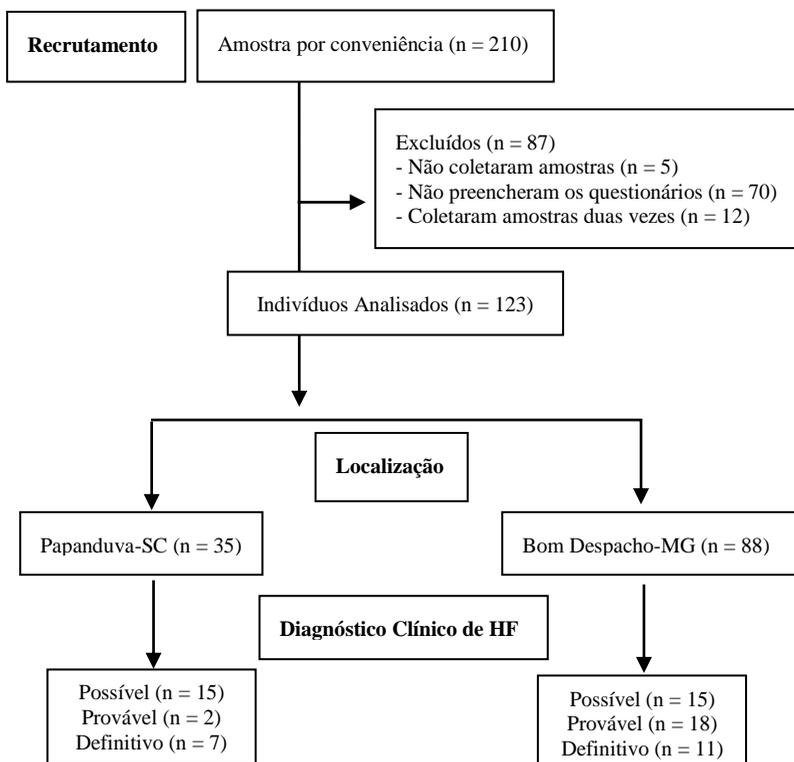
Para a etapa 2, foram recrutados 210 pacientes que demonstraram

interesse em participar do estudo. Foram excluídos cinco indivíduos que não coletaram amostras sanguíneas e/ou *swab* bucal e 70 que não responderam ao termo de consentimento e/ou aos questionários. Ainda, amostras de 12 indivíduos estavam duplicadas e apenas a primeira amostra foi utilizada. Assim, participaram do estudo 123 indivíduos, sendo 35 provenientes de Papanduva-SC (idade mínima 5 e máxima 89 anos; $39,3 \pm 22,9$ anos de idade; 45,7% do sexo feminino) e 88 de Bom Despacho-MG (idade mínima 5 e máxima 82; $34,2 \pm 18,2$ anos de idade; 55,7% do sexo feminino), cujas amostras foram coletadas de maio de 2014 a setembro de 2015.

A genotipagem foi realizada em 68 indivíduos com diagnóstico clínico possível, provável ou definitivo de HF ou, ainda, em 9 indivíduos com diagnóstico clínico ausente mas que tinham forte histórico familiar da doença, pouca idade ou estavam em tratamento com hipolipemiante oral.

A figura 8 apresenta o fluxograma de recrutamento dos indivíduos.

Figura 8 Recrutamento dos voluntários.



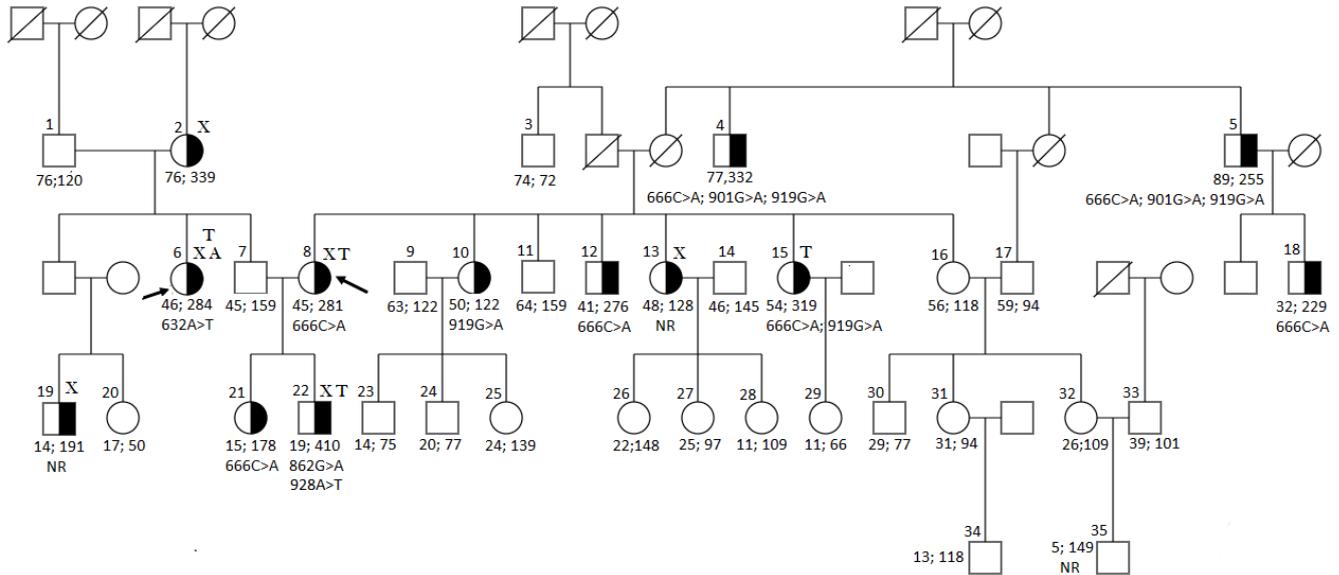
5.2.1 Família de Papanduva-SC

O método de genotipagem aqui descrito foi usado para confirmar o diagnóstico de HF em indivíduos de Papanduva-SC, no sul do Brasil. A Figura 8 mostra o heredograma familiar que apresentou 55 membros, 13 dos quais morreram e sete não participaram da coleta de dados. No total, 35 membros da família foram avaliados, com média de idade de $39,3 \pm 23$ anos, sendo o indivíduo mais jovem com 5 anos e o mais idoso com 89 anos.

O quadro 4 traz os dados de histórico familiar e clínico de cada membro da família. Com base nos resultados, 16 (45,7%) indivíduos relataram ter histórico familiar de parentes de 1º grau portador de doença vascular coronariana prematura; 26 (74,3%) relataram ter parentes adultos com colesterol total acima de 290 mg/dL; 21 (60%) relataram ter parentes com xantomas ou arco corneal e 19 (54,3%) ter parentes menores de 16 anos com CT acima de 260 mg/dL. Apesar do histórico familiar severo, apenas um indivíduo (2,85%) relatou ter doença arterial coronariana prematura e nenhum teve doença arterial cerebral ou periférica prematura.

Dentre o total de 35 indivíduos avaliados em Papanduva-SC, 13 pacientes tiveram o diagnóstico confirmado de HF, considerando o diagnóstico clínico definitivo e/ou diagnóstico genético, conforme detalhado a seguir (Figura 9; Quadro 6).

Figura 9 Heredograma da família de Papanduva-SC.



Os quadrados indicam indivíduos do sexo masculino e os círculos do sexo feminino. Os indivíduos falecidos estão representados com uma faixa diagonal. Os casos índices estão indicados com uma seta. Os indivíduos com diagnóstico clínico e/ou genético para HF estão representados em preto e branco. A numeração indica o código de cada indivíduo que participou do estudo. A idade, concentração de LDL-c e principais mutações identificadas também estão representadas nessa ordem. Os indivíduos com xantomas estão indicados com a letra X, com arco corneal com a letra A e em tratamento com a letra T. NR: indica os indivíduos não genotipados.

Quadro 4 Características do histórico familiar e clínico para o diagnóstico da HF na família de Papanduva-SC.

Indivíduo	Idade (anos)	Histórico Familiar				Histórico Clínico	
		Parente de 1º grau com DAC precoce	Parente adulto de 1º ou 2º grau com CT > 290 mg/dL	Parente de 1º grau com xantoma ou arco corneal	Parente de 1º grau < 16 anos com CT > 260 mg/dL	Portador de DAC prematura	AVC ou Doença arterial periférica prematura
1	76	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
2	76	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
3	74	Não	Não	Não	Não	Não	Não
4	77	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
5	89	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
6	46	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
7	45	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
8	45	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
9	63	Não	Não	Não	Não	Não	Não
10	50	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
11	64	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
12	41	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
13	48	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
14	46	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
15	54	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não

Quadro 4 Continuação

16	56	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
17	59	Não	Não	Não	Não	Não	Não
18	32	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
19	14	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
20	17	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
21	15	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
22	19	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
23	14	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não
24	20	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
25	24	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
26	22	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
27	25	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
28	11	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não
29	11	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não
30	29	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
31	31	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
32	26	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não
33	39	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
34	13	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
35	5	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não

Todos os indivíduos tiveram seu perfil lipídico sérico avaliado. Os valores individuais estão apresentados na Tabela 1. Dentre todos os indivíduos avaliados em Papanduva-SC, 16 (45,7%) apresentavam CT elevado e 17 (48,6%) apresentavam LDL-c acima do desejável, sendo que dez (28,6%) apresentavam concentrações séricas de LDL-c superior a 190 mg/dL, o que pode ser sugestivo de HF. HDL-c baixo foi identificado em nove (25,7%) indivíduos e cinco (14,3%) apresentavam hipertrigliceridemia.

Além disto, seis (17,1%) indivíduos apresentavam xantomas, enquanto apenas um (2,85%) apresentou arco corneal. Considerando as características apresentadas no Quadro 4 e Tabela 1 e o algoritmo para o diagnóstico de HF, 11 (31,4%) indivíduos não apresentavam características de HF, 15 (42,8%) indivíduos apresentavam possível diagnóstico de HF; dois (5,7%) apresentavam diagnóstico provável e sete (20%) apresentavam diagnóstico definitivo de HF.

Tabela 1 Características do perfil lipídico sérico e depósito de colesterol para o diagnóstico de HF na família de Papanduva-SC.

Indivíduo	Idade (anos)	CT (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	N-HDL-c (mg/dL)	LDL-c (mg/dL)	sd-LDL-c (mg/dL)	TG (mg/dL)	Xantomas	Arco corneal	Diagnóstico clínico
1	76	180	41	139	120	35,1	104	Não	Não	Ausente
2	76	447 ^a	29 ^b	418 ^c	339 ^d	253,9 ^e	223 ^f	Mão bilateral	Não	Definitivo
3	74	124	47	77	72	32,8	39	Não	Não	Ausente
4	77	415 ^a	36 ^b	379 ^c	332 ^d	277,7 ^e	252 ^f	Não	Não	Definitivo
5	89	313 ^a	41	272 ^c	255 ^d	173,9 ^e	111	Não	Não	Possível
6	46	331 ^a	36 ^b	295 ^c	284 ^d	235,1 ^e	69	Mão bilateral	Após 45 anos	Definitivo
7	45	229 ^a	32 ^b	197 ^c	159 ^d	110,5 ^e	180 ^f	Não Joelho bilateral/	Não	Possível
8	45	350 ^a	52	298 ^c	281 ^d	162,9 ^e	94	Mão esq.	Não	Definitivo
9	63	185	58	127	122	68,6 ^e	69	Não	Não	Ausente
10	50	177	38 ^b	139	122	90,1 ^e	79	Não	Não	Possível
11	64	227 ^a	52	175 ^c	159 ^d	85,2 ^e	82	Não	Não	Possível

^aCT \geq 200 mg/dL; ^bHDL $<$ 40 mg/dL; ^cn-HDL-c \geq 160 mg/dL; ^dLDL-c \geq 130 mg/dL; ^esd-LDL-c $>$ 50% da LDL-c; ^fTG $>$ 150 mg/dL.

Tabela 1 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	CT (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	N-HDL-c (mg/dL)	LDL-c (mg/dL)	sd-LDL-c (mg/dL)	TG (mg/dL)	Xantomas	Arco corneal	Diagnóstico clínico
12	41	341 ^a	55	286 ^c	276 ^d	93,2	69	Não	Não	Provável
13	48	196	57	139	128	32,1	59	Joelho bilateral	Não	Definitivo
14	46	205 ^a	47	158	145 ^d	54,6	94	Não	Não	Ausente
15	54	388 ^a	39 ^b	349 ^c	319 ^d	148,2	118	Não	Não	Provável
16	56	186	65	121	118	30,9	37	Não	Não	Possível
17	59	194	88	106	94	25,3	31	Não	Não	Ausente
18	32	300 ^a	51	249 ^c	229 ^d	167,9 ^e	66	Não	Não	Possível
19	14	170	78	92	191 ^d	34,7	29	Mão bilateral	Não	Definitivo
20	17	104	55	49	50	20,6	24	Não	Não	Possível
21	15	221 ^a	40	181 ^c	178 ^d	85,2	71	Não	Não	Possível
22	19	460 ^a	28 ^b	432 ^c	410 ^d	347,2 ^e	90	Mão, pé, joelho e tendão de Aquiles bilateral	Não	Definitivo

^aCT \geq 200 mg/dL; ^bHDL $<$ 40 mg/dL; ^cn-HDL-c \geq 160 mg/dL; ^dLDL-c \geq 130 mg/dL; ^esd-LDL-c $>$ 50% da LDL-c; ^fTG $>$ 150 mg/dL.

Tabela 1 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	CT (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	N-HDL-c (mg/dL)	LDL-c (mg/dL)	sd-LDL-c (mg/dL)	TG (mg/dL)	Xantomas	Arco corneal	Diagnóstico clínico
23	14	108	26 ^b	82	75	32,1	60	Não	Não	Possível
24	20	125	44	81	77	40,7 ^e	124	Não	Não	Ausente
25	24	234 ^a	66	168 ^c	139 ^d	97,6 ^e	255 ^f	Não	Não	Ausente
26	22	247 ^a	76	171 ^c	148 ^d	64,4	157 ^f	Não	Não	Possível
27	25	174	67	107	97	38,4	58	Não	Não	Ausente
28	11	193	73	120	109	52,2	104	Não	Não	Possível
29	11	138	66	72	66	27,9	43	Não	Não	Possível
30	29	143	63	80	77	28,6	19	Não	Não	Possível
31	31	154	58	96	94	31,8	37	Não	Não	Possível
32	26	162	45	117	109	25,3	34	Não	Não	Possível
33	39	152	36 ^b	116	101	50,1	104	Não	Não	Ausente
34	13	179	52	127	118	54,6	27	Não	Não	Ausente
35	5	215 ^a	54	161 ^c	149 ^d	48,9	48	Não	Não	Ausente

^aCT ≥ 200 mg/dL; ^b HDL < 40 mg/dL; ^cn-HDL-c ≥ 160 mg/dL; ^dLDL-c ≥ 130 mg/dL; ^esd-LDL-c > 50% da LDL-c; ^fTG >150 mg/dL.

De acordo com os relatos/respostas aos questionários, a análise prévia dos marcadores do perfil lipídico já havia sido realizada em apenas oito (22,8%) indivíduos da família, sendo que sete (20%) tinham conhecimento de ter dislipidemia e um (2,8%) não possuía dislipidemia (Quadro 5). Após as análises realizadas em nosso estudo, identificamos que 10 (28,6%) indivíduos apresentavam dislipidemia, porém, esses indivíduos relataram que nunca haviam realizado a análise do perfil lipídico e, portanto, não tinham conhecimento da alteração metabólica. Assim, no total, 17 indivíduos (59,5%) apresentavam dislipidemia. Apenas quatro indivíduos utilizavam medicação hipolipemiante, 11,4% do total de indivíduos e 26,6% dos dislipidêmicos.

Quadro 5 Histórico de dosagens prévias de parâmetros lipídicos e conhecimento sobre dislipidemia na família de Papanduva-SC.

Indivíduo	Medicação hipolipemiante	Dosagens Prévias de CT	Sabia ter dislipidemia
1	Não	Não	Não
2	Não	Sim	Sim
3	Não	Não	Não
4	Não	Não	Não ^a
5	Não	Não	Não ^a
6	Sinvastatina 40 mg	Sim	Sim
7	Não	Sim	Sim
8	Sinvastatina 80 mg	Sim	Sim
9	Não	Não	Não
10	Não	Não	Não
11	Não	Não	Não ^a
12	Não	Não	Não ^a
13	Não	Não	Não
14	Não	Não	Não ^a
15	Sinvastatina 80 mg	Sim	Sim
16	Não	Não	Não
17	Não	Não	Não
18	Não	Não	Não ^a

^a Diagnosticado com dislipidemia durante o estudo.

Quadro 5 Continuação

Indivíduo	Medicação hipolipemiante	Dosagens Prévias de CT	Sabia ter dislipidemia
19	Não	Não	Não ^a
20	Não	Não	Não
21	Não	Sim	Sim
22	Atorvastatina 40 mg + Ezetimibe 10 mg	Sim	Sim
23	Não	Não	Não
24	Não	Não	Não
25	Não	Não	Não ^a
26	Não	Não	Não ^a
27	Não	Sim	Não
28	Não	Não	Não
29	Não	Não	Não
30	Não	Não	Não
31	Não	Não	Não
32	Não	Não	Não
33	Não	Não	Não
34	Não	Não	Não
35	Não	Não	Não ^a

^a Diagnosticado com dislipidemia durante o estudo.

Com base no diagnóstico definitivo proveniente do algoritmo descrito no item 1.3.4, e também em sua posição no heredograma, inicialmente dois indivíduos, números 6 e 8, sexo feminino, foram selecionados para fazer a genotipagem completa do gene *LDLR*, ou seja, são os casos índices de Papanduva-SC.

O caso índice número 8, 45 anos, apresentou concentrações séricas de CT de 350 mg/dL, LDL-c 281 mg/dL, não-HDL-c 298 mg/dL, sd-LDL-c 163 mg/dL e sd-LDL-c 58% do LDL-c, indicando um padrão mais aterogênico de lipoproteínas, além de HDL-c de 52 mg/dL, considerado baixo para o sexo e idade. Além disto, a paciente usava uma dose diária de 80 mg de sinvastatina. Não foram observadas alterações nos triglicerídeos, glicose e nos marcadores avaliados da função

hepática e renal. A paciente era hipertensa (150/80 mmHg) e apresentou IMC de 20,8 kg/m² e circunferência da cintura de 72 cm, sendo, portanto, eutrófica e sem obesidade abdominal. Foram observados xantomas bilaterais nos joelhos e na mão esquerda. Além disto, o ultrassom Doppler revelou que 30,8% da artéria carótida esquerda estava obstruída. A paciente era fumante e sedentária e não possuía sintomas significativos de depressão e ansiedade.

Em relação à história familiar, a paciente relatou ter um parente de 1º grau com DAC precoce e um parente de 1º ou 2º grau adulto com CT > 290 mg/dL. Além disto, ela também relatou ter um parente de 1º grau com xantoma ou arco da corneal e um parente de 1º grau com menos de 16 anos com CT > 260 mg/dL, tendo, assim, risco cardiovascular elevado. Apesar disto, ela informou não ser portadora de DAC, doença cerebral ou periférica prematura.

O sequenciamento de todos os exons do *LDLR* do caso índice permitiu a identificação de três mutações nos exons 4, 10 e 12. O padrão anormal do exon 4 foi devido à heterozigose 666C>A, que conduz à mutação *nonsense* C222X. A Figura 10 representa a mutação encontrada. A linha superior representa um fragmento da sequência referência NM_000527.4, a segunda linha representa a sequência de aminoácidos codificados pela sequência de referência e a terceira linha corresponde à sequência analisada, sendo que os pontilhados correspondem à manutenção dos nucleotídeos e o nucleotídeo destacado em vermelho corresponde à mutação identificada. O anexo II apresenta as siglas dos aminoácido do código genético.

No exon 10, a mutação 1413A>G (Figura 11) corresponde ao polimorfismo R471R, enquanto no exon 12, a mutação 1773C>T (Figura 12) corresponde ao polimorfismo N591N.

Figura 10 Fragmento da mutação encontrada na posição 666 do exon 4 do gene *LDLR*.

```
GATGGTGGCCCCGACTGCAAGGACAAATCTGACGAGGAA
AspGlyGlyProAspCysLysAspLysSerAspGluGlu
.....A
```

Substituição não sinônima do nucleotídeo citosina por adenina, envolvendo o aminoácido Cisteína na posição 222 da cadeia proteica, que foi substituído por um códon de terminação. 666C>A ou p.222Cys/Term. Phred 78.

Figura 11 Fragmento da mutação encontrada na posição 1413 do exon 10 do gene *LDLR*.

TATGACACCGTCATCAGCAGAGACATCCAGGCCCCCGAC
 TyrAspThrValIleSerArgAspIleGlnAlaProAsp
G.....

Substituição sinônima do nucleotídeo adenina por guanina, envolvendo o aminoácido arginina na posição 471 da cadeia proteica. 1413A>G ou p.471 Arg/Arg. Phred 90.

Figura 12 Fragmento da mutação encontrada na posição 1773 do exon 12 do gene *LDLR*.

TCAAGCATCGATGTCAACGGGGGCAACCGGAAGACCATC
 SerSerIleAspValAsnGlyGlyAsnArgLysThrIle
T.....

Substituição sinônima do nucleotídeo citosina por timina, envolvendo o aminoácido asparagina na posição 591 da cadeia proteica. 1773A>G ou p.591 Asn/Asn. Phred 86.

A mutação encontrada no exon 4 confirmou o diagnóstico de HF. A análise genômica por rastreamento em cascata foi realizada e essas mutações foram pesquisadas nos parentes do caso índice. Os indivíduos 3, 9, 14 e 33 não foram sequenciados, pois os mesmos não têm laços sanguíneos com a família e não possuem diagnóstico clínico de HF. Os indivíduos 17, 24, 25, 27 e 34 não têm suspeita de apresentar HF verificada pelo algoritmo, conseqüentemente, não foram submetidos à análise genética. Os indivíduos 23, 28, 29, 30, 31 e 32, devido ao histórico familiar, foram classificados como de possíveis diagnósticos de HF, porém, por apresentarem valores normais de LDL-c e CT, não foram submetidos à genotipagem. Além disto, pela classificação no algoritmo definiu-se que o indivíduo 35 não era portador de HF. Entretanto, devido à baixa idade e concentrações já elevadas de LDL-c, optou-se por sequenciar os exons onde foram encontradas mutações na família.

Dentre os parentes de primeiro grau, a genotipagem foi realizada apenas nos filhos do caso índice (indivíduos 21 e 22), considerando que seus pais já faleceram. O indivíduo 21, sexo feminino, apresentava diagnóstico possível de HF de acordo com o algoritmo. Assim como a mãe, ela apresentou a mutação 666C>A, que confirmou o diagnóstico. Entretanto, não foram encontradas as mutações 1413A>G e 1773C>T nessa paciente. No indivíduo 22, não foram encontradas nenhuma das

mutações presentes na mãe. Como este paciente apresentou sinais clínicos da doença (xantomias) e tem o diagnóstico definitivo através do algoritmo, foram pesquisadas as mutações observadas na família paterna. Novamente, não foram encontradas as mutações presentes no pai do indivíduo. Assim, optou-se por fazer o sequenciamento completo do *LDLR*, onde foram identificadas duas mutações não sinônimas no exon 6 que confirmaram o diagnóstico de HF: 862G>A (E288K) e 928A>T (I310F) (Figura 13 e 14). Curiosamente, essas mutações não foram encontradas em nenhum dos parentes deste jovem.

Figura 13 Fragmento da mutação encontrada na posição 862 do exon 6 do gene *LDLR*.

```

TTCAAGTGTACAGCGGCGAATGCATCACCCCTGGACAAA
PheLysCysHisSerGlyGluCysIleThrLeuAspLys
.....A.....

```

Substituição não sinônima do nucleotídeo guanina por adenina, envolvendo a substituição do aminoácido ácido glutâmico por lisina na posição 288 da cadeia proteica. 862G>A. p.288 Glu/Lys. Phred 40.

Figura 14 Fragmento da mutação encontrada na posição 928 do exon 6 do gene *LDLR*.

```

TGCCGGGACTGGTCAGATGAACCCATCAAAGAGTGCGGG
CysArgAspTrpSerAspGluProIleLysGluCysGly
.....T.....

```

Substituição não sinônima do nucleotídeo adenina por timina, envolvendo a substituição do aminoácido isoleucina por fenilalanina posição 310 da cadeia proteica. 928A>T. p.310 Iso/Phe. Phred 19.

O rastreamento genético em cascata foi estendido para os parentes de 2º e 3º grau do caso índice. De acordo com os resultados, a mutação 666C>A foi identificada nos indivíduos 4, 5, 12, 15 e 18, que tiveram o diagnóstico genético confirmado. A mutação 1413A>G foi identificada nos indivíduos 4, 5, 10, 12 e 15. A mutação 1773C>T foi identificada nos indivíduos 11, 12, 15 e 18.

Uma irmã do caso índice com possível diagnóstico clínico de HF (indivíduo 10) apresentou apenas a mutação 1413A>G. Considerando que essa é uma mutação silenciosa e que a paciente apresentou placas ateroscleróticas, outros exons do *LDLR* foram genotipados e a mutação 919G>A (D307N) foi encontrada no exon 6 (Figura 15). Assim, essa mutação confirmou o diagnóstico de FH nesse indivíduo e foi

investigada em todos os parentes, sendo encontrada nos indivíduos 4, 5 e 15.

Figura 15 Fragmento da mutação encontrada na posição 919 do exon 6 do gene *LDLR*.

```
AGAGACTGCCGGGACTGGTCAGATGAACCCATCAAAGAG
ArgAspCysArgAspTrpSerAspGluProIleLysGlu
.....A.....
```

Substituição não sinônima do nucleotídeo guanina por adenina, envolvendo a substituição do aminoácido aspartato por asparagina na posição 307 da cadeia proteica. 919 G>A Asp/Asn p.307. Phred 25.

Além disto, os indivíduos 4 e 5 apresentaram a mutação 901G>A (D301N), no exon 6 (Figura 16).

Figura 16 Fragmento da mutação encontrada na posição 901 do exon 6 do gene *LDLR*.

```
AAAGTCTGCAACATGGCTAGAGACTGCCGGGACTGGTCA
LysValCysAsnMetAlaArgAspCysArgAspTrpSer
.....A.....
```

Substituição do nucleotídeo guanina por adenina, envolvendo a substituição do aminoácido aspartato por asparagina na posição 301 da cadeia proteica. 901 G>A Asp/Asn p.301. Phred 47.

O sequenciamento de genes não foi realizado para o indivíduo 13 devido a dificuldades técnicas para a extração ou amplificação do DNA. Entretanto, as características clínicas e bioquímicas séricas e a história familiar confirmaram o diagnóstico de HF. Uma das filhas dessa paciente (indivíduo 26) apresentou diagnóstico possível de HF, porém, a concentração de LDL-c está dentro do desejável. Pretendia-se realizar a genotipagem, porém, também não foi possível devido a dificuldades técnicas para a extração ou amplificação do DNA. Recomendou-se acompanhar ativamente as concentrações de LDL-c desse indivíduo para um futuro diagnóstico. O mesmo ocorreu para o indivíduo 35. Para todos os outros parentes do caso índice, não foram encontradas mutações no *LDLR*. Destaca-se nesta família a presença de um casamento consanguíneo entre os indivíduos 16 e 17. Entretanto, esses indivíduos não apresentaram o diagnóstico de HF.

O segundo caso índice de Papanduva-SC, representado pelo indivíduo número 6 no heredograma da família, é do sexo feminino e

possui 46 anos e concentrações séricas de CT de 331 mg/dL, LDL-c 284 mg/dL, não-HDL-c 295 mg/dL, sd-LDL-c 235 mg/dL e sd-LDL-c correspondente a 82,7% do LDL-c, indicando um padrão mais aterogênico de lipoproteínas, além de HDL-c, de 36 mg/dL, considerado baixo para o gênero e idade. Além disto, a paciente usa uma dose diária de 40 mg de sinvastatina. Não foram observadas alterações nos triglicerídeos, glicose e nos marcadores avaliados da função hepática e renal. De acordo com a concentração elevada de PCR-as, inflamação subclínica foi identificada. A paciente era hipertensa (160/80 mmHg) e apresentou IMC de 28,6 kg/m² e circunferência da cintura de 87,5 cm, tendo, portanto, sobrepeso e obesidade abdominal. Assim, é portadora de síndrome metabólica, estabelecido pela presença de obesidade abdominal (identificada pela presença da circunferência da cintura elevada) e de pelo menos mais duas das seguintes variáveis: triglicerídeos ≥ 100 mg/dL, HDL-c $< 45,0$ mg/dL, glicose de jejum ≥ 100 mg/dL ou pressão arterial elevada (SPOSITO *et al*, 2007). Foram observados xantomas bilaterais nas mãos e arco corneal por volta dos 45 anos. O ultrassom Doppler revelou que 32,8% da artéria carótida esquerda estava obstruída. A paciente não era tabagista, praticava exercícios de forma moderada e apresentava sintomas de ansiedade e tendência à depressão. A paciente relatou ter histórico familiar de parente adulto de 1° ou 2° grau com CT > 290 mg/dL; parente de 1° grau com xantoma ou arco corneal e parente de 1° grau < 16 anos com CT > 260 mg/dL. Apesar disto, não é portadora de DAC, doença arterial cerebral ou periférica prematura. De acordo com as características apresentadas e seguindo o algoritmo para diagnóstico de HF, a paciente é portadora da doença.

A genotipagem no caso índice permitiu a identificação da mutação 632A>T (H211L; Figura 17), que confirma o diagnóstico de HF. Essa mutação foi pesquisada nos parentes, porém não foi identificada em nenhum deles. A mãe do caso índice (indivíduo 2) possuía o diagnóstico clínico definitivo de HF, porém, apenas a mutação silenciosa 2232A>G foi encontrada no *LDLR*, o que não é suficiente para confirmar o diagnóstico (Figura 18). Assim, a amostra dessa paciente foi analisada através da técnica de *Next Generation Sequence* (NGS), no laboratório de Medicina Vascular Experimental, Departamento de Genética Clínica, seção de Diagnóstico Molecular e Medicina Vascular, no Centro Médico Acadêmico da Universidade de Amsterdam, Holanda. Foram analisados 29 genes relacionados ao metabolismo lipídico, inclusive *APOB* e *PCSK9* e, curiosamente,

nenhuma mutação foi encontrada. O irmão do caso índice (indivíduo 7), possuía diagnóstico clínico possível de HF, e a análise genética do *LDLR* não confirmou o diagnóstico. Os sobrinhos desse caso índice, indivíduos 19 e 20, possuíam o diagnóstico clínico definitivo e possível de HF, respectivamente. Porém, devido à falta de material genético suficiente, a genotipagem não pôde ser realizada em todos os exons. Outros sobrinhos, indivíduos 21 e 22, tiveram o diagnóstico genético confirmado por outras mutações, sendo que a mutação 632A>T não foi identificada.

Figura 17 Fragmento da mutação encontrada na posição 632 do exon 4 do gene *LDLR*.

```

LAGTGGCGAGTGCATCCACTCCAGCTGGCGTGTGAT
iSerGlyGluCysIleHisSerSerTrpArgCysAsp
.....T.....

```

Substituição não sinônima do nucleotídeo adenina por timina, envolvendo o aminoácido histidina na posição 394 da cadeia proteica, que foi substituído por leucina. 632 A>T; His/Leu p. 211. Phred 21.

Figura 18 Fragmento da mutação encontrada na posição 2332 do exon 15 do gene *LDLR*.

```

CAGCACACAACCCACCCGACCTGTTCCCGACACCTCCCGG
GlnHisThrThrThrArgProValProAspThrSerArg
.....G.....

```

Substituição sinônima do nucleotídeo adenina por guanina, envolvendo o aminoácido arginina na posição 2232 da cadeia proteica. 2232 A>G; Arg/Arg p. 744. Phred 90.

O Quadro 6 indica as diferenças entre os diagnósticos clínico e genético, além das mutações encontradas em cada indivíduo. Dentre os indivíduos genotipados, sete apresentavam o diagnóstico clínico de HF, porém, um deles não apresentou nenhuma mutação no *LDLR* e dois não foram genotipados. Dois indivíduos possuíam diagnóstico clínico provável de HF, e ambos foram confirmados por genotipagem. Por fim, dentre 15 indivíduos com o diagnóstico clínico possível, quatro confirmaram o diagnóstico HF, três não confirmaram e oito não foram genotipados por falta de evidências clínicas da doença.

Quadro 6 Diferenças entre o diagnóstico clínico e genético, e mutações encontradas em cada indivíduo.

Indivíduo	Diagnóstico clínico	Diagnóstico genético	Mutações
1	Ausente	Ausente	-
2	Definitivo	Ausente	2232A>G
3	Ausente	-	-
4	Definitivo	Definitivo	666C>A; 901G>A; 919G>A; 1413A>G
5	Possível	Definitivo	666C>A; 901G>A; 919G>A 1413A>G
6	Definitivo	Definitivo	632A>T
7	Possível	Ausente	-
8	Definitivo	Definitivo	666C>A; 1413A>G; 1773C>T
9	Ausente	-	-
10	Possível	Definitivo	919G>A; 1413A>G
11	Possível	Ausente	1773C>T
12	Provável	Definitivo	666C>A; 1773C>T 1413A>G
13	Definitivo	NR	-
14	Ausente	-	-
15	Provável	Definitivo	666C>A; 919G>A; 1413A>G; 1773C>T
16	Possível	Ausente	-
17	Ausente	-	-
18	Possível	Definitivo	666C>A; 1773C>T
19	Definitivo	NR	-
20	Possível	NR	-
21	Possível	Definitivo	666C>A
22	Definitivo	Definitivo	862 G>A; 928A>T
23	Possível	-	-
24	Ausente	-	-
25	Ausente	-	-
26	Possível	NR	-

Quadro 6 Continuação

Indivíduo	Diagnóstico clínico	Diagnóstico genético	Mutações
27	Ausente	-	-
28	Possível	-	-
29	Possível	-	-
30	Possível	-	-
31	Possível	-	-
32	Possível	-	-
33	Ausente	-	-
34	Ausente	-	-
35	Ausente	NR	-

NR: Não foi realizada a genotipagem por a dificuldades técnicas para a extração ou amplificação do DNA.

5.2.1.1 Avaliação bioquímica e clínica dos pacientes de Papanduva-SC

A Tabela 2 apresenta os valores séricos de glicose de jejum, de função hepática e renal e de marcador inflamatório dos indivíduos avaliados em Papanduva-SC. Do total, cinco indivíduos (14,5%) apresentaram valores de glicose de jejum alterados, sendo que apenas um indivíduo era suspeito de ser diabético, e este não possuía diagnóstico de HF.

Em relação à função hepática, o indivíduo 2, com diagnóstico clínico de HF confirmado, apresentou atividade das enzimas AST e ALT levemente elevadas. O indivíduo 35, um caso com diagnóstico clínico e genético ausente de HF e com apenas cinco anos de idade, apresentou os valores de AST e ALT elevados, indicando uma possível lesão hepática. A concentração de ureia esteve levemente elevada no indivíduo 4, com diagnóstico clínico e genético definitivo de HF. Nenhum indivíduo apresentou creatinina elevada. Inflamação subclínica foi identificada em 15 (42,8%) indivíduos, sendo que cinco (33,3%) tiveram o diagnóstico de HF confirmado. Nove (25,7%) indivíduos apresentaram valores elevados de Apo B, sendo que todos apresentavam diagnóstico de HF. Nenhum indivíduo apresentou Lp(a) elevada.

Tabela 2 Características bioquímicas séricas dos membros avaliados da família de Papanduva-SC.

Indivíduo	Idade (anos)	Glicose (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	PCR-as (mg/L)	ApoB (mg/dL)	Lp (a) (mg/dL)
1	76	143 ^a	28	27	32	1,03	5,09 ^f	91	3,74
2	76	107 ^b	40 ^c	51 ^d	29	0,73	1,49 ^f	251 ^g	3,13
3	74	84	27	12	41	1,13	3,59 ^f	-	-
4	77	79	21	21	48 ^e	1,13	2,51 ^f	265 ^g	3,66
5	89	85	27	14	30	1,03	6,21 ^f	172 ^g	3,80
6	46	93	19	15	22	0,63	4,2 ^f	203 ^g	4,44
7	45	107 ^b	33	31	25	0,83	0,34	140	2,53
8	45	84	17	24	21	0,83	0,39	181 ^g	3,33
9	63	116 ^b	24	24	28	1,03	0,18	-	-
10	50	91	21	17	20	0,83	0,17	91	2,53
11	64	95	20	22	33	1,13	0,36	115	2,71
12	41	87	25	22	29	0,93	0,17	173 ^g	5,95
13	48	97	19	19	22	0,83	1,41 ^f	88	2,53

^a Suspeita de diabetes mellitus (>126 mg/dL); ^b Pré-diabetes (100-126 mg/dL); ^cAST elevada (10-47 (U/L) de 4 a 6 anos e 11-39 em adultos); ^d ALT elevada (24-49 (U/L) 4 a 11 anos e 11-45 em adultos); ^e ureia elevada (8-36 mg/dL entre 8 e 13 anos e 15-45 mg/dL em adultos); ^f PCR-as acima do desejável (> 1 mg/L); ^g Apo B acima do desejável (> 174 mg/dL em homens; > 142 mg/dL em mulheres).

Tabela 2 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	Glicose (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	PCR-as (mg/L)	ApoB (mg/dL)	Lp (a) (mg/dL)
14	46	88	35	27	44	1,03	7,3 ^f	-	-
15	54	96	23	26	27	0,73	0,98	158 ^g	3,74
16	56	90	18	20	30	0,83	0,17	-	-
17	59	92	30	23	21	0,73	0,32	-	-
18	32	95	26	47	26	0,83	3,04	152 ^g	3,89
19	14	88	20	21	32	0,83	0,17	34	2,53
20	17	78	22	14	25	0,53	0,17	61	11,8
21	15	78	19	14	25	0,63	0,26	116	2,53
22	19	71	29	21	33	0,73	0,67	272 ^g	3,39
23	14	109 ^b	16	17	24	0,83	4,2 ^f	-	-
24	20	77	32	25	35	1,13	2,54 ^f	-	-
25	24	74	15	12	15	0,43	1,89 ^f	123	2,68
26	22	84	27	22	20	0,83	2,81 ^f	113	2,53
27	25	88	13	18	26	0,83	0,78	-	-
28	11	95	24	14	18	0,53	0,17	-	-

^a Suspeita de diabetes mellitus (>126 mg/dL); ^b Pré-diabetes (100-126 mg/dL); ^cAST elevada (10-47 (U/L) de 4 a 6 anos e 11-39 em adultos); ^d ALT elevada (24-49 (U/L) 4 a 11 anos e 11-45 em adultos); ^e ureia elevada (8-36 mg/dL entre 8 e 13 anos e 15-45 mg/dL em adultos); ^f PCR-as acima do desejável (> 1 mg/L); ^g Apo B acima do desejável (> 174 mg/dL em homens; > 142 mg/dL em mulheres).

Tabela 2 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	Glicose (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	PCR-as (mg/L)	ApoB (mg/dL)	Lp (a) (mg/dL)
29	11	90	31	17	21	0,73	0,17	-	-
30	29	83	17	13	34	1,13	0,17	-	-
31	31	77	18	29	26	0,73	1,07 ^f	-	-
32	26	86	24	23	30	0,73	1,57 ^f	-	-
33	39	91	17	16	27	0,93	0,29	-	-
34	13	88	24	15	27	0,53	1,55 ^f	85	2,53
35	5	69	90 ^c	128 ^d	22	0,43	0,17	96	2,53

^a Suspeita de diabetes mellitus (>126 mg/dL); ^b Pré-diabetes (100-126 mg/dL); ^cAST elevada (10-47 (U/L) de 4 a 6 anos e 11-39 em adultos); ^d ALT elevada (24-49 (U/L) 4 a 11 anos e 11-45 em adultos); ^e ureia elevada (8-36 mg/dL entre 8 e 13 anos e 15-45 mg/dL em adultos); ^f PCR-as acima do desejável (> 1 mg/L); ^g Apo B acima do desejável (> 174 mg/dL em homens; > 142 mg/dL em mulheres).

Em Papanduva-SC, cinco indivíduos (14,3%) apresentaram sobrepeso, sendo três (60,0%) com diagnóstico de HF (Tabela 3). A obesidade abdominal também foi identificada em três (8,6%) indivíduos, sendo dois (66,6%) destes com diagnóstico de HF confirmado (Tabela 3). Hipertensão arterial foi identificada em 17 indivíduos (45,6%), sendo que sete (41,2%) tiveram o diagnóstico de HF confirmado. Apenas um indivíduo apresentou esteatose, e esse não teve o diagnóstico de HF confirmado. Placas ateroscleróticas foram identificadas em 15 indivíduos (42,8%), sendo sete (46,6%) com presença de placas em ambos os lados e nove (60,0%) com o diagnóstico de HF confirmado.

Tabela 3 Características clínicas dos indivíduos estudados da família de Papanduva-SC.

Indivíduo	Idade (anos)	IMC (kg/m ²)	CC (cm)	PS (mmHg)	PD (mmHg)	Esteatose	Placa Ateroscl.	Obstrução da CD (%)	Obstrução da CE (%)
1	76	28,7 ^a	102 ^b	180 ^c	110 ^c	Difusa	Sim	42,2	29,9
2	76	29,1 ^a	98 ^b	160 ^c	100 ^c	Ausente	Sim	38,2	46,9
3	74	18,5	73	160 ^c	80	-	Não	0	0
4	77	19,1	73,1	200 ^c	110 ^c	Ausente	Sim	51	69,9
5	89	18,2	77	170 ^c	110 ^c	-	Não	0	0
6	46	28,6 ^a	87,5 ^b	160 ^c	80	Ausente	Sim	0	32,8
7	45	24,5	88	140 ^c	100 ^c	Ausente	Não	0	0
8	45	20,8	72	150 ^c	80	Ausente	Sim	0	30,8
9	63	24,7	90,1	170 ^c	90	Ausente	Sim	16,5	20,9
10	50	20,2	68	170 ^c	100 ^c	Ausente	Sim	0	15,7
11	64	21,4	82	160 ^c	90	Ausente	Sim	14,0	18,5
12	41	18,9	73,5	150 ^c	90	Ausente	Sim	40,3	0
13	48	21,9	79	120	80	Ausente	Sim	19,3	0
14	46	25,7 ^a	86	130	80	Ausente	Sim	15,2	0
15	54	19,2	69	120	80	Ausente	Sim	54,3	33,9

IMC: índice de massa corporal; CC: Circunferência da cintura; PS: pressão sistólica; PD: pressão diastólica; CD: Carótida Direita; CE: Carótida Esquerda. ^a Sobrepeso (IMC entre 25-29,99); ^b Obesidade abdominal (CC \geq 94 em homens e \geq 80 em mulheres); ^c Hipertensão.

Tabela 3 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	IMC (kg/m ²)	CC (cm)	PS (mmHg)	PD (mmHg)	Esteatose	Placa Ateroscl.	Obstrução da CD (%)	Obstrução da CE (%)
16	56	19,3	70,5	170 ^c	100 ^c	Ausente	Sim	33,9	0
17	59	21,5	82,5	150 ^c	100 ^c	Ausente	Sim	23,8	54,5
18	32	25,4 ^a	87	124	78	Ausente	Não	0	0
19	14	18,8	69,8	120	80	Ausente	Não	0	0
20	17	18,0	63,5	120	70	Ausente	Não	0	0
21	15	19,4	64,2	110	70	Ausente	Não	0	0
22	19	20,9	78,0	120	80	Ausente	Sim	0	22,1
23	14	19,2	74,0	140 ^c	80	Ausente	Não	0	0
24	20	22,0	75,0	130	90	Ausente	Não	0	0
25	24	28,5	Gestante	140 ^c	100	Ausente	Não	0	0
26	22	22,0	65,0	140 ^c	100	Ausente	Não	0	0
27	25	19,2	64,5	110	70	Ausente	Não	0	0
28	11	22,5	56,0	106	70	Ausente	Não	0	0
29	11	14,2	53,5	110	70	Ausente	Não	0	0
30	29	19,5	74,0	130	80	Ausente	Não	0	0

IMC: índice de massa corporal; CC: Circunferência da cintura; PS: pressão sistólica; PD: pressão diastólica; CD: Carótida Direita; CE: Carótida Esquerda. ^a Sobrepeso (IMC entre 25-29,99); ^b Obesidade abdominal (CC \geq 94 em homens e \geq 80 em mulheres); ^c Hipertensão.

Tabela 3 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	IMC (kg/m²)	CC (cm)	PS (mmHg)	PD (mmHg)	Esteatose	Placa Ateroscl.	Obstrução da CD (%)	Obstrução da CE (%)
31	31	20,2	70,5	110	70	Ausente	Não	0	0
32	26	19,3	68,5	110	70	Ausente	Não	0	0
33	39	20,4	73,3	120	80	Ausente	Não	0	0
34	13	17,1	66,0	110	60	Ausente	Não	0	0
35	5	15,3	52,5	104	68	Ausente	Não	0	0

IMC: índice de massa corporal; CC: Circunferência da cintura; PS: pressão sistólica; PD: pressão diastólica; CD: Carótida Direita; CE: Carótida Esquerda. ^a Sobrepeso (IMC entre 25-29,99); ^b Obesidade abdominal (CC \geq 94 em homens e \geq 80 em mulheres); ^c Hipertensão.

Do total de indivíduos da família de Papanduva-SC, 19 eram tabagistas (54,3%), sendo sete (36,8%) com diagnóstico genético de HF. Observou-se que a maior parte dos membros da 1ª e 2ª geração da família tem baixa escolaridade, com média de $5,1 \pm 3,2$ anos de educação formal. Oito indivíduos (22,8%) realizavam atividade física mínima, dentre eles três (37,5%) têm diagnóstico de HF; 22 (62,9%) realizavam atividade física moderada, sete (31,8%) destes com HF diagnosticada geneticamente; e cinco indivíduos (14,3%) são ativos, um (20,0%) com diagnóstico genético de HF (Apêndice IV).

Sintomas de ansiedade foram identificados em 22 indivíduos (62,8%), sendo que sete (31,8%) possuem diagnóstico genético de HF. Tendência à ansiedade foi identificada em quatro indivíduos (11,4%), nenhum com HF confirmada, e oito indivíduos não apresentavam sintomas (22,8%), quatro (50,0%) destes têm HF. Nove indivíduos apresentavam depressão (25,7%), sendo três (33,3%) com diagnóstico de HF. Tendência à depressão foi observada em sete (20%) indivíduos, três (47,8%) com diagnóstico de HF e 18 (51,5%) não apresentavam sintomas de depressão, seis (33,3%) apresentam HF. Um paciente não participou da avaliação psicológica (2,8%) (Apêndice IV).

5.2.2 Família de Bom Despacho-MG

Na família de Bom Despacho-MG (Família 2), foram avaliados 88 indivíduos, com média de idade de $34,2 \pm 18,2$ anos, sendo o indivíduo mais jovem com 5 anos e o mais idoso com 82 anos.

O quadro 7 traz os dados de histórico familiar e clínico de cada membro da família. Com base nos resultados, 53 (60,2%) indivíduos relataram ter histórico familiar de parentes de 1º grau portador de doença vascular coronariana prematura; 82 (93,2%) relataram ter parentes adultos com colesterol total acima de 290 mg/dL; oito (9,1%) relataram ter parentes com xantomas ou arco corneal e 27 (30,7%) disseram ter parentes menores de 16 anos com CT acima de 260 mg/dL. Nenhum indivíduo relatou ter doença arterial coronariana, cerebral ou periférica prematura.

Quadro 7 Características do histórico familiar e clínico para o diagnóstico da HF na família de Bom Despacho-MG.

Indivíduo	Idade (anos)	Histórico Familiar				Histórico Clínico	
		Parente de 1º grau com DAC precoce	Parente adulto de 1º ou 2º grau com CT > 290 mg/dL	Parente de 1º grau com xantoma ou arco corneal	Parente de 1º grau < 16 anos com CT > 260 mg/dL	Portador de DAC prematura	AVC ou Doença arterial periférica prematura
36	75	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
37	75	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
38	36	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
39	32	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
40	55	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
41	54	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
42	39	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
43	39	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
44	50	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
45	49	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
46	52	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
47	44	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
48	44	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
49	37	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
50	33	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
51	47	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não
52	34	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não

Quadro 7 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	Histórico Familiar				Histórico Clínico	
		Parente de 1º grau com DAC precoce	Parente adulto de 1º ou 2º grau com CT > 290 mg/dL	Parente de 1º grau com xantoma ou arco corneal	Parente de 1º grau < 16 anos com CT > 260 mg/dL	Portador de DAC prematura	AVC ou Doença arterial periférica prematura
53	34	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não
54	7	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
55	9	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
56	28	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
57	31	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
58	9	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não
59	18	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não
60	14	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
61	22	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
62	24	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
63	13	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
64	7	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não
65	10	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não
66	14	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
67	77	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
68	59	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
69	50	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não

Quadro 7 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	Histórico Familiar				Histórico Clínico	
		Parente de 1º grau com DAC precoce	Parente adulto de 1º ou 2º grau com CT > 290 mg/dL	Parente de 1º grau com xantoma ou arco corneal	Parente de 1º grau < 16 anos com CT >260 mg/dL	Portador de DAC prematura	AVC ou Doença arterial periférica prematura
70	41	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
71	53	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
72	55	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
73	54	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
74	19	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
75	24	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
76	19	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
77	23	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
78	23	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
79	27	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
80	33	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
81	28	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
82	49	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
83	57	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
84	43	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
85	60	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
86	42	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não

Quadro 7 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	Histórico Familiar				Histórico Clínico	
		Parente de 1º grau com DAC precoce	Parente adulto de 1º ou 2º grau com CT > 290 mg/dL	Parente de 1º grau com xantoma ou arco corneal	Parente de 1º grau < 16 anos com CT >260 mg/dL	Portador de DAC prematura	AVC ou Doença arterial periférica prematura
87	43	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
88	35	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
89	22	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
90	32	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
91	24	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
92	21	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
93	37	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
94	36	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
95	22	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
96	41	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
97	23	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
98	21	Não	Não	Não	Não	Não	Não
99	15	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
100	11	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
101	28	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
102	32	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
103	10	Não	Sim	Não	Não	Não	Não

Quadro 7 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	Histórico Familiar				Histórico Clínico	
		Parente de 1º grau com DAC precoce	Parente adulto de 1º ou 2º grau com CT > 290 mg/dL	Parente de 1º grau com xantoma ou arco corneal	Parente de 1º grau < 16 anos com CT > 260 mg/dL	Portador de DAC prematura	AVC ou Doença arterial periférica prematura
104	18	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
105	12	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não
106	16	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
107	14	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
108	8	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
109	61	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
110	62	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
111	82	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
112	73	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
113	36	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
114	52	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
115	45	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não
116	45	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
117	25	Não	Não	Não	Não	Não	Não
118	5	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
119	6	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
120	28	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não

Quadro 7 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	Histórico Familiar				Histórico Clínico	
		Parente de 1º grau com DAC precoce	Parente adulto de 1º ou 2º grau com CT > 290 mg/dL	Parente de 1º grau com xantoma ou arco corneal	Parente de 1º grau < 16 anos com CT > 260 mg/dL	Portador de DAC prematura	AVC ou Doença arterial periférica prematura
121	22	Não	Não	Não	Não	Não	Não
122	24	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
123	31	Não	Sim	Não	Não	Não	Não

Todos os indivíduos da família de Bom Despacho-MG tiveram seu perfil lipídico sérico avaliado. Os valores individuais estão apresentados na Tabela 4. Dentre todos os indivíduos da família avaliada, 46 (52,3%) apresentavam CT elevado e 58 (65,9%) apresentavam LDL-c acima do desejável, sendo que 27 (30,7%) apresentavam concentrações séricas de LDL-c superior a 190 mg/dL, o que pode ser sugestivo de HF. HDL-c baixo foi identificado em 19 (21,6%) indivíduos e 15 (17,0%) apresentavam hipertrigliceridemia.

Além disto, 13 (14,8%) indivíduos apresentavam xantomas, enquanto sete (7,9%) apresentaram arco corneal. Considerando as características apresentadas no Quadro 7 e Tabela 4 e o algoritmo para o diagnóstico de HF, 44 (50%) indivíduos não apresentavam características de HF, 15 (17%) indivíduos apresentavam possível diagnóstico de HF; 18 (20,5%) apresentavam diagnóstico provável e 11 (12,5%) possuíam diagnóstico definitivo.

Dentre o total de 88 indivíduos avaliados em Bom Despacho-MG, 40 pacientes tiveram o diagnóstico confirmado de HF, considerando o diagnóstico clínico definitivo e/ou diagnóstico genético, conforme detalhado a seguir (Figuras 21, 27, 29 e 30; Quadro 9).

Tabela 4 Características do perfil lipídico sérico e depósito de colesterol para o diagnóstico de HF na família de Bom Despacho-MG.

Indivíduo	Idade (anos)	CT (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	N-HDL-c (mg/dL)	LDL-c (mg/dL)	sd-LDL-c (mg/dL)	TG (mg/dL)	Xantomas	Arco corneal	Diagnóstico clínico
36	75	380 ^a	34 ^b	346 ^c	305 ^d	285 ^e	185 ^f	N.A	Não	Provável
37	75	155	38 ^b	117	95	58 ^e	140	Cotovelo esquerdo	Antes de 45 anos	Definitivo
38	36	358 ^a	26 ^b	332 ^c	260 ^d	209 ^e	266 ^f	Tendão de Aquiles	Não	Definitivo
39	32	183	46	137	122	60	102	Não	Não	Ausente
40	55	271 ^a	42	229 ^c	214 ^d	162 ^e	109	Não	Não	Possível
41	54	231 ^a	82	149	141 ^d	69	74	Não	Não	Ausente
42	39	149	36	113	97	64 ^e	125	Não	Não	Ausente
43	39	188	47	141	137 ^d	53	61	Tendão de Aquiles	Não	Provável
44	50	260 ^a	36 ^b	224 ^c	193 ^d	159 ^e	221 ^f	Não	Não	Possível
45	49	139	31 ^b	108	91	64 ^e	118	Não	Não	Ausente
46	52	335 ^a	48	287 ^c	265 ^d	182 ^e	151 ^f	Tendão de Aquiles, Joelho Esquerdo	Não	Definitivo

^aCT \geq 200 mg/dL; ^bHDL $<$ 40 mg/dL; ^cn-HDL-c \geq 160 mg/dL; ^dLDL-c \geq 130 mg/dL; ^esd-LDL-c $>$ 50% do LDL-c; ^fTG $>$ 150 mg/dL

Tabela 4 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	CT (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	N-HDL-c (mg/dL)	LDL-c (mg/dL)	sd-LDL-c (mg/dL)	TG (mg/dL)	Xantomas	Arco corneal	Diagnóstico clínico
47	44	385 ^a	39 ^b	346 ^c	316 ^d	270 ^e	172 ^f	Joelho direito, interdigital bilateral	Não	Definitivo
48	44	234 ^a	51	183 ^c	168 ^d	119 ^e	88	Joelho, mão e tendão de aquiles bilateral	Não	Definitivo
49	37	189	39 ^b	150	140 ^d	58	94	Não	Não	Possível
50	33	261 ^a	68	193 ^c	175 ^d	89 ^e	127	Cotovelo esquerdo/ Mão bilateral	Não	Definitivo
51	47	221 ^a	43	178 ^c	160 ^d	94 ^e	115	Não	Não	Possível
52	34	387 ^a	36 ^b	351 ^c	327 ^d	233 ^e	119	Não	Não	Provável
53	34	207 ^a	47	160 ^c	140 ^d	71 ^e	159 ^f	Não	Não	Ausente

^aCT \geq 200 mg/dL; ^bHDL $<$ 40 mg/dL; ^cn-HDL-c \geq 160 mg/dL; ^dLDL-c \geq 130 mg/dL; ^esd-LDL-c $>$ 50% do LDL-c; ^fTG $>$ 150 mg/dL.

Tabela 4 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	CT (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	N-HDL-c (mg/dL)	LDL-c (mg/dL)	sd-LDL-c (mg/dL)	TG (mg/dL)	Xantomas	Arco corneal	Diagnóstico clínico
54	7	334 ^a	39 ^b	295 ^c	286 ^d	259 ^e	63	Interdigital mão direita/ cotovelo esquerdo	Não	Definitivo
55	9	394 ^a	42	352 ^c	329 ^d	209 ^e	129	Não	Não	Provável
56	28	186	45	141	132 ^d	78 ^e	106	Não	Não	Ausente
57	31	179	64	115	109	40	51	Não	Não	Ausente
58	9	270 ^a	51	219 ^c	209 ^d	101	73	Não	Não	Possível
59	18	153	47	106	100	57 ^e	69	Não	Não	Possível
60	14	156	48	108	99	40	62	Não	Não	Ausente
61	22	303 ^a	14 ^b	289 ^c	292 ^d	280 ^e	72	Não	Não	Provável
62	24	300 ^a	53	247 ^c	234 ^d	109	120	Não	Não	Possível
63	13	286 ^a	51	235 ^c	234 ^d	115 ^e	107	Não	Não	Possível
64	7	190	49	141	124	30	69	Não	Não	Ausente
65	10	379 ^a	44	335 ^c	332 ^d	135	107	Não	Não	Definitivo
66	14	164	35 ^b	129	119	94 ^e	88	Não	Não	Ausente

^aCT ≥ 200 mg/dL; ^bHDL < 40 mg/dL; ^cn-HDL-c ≥ 160 mg/dL; ^dLDL-c ≥ 130 mg/dL; ^esd-LDL-c > 50% do LDL-c; ^fTG >150 mg/dL.

Tabela 4 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	CT (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	N-HDL-c (mg/dL)	LDL-c (mg/dL)	sd-LDL-c (mg/dL)	TG (mg/dL)	Xantomas	Arco corneal	Diagnóstico clínico
67	77	191	44	147 ^c	140 ^d	104	144	Mão esquerda	Não	Definitivo
68	59	172	45	127	121	64 ^e	64	Não	Não	Ausente
69	50	127	41	56	81	49 ^e	69	Não	Não	Ausente
70	41	191	50	141	128	78 ^e	117	Não	Não	Ausente
71	53	395 ^a	71	324 ^c	318 ^d	270 ^e	159 ^f	Não	Após 45 anos	Provável
72	55	215 ^a	60	155	147 ^d	100 ^e	118	Mão direita	Não	Provável
73	54	286 ^a	58	228 ^c	214 ^d	222 ^e	165 ^f	Não	Não	Provável
74	19	117	37 ^b	80	80	36	35	Não	Não	Ausente
75	24	177	66	111	102	52 ^e	102	Não	Não	Ausente
76	19	211 ^a	84	127	129	55	44	Não	Não	Ausente
77	23	180	44	136	134 ^d	56	78	Não	Não	Possível
78	23	291 ^a	64	227 ^c	223 ^d	73	117	Não	Não	Provável
79	27	221 ^a	53	168 ^c	166 ^d	118 ^e	92	Não	Não	Ausente

^aCT \geq 200 mg/dL; ^bHDL $<$ 40 mg/dL; ^cn-HDL-c \geq 160 mg/dL; ^dLDL-c \geq 130 mg/dL; ^esd-LDL-c $>$ 50% do LDL-c; ^fTG $>$ 150 mg/dL

Tabela 4 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	CT (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	N-HDL-c (mg/dL)	LDL-c (mg/dL)	sd-LDL-c (mg/dL)	TG (mg/dL)	Xantomas	Arco corneal	Diagnóstico clínico
80	33	261 ^a	43	218 ^c	183 ^d	121 ^e	269 ^f	Não	Não	Ausente
81	28	168	53	115	109	53	80	Não	Não	Ausente
82	49	225 ^a	63	162 ^c	165 ^d	117 ^e	96	Não	Não	Possível
83	57	237 ^a	54	183 ^c	177 ^d	147 ^e	147	Não	Não	Possível
84	43	190	49	141	140 ^d	51	62	Não	Não	Ausente
85	60	289 ^a	68	221 ^c	225 ^d	162	93	Não	Não	Possível
86	42	258 ^a	41	217 ^c	228 ^d	172	70	Não	Não	Provável
87	43	214 ^a	42	172 ^c	163 ^d	147 ^e	154 ^f	Não	Antes 45 anos	Provável
88	35	319 ^a	59	260 ^c	270 ^d	112 ^e	51	Não	Não	Provável
89	22	178	48	130	127	66	73	Não	Não	Ausente
90	32	252 ^a	53	199 ^c	191 ^d	104 ^e	125	Não	Não	Provável
91	24	209 ^a	56	153	159 ^d	122 ^e	76	Não	Não	Ausente
92	21	189	37 ^b	152	142 ^d	191 ^e	134	Não	Não	Ausente
93	37	171	49	122	119	51	90	Não	Não	Ausente
94	36	187	44	143	135 ^d	104 ^e	125	Não	Não	Ausente

^aCT \geq 200 mg/dL; ^bHDL $<$ 40 mg/dL; ^cn-HDL-c \geq 160 mg/dL; ^dLDL-c \geq 130 mg/dL; ^esd-LDL-c $>$ 50% do LDL-c; ^fTG $>$ 150 mg/dL

Tabela 4 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	CT (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	N-HDL-c (mg/dL)	LDL-c (mg/dL)	sd-LDL-c (mg/dL)	TG (mg/dL)	Xantomas	Arco corneal	Diagnóstico clínico
95	22	131	55	76	76	35	30	Não	Não	Ausente
96	41	196	46	150	151 ^d	103 ^e	91	Não	Não	Ausente
97	23	198	57	141	133 ^d	42	71	Não	Não	Ausente
98	21	205 ^a	56	149	149 ^d	74	73	Não	Não	Ausente
99	15	254 ^a	46	208 ^c	220 ^d	92	34	Não	Não	Possível
100	11	205 ^a	61	144	146 ^d	70	32	Não	Não	Ausente
101	28	188	49	139	134 ^d	89 ^e	125	Não	Não	Ausente
102	32	227 ^a	42	185 ^c	176 ^d	164 ^e	156 ^f	Não	Não	Ausente
103	10	205	39 ^b	166 ^c	169 ^d	64	100	Não	Não	Ausente
104	18	146	43	103	102	75 ^e	73	Não	Não	Ausente
105	12	143	47	96	98	39	56	Não	Não	Possível
106	16	217 ^a	57	160 ^c	166 ^d	119 ^e	67	Não	Não	Ausente
107	14	182	71	111	115	57	63	Não	Não	Ausente
108	8	175	65	110	110	65 ^e	31	Não	Não	Ausente
109	61	146	34 ^b	112	95	67 ^e	195 ^f	Não	Não	Ausente

^aCT ≥ 200 mg/dL; ^bHDL < 40 mg/dL; ^cn-HDL-c ≥ 160 mg/dL; ^dLDL-c ≥ 130 mg/dL; ^esd-LDL-c > 50% do LDL-c; ^fTG >150 mg/dL

Tabela 4 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	CT (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	N-HDL-c (mg/dL)	LDL-c (mg/dL)	sd-LDL-c (mg/dL)	TG (mg/dL)	Xantomas	Arco corneal	Diagnóstico clínico
110	62	173	55	118	107	56 ^e	165 ^f	Não	Depois dos 45 anos	Possível
111	82	202 ^a	72	130	123	93 ^e	96	Não	Não	Ausente
112	73	273 ^a	44	229 ^c	216 ^d	173 ^e	121	Não	Não	Provável
113	36	304 ^a	40	264 ^c	270 ^d	164 ^e	76	Não	Não	Provável
114	52	196	49	147	146 ^d	72 ^e	71	Não	Não	Ausente
115	45	165	33 ^b	132	115	108 ^e	209 ^f	Não	Antes dos 45 anos	Provável
116	45	235 ^a	67	168 ^c	165 ^d	46	56	Punho (suspeita)	Antes dos 45 anos	Provável
117	25	138	49	89	88	39	50	Cotovelo direito/ tendão de aquiles	Antes 45 anos	Definitivo
118	5	204 ^a	39 ^b	165 ^c	171 ^d	129 ^e	58	Não	Não	Ausente

^aCT ≥ 200 mg/dL; ^bHDL < 40 mg/dL; ^cn-HDL-c ≥ 160 mg/dL; ^dLDL-c ≥ 130 mg/dL; ^esd-LDL-c > 50% do LDL-c; ^fTG >150 mg/dL.

Tabela 4 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	CT (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	N-HDL-c (mg/dL)	LDL-c (mg/dL)	sd-LDL-c (mg/dL)	TG (mg/dL)	Xantomas	Arco corneal	Diagnóstico clínico
119	6	231 ^a	25 ^b	206 ^c	196 ^d	83	83	Punho esquerdo	Não	Definitivo
120	28	112	20 ^b	92	73	62 ^e	266 ^f	Não	Não	Ausente
121	22	198	54	144	138 ^d	132 ^e	146	Não	Não	Ausente
122	24	194	77	117	103	79 ^e	145	Não	Não	Ausente
123	31	303 ^a	72	231 ^c	233 ^d	119 ^e	28	Não	Não	Provável

^aCT \geq 200 mg/dL; ^bHDL $<$ 40 mg/dL; ^cn-HDL-c \geq 160 mg/dL; ^dLDL-c \geq 130 mg/dL; ^esd-LDL-c $>$ 50% do LDL-c; ^fTG $>$ 150 mg/dL.

De acordo com os relatos/respostas aos questionários, a análise prévia dos marcadores do perfil lipídico dos indivíduos da família de Bom Despacho-MG, já havia sido realizada por 54 (61,4%) indivíduos, sendo que 50 (56,8%) tinham conhecimento de ter dislipidemia e quatro (4,5%) não possuíam dislipidemia (Quadro 8). Após as análises realizadas em nosso estudo, não confirmamos a presença de dislipidemia em cinco (5,7%) indivíduos dos 50 que relataram ter a alteração e estavam sem tratamento. Além disto, verificamos que 20 (22,7%) indivíduos apresentavam dislipidemia, porém, esses indivíduos relataram que nunca haviam realizado análise do perfil lipídico e, portanto, não tinham conhecimento da alteração metabólica. Assim, no total, 65 indivíduos (73,9%) apresentavam dislipidemia. Medicação hipolipemiante estava sendo utilizada por 22 indivíduos, correspondendo a 25% do total dos indivíduos e 33,8% dos dislipidêmicos.

Quadro 8 Histórico de dosagens prévias de parâmetros lipídicos e conhecimento sobre dislipidemia da família de Bom Despacho-MG.

Indivíduo	Medicação hipolipemiante	Medidas Prévias de CT	Sabia ter dislipidemia
36	Sinvastatina 20 mg	Sim	Sim
37	Ezetimibe 10 mg e Atorvastatina 20 mg	Sim	Sim
38	Sinvastatina 20 mg	Sim	Sim
39	Não	Sim	Sim
40	Não	Sim	Sim
41	Não	Sim	Sim
42	Não	Sim	Sim
43	Sinvastatina 20 mg	Sim	Sim
44	Não	Sim	Sim
45	Não	Sim	Sim ^a
46	Atorvastatina 20 mg	Sim	Sim
47	Não	Sim	Sim
48	Rosuvastatina 20 mg	Sim	Sim

^a Sem diagnóstico de dislipidemia durante o estudo; ^b Diagnosticado com dislipidemia durante o estudo.

Quadro 8 Continuação

49	Não	Não	Não ^b
50	Não	Sim	Sim
51	Não	Sim	Sim
52	Não	Sim	Sim
53	Não	Não	Não ^b
54	Não	Sim	Sim
55	Não	Sim	Sim
56	Não	Sim	Sim
57	Não	Sim	Sim ^a
58	Não	Não	Não ^b
59	Não	Não	Não
60	Atorvastatina 10mg	Sim	Sim
61	Não	Não	Não ^b
62	Atorvastatina 20 mg	Sim	Sim
63	Não	Sim	Sim
64	Não	Sim	Sim ^a
65	Não	Sim	Sim
66	Não	Sim	Sim ^a
67	Não	Não	Não ^b
68	Não	Não	Não
69	Não	Não	Não
70	Não	Não	Não
71	Sinvastatina 40mg	Sim	Sim
72	Não	Sim	Sim
73	Atorvastatina 80mg	Sim	Sim
74	Não	Não	Não
75	Não	Não	Não
76	Não	Não	Não ^b
77	Não	Sim	Sim
78	Atorvastatina 20mg	Sim	Sim

Quadro 8 Continuação

79	Não	Sim	Não ^b
80	Sinvastatina 40mg	Sim	Sim
81	Não	Sim	Sim ^a
82	Não	Não	Não ^b
83	Não	Não	Não ^b
84	Não	Sim	Sim
85	Sinvastatina 20mg	Sim	Sim
86	Atorvastatina 40mg	Sim	Sim
87	Sinvastatina 40mg	Sim	Sim
88	Não	Não	Não ^b
89	Não	Sim	Não
90	Não	Não	Não ^b
91	Não	Não	Não ^b
92	Não	Não	Não ^b
93	Sinvastatina 20mg	Sim	Sim
94	Não	Não	Não ^b
95	Não	Não	Não
96	Não	Sim	Não ^b
97	Não	Sim	Sim
98	Não	Não	Não ^b
99	Não	Sim	Sim
100	Sinvastatina 10mg	Sim	Sim
101	Não	Não	Não ^b
102	Não	Não	Não ^b
103	Não	Sim	Sim
104	Não	Não	Não
105	Não	Sim	Não
106	Não	Sim	Sim
107	Não	Não	Não
108	Não	Não	Não

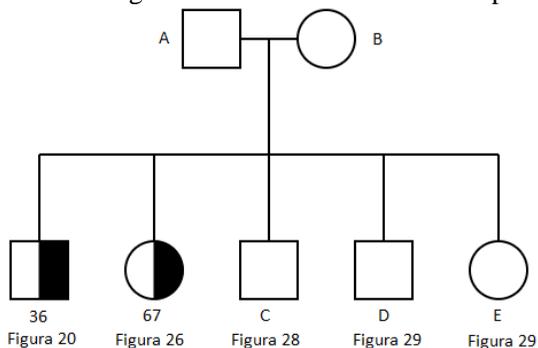
Quadro 8 Continuação

109	Não	Não	Não
110	Sinvastatina 20mg	Sim	Sim
111	Não	Não	Não
112	Sinvastatina 20 mg	Sim	Sim
113	Não	Sim	Sim
114	Não	Não	Não ^b
115	Não	Não	Não
116	Sinvastatina 40mg	Sim	Sim
117	Não	Não	Não
118	Não	Sim	Sim
119	Colestiramina 4g	Sim	Sim
120	Não	Não	Não
121	Não	Não	Não ^b
122	Não	Não	Não
123	Sinvastatina 40mg	Sim	Sim

^a Sem diagnóstico de dislipidemia durante o estudo; ^b Diagnosticado com dislipidemia durante o estudo.

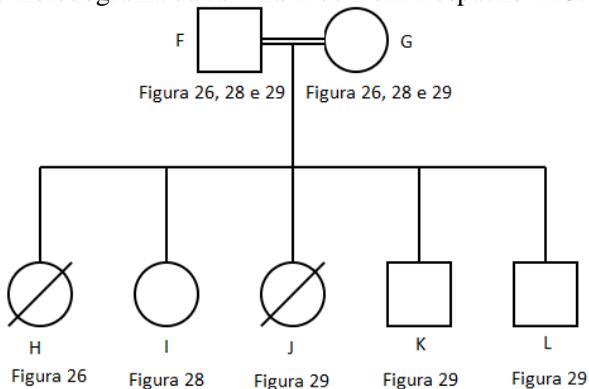
A família de Bom Despacho-MG (Família 2) apresenta uma série de casamentos consanguíneos envolvendo duas famílias principais (Famílias A e B) e, para facilitar o entendimento das relações, os heredogramas das figuras 19 e 20, apresentam as relações familiares desses indivíduos que dão origem aos demais membros da Família 2 e que estão representados nos heredogramas posteriores.

Figura 19 Heredograma da família A de Bom Despacho-MG.



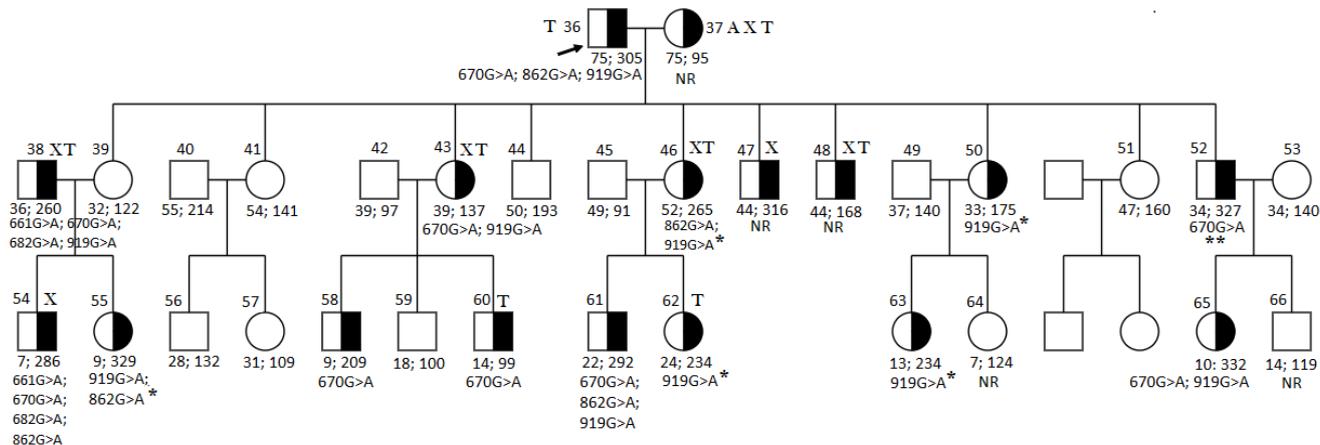
Quadrado: Homens; Círculo: Mulheres; Preto e branco: Diagnóstico definitivo de HF; Letras: Indivíduos não avaliados; Figuras indicam a continuação do heredograma.

Figura 20 Heredograma da família B de Bom Despacho-MG.



Quadrado: Homens; Círculo: Mulheres; Preto e branco: Diagnóstico definitivo de HF; Letras: Indivíduos não avaliados; Linha dupla: casamento consanguíneo; Figuras indicam a continuação do heredograma. Símbolos com traço transversal indicam indivíduos já falecidos.

Para maior compreensão dos resultados dos 88 membros da família 2, a família foi dividida em subfamílias, sendo que cada uma está representada por heredogramas próprios (2A, 2B, 2C e 2D). A Figura 21 apresenta o heredograma da família 2A, que apresenta 34 membros, sendo que três não participaram da coleta de dados.

Figura 21 Heredograma da família 2A de Bom Despacho-MG.

Os quadrados indicam indivíduos do sexo masculino e os círculos do sexo feminino. Os casos índices estão indicados com uma seta. Os indivíduos com diagnóstico clínico e/ou genético para HF estão representados em preto e branco. A numeração indica o código de cada indivíduo que participou do estudo. A idade, concentração de LDL-c e principais mutações identificadas também estão representadas nessa ordem. Os indivíduos com xantomas estão indicados com a letra X, com arco corneal com a letra A e em tratamento com a letra T. NR: a genotipagem não foi realizada. * O exon 4 não foi sequenciado. ** O exon 6 não foi sequenciado.

O indivíduo 36 foi considerado o caso índice da família de Bom Despacho-MG. Esse indivíduo é do sexo masculino, possui 75 anos de idade e apresentou concentrações séricas de CT de 380 mg/dL, LDL-c 305 mg/dL, não-HDL-c 346 mg/dL, sd-LDL-c 285 mg/dL (equivalente a 93% do LDL-c), além de HDL-c de 34 mg/dL, considerado baixo para o sexo e idade, indicando um padrão mais aterogênico de lipoproteínas. Além disto, o indivíduo usava dose diária de 20 mg de sinvastatina. Foram observadas elevações nos triglicerídeos (185 mg/dL) e na glicose 105 mg/dL (pré-diabetes). Os marcadores avaliados da função hepática e renal estavam de acordo com o esperado. O paciente era hipertenso (155/90 mmHg) e apresentou IMC de 30,6 kg/m² e circunferência da cintura de 103,2 cm, sendo, portanto, obeso e com obesidade abdominal. O marcador de inflamação subclínica, PCR-as, estava elevado (6,4 mg/L), assim como a concentração de Apo B (230 mg/L). Além disto, o ultrassom Doppler revelou que 71,6% da artéria carótida direita 74,7% da artéria carótida esquerda estavam obstruídas. Porém, não foram observados xantomas ou arco corneal. O paciente não era fumante, praticava exercícios físicos moderados e tinha tendência à ansiedade, mas não possuía sintomas significativos de depressão.

Em relação à história familiar, o paciente relatou ter parente de 1º grau com DAC precoce e parente de 1º ou 2º grau adulto com CT > 290 mg/dL. Além disto, ele também relatou ter parente de 1º grau com menos de 16 anos com CT > 260 mg/dL, tendo, assim, risco cardiovascular elevado. Apesar disto, ele informou não ser portador de DAC, doença cerebral ou periférica prematura.

O sequenciamento de todos os exons do *LDLR* do caso índice permitiu a identificação de quatro mutações, uma no exon 4, duas no exon 6 e uma no exon 15. O padrão anormal do exon 4 foi devido à heterozigose 670G>A, que conduz à mutação D224N. A Figura 22 representa a mutação encontrada.

Figura 22 Fragmento da mutação encontrada na posição 670 do exon 4 do gene *LDLR*.

```

GGTGGCCCCGACTGCAAGGACAAATCTGACGAGGAAAAC
GlyGlyProAspCysLysAspLysSerAspGluGluAsn
.....A.....

```

Substituição não sinônima do nucleotídeo guanina por adenina, envolvendo a substituição do aminoácido aspartato por asparagina na posição 224 da cadeia proteica. 670G>A ou p.224 Asp/Asn. Phred 67.

No exon 6, a mutação 862G>A (Figura 23) corresponde à substituição E288K, enquanto a mutação 919G>A (Figura 24) corresponde à substituição D307N.

Figura 23 Fragmento da mutação encontrada na posição 862 do exon 6 do gene *LDLR*.

TTCAAGTGTACAGCGGCGAATGCATCACCCCTGGACAAA
PheLysCysHisSerGlyGluCysIleThrLeuAspLys
.....A.....

Substituição não sinônima do nucleotídeo guanina por adenina, envolvendo a substituição do aminoácido ácido glutâmico por lisina na posição 288 da cadeia proteica. 862G>A ou p.288 Glu/Lys. Phred 81.

Figura 24 Fragmento da mutação encontrada na posição 919 do exon 6 do gene *LDLR*.

GACTGCCGGGACTGGTCAGATGAACCCATCAAAGAGTGC
AspCysArgAspTrpSerAspGluProIleLysGluCys
.....A.....

Substituição não sinônima do nucleotídeo guanina por adenina, envolvendo a substituição do aminoácido aspartato por asparagina na posição 307 da cadeia proteica. 919G>A ou p.307 Asp/Asn. Phred 21.

No exon 15, a mutação 2232A>G (Figura 25) corresponde ao polimorfismo R744R.

Figura 25 Fragmento da mutação encontrada na posição 2232 do exon 15 do gene *LDLR*.

CAGCACACAACCACCCGACCTGTTCCCGACACCTCCCGG
GlnHisThrThrThrArgProValProAspThrSerArg
.....G.....

Substituição sinônima do nucleotídeo adenina por guanina, envolvendo o aminoácido arginina na posição 744 da cadeia proteica. 2232A>G ou p.744 Arg/Arg. Phred 71.

Dessa forma, as mutações encontradas no exon 4 e 6 confirmaram o diagnóstico de HF. A análise genômica por rastreamento em cascata foi realizada e essas mutações foram pesquisadas nos parentes do caso índice. Os indivíduos 40, 42, 45, 49 e 53 não foram sequenciados, pois os mesmos não têm laços consanguíneos com a família e não possuem o diagnóstico clínico de HF. Os indivíduos 39, 41, 56, 57, 64 e 66 não foram suspeitos de apresentar HF através do algoritmo e, conseqüentemente, não foram submetidos à análise

genética. Além disto, pela classificação através do algoritmo definiu-se que o indivíduo 60 não era portador de HF. Entretanto, devido a pouca idade, concentrações elevadas de LDL-c, histórico familiar e o fato de o indivíduo estar em tratamento hipolipêmico, optou-se por sequenciar os exons onde foram encontradas mutações na família.

Dentre os parentes de primeiro grau, a genotipagem foi realizada apenas nos filhos do caso índice (indivíduos 43, 44, 46, 50, 51 e 52), considerando que seus pais já faleceram. A genotipagem não foi realizada nos indivíduos 47 e 48, pois estes já possuem o diagnóstico clínico definitivo de HF e não possuem descendentes para realizar o rastreamento em cascata. Os indivíduos 44 e 51 possuíam diagnóstico clínico possível de HF, porém, após a genotipagem, não apresentaram mutações no gene *LDLR* e, assim, o diagnóstico clínico não foi confirmado. A mutação 670G>A foi identificada nos indivíduos 43 e 52, que apresentavam diagnóstico clínico provável de HF e, assim, tiveram o diagnóstico confirmado pela genotipagem. O indivíduo 43 apresentou ainda a mutação 919G>A, que também confirma o diagnóstico e foi identificada nos indivíduos 46 e 50, os quais possuíam o diagnóstico clínico definitivo de HF. O único filho do caso índice que apresentou a mutação 862G>A foi o indivíduo 46.

O rastreamento genético em cascata foi estendido para os netos do caso índice (indivíduos 54 a 66). A genotipagem não foi realizada nos indivíduos 56, 57, 64 e 66, pois esses não apresentavam diagnóstico clínico da doença. Sugere-se acompanhar atentamente os indivíduos 64 e 66, devido a pouca idade e concentrações elevadas de LDL-c. O indivíduo 60, 14 anos, também apresentava o diagnóstico clínico ausente de HF, entretanto, estava em tratamento com hipolipemiante oral e, por isso, optou-se por realizar a genotipagem. Após a genotipagem, foi identificada a mutação 670G>A, a qual também estava presente em seu irmão (indivíduo 58), que possuía o diagnóstico clínico possível de HF. Dessa forma, ambos os irmãos do caso índice tiveram o diagnóstico genético de HF confirmado. A mutação 670G>A também confirmou o diagnóstico de HF em outros três netos do caso índice, sendo que dois deles (indivíduos 54 e 65) possuíam diagnóstico clínico definitivo de HF, e um (indivíduo 61) possuía diagnóstico provável da doença. A mutação 919G>A foi identificada e confirmou o diagnóstico de HF nos indivíduos 55 e 61 (com diagnóstico clínico provável de HF), 62 e 63 (com diagnóstico clínico possível de HF) e 65 (com diagnóstico clínico definitivo de HF). Por fim, a mutação 862G<A foi identificada nos indivíduos 54, 55 e 61. Os irmãos 54 e 55, que apresentavam

diagnóstico clínico definitivo e provável de HF, respectivamente, apresentaram algumas mutações presentes no avô materno, entretanto, o pai desses indivíduos (indivíduo 38) também possuía diagnóstico clínico definitivo de HF e, por isso, foi genotipado. Foram identificadas as mutações 661G>A, 670G>A, 682G>A (Figura 26) e 919 G>A no indivíduo 38. As mutações 661G>A e 682G>A também foram identificadas no filho (indivíduo 54) do indivíduo 38.

Figura 26 Fragmento da mutação encontrada na posição 661G>A, 670G>A e 682G>A do exon 4 do gene *LDLR*.

```
TGTGATGGTGGCCCGACTGCAAGGACAAATCTGACGAGGAAAAC TGC
CysAspGlyGlyProAspCysLysAspLysSerAspGluGluAsnCys
.....A.....A.....A.....
```

Substituição não sinônima do nucleotídeo guanina por adenina, envolvendo a substituição do aminoácido aspartato por asparagina na posição 221 da cadeia proteica (661G>A ou p.221Asp/Asn); aspartato por asparagina na posição 224 (670G>A ou p.224 Asp/Asn) e ácido glutâmico por lisina na posição 228 (682G>A ou p.228Glu/Lys). Phred 50, 67 e 50 respectivamente.

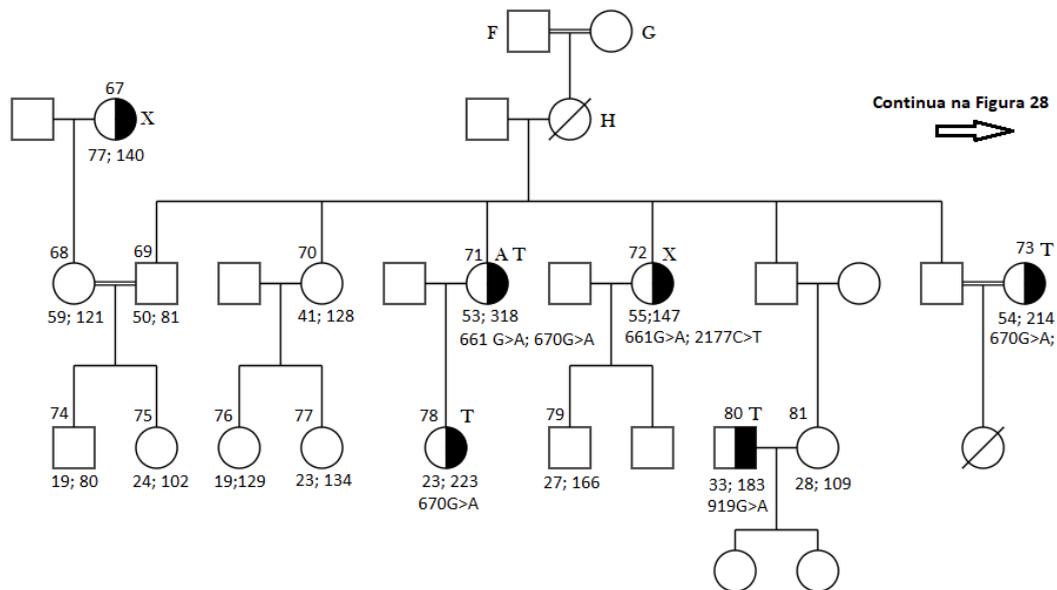
O indivíduo 59, com diagnóstico clínico possível de HF, não teve o diagnóstico confirmado após a genotipagem do *LDLR*.

A mutação 2232A>G foi identificada nos indivíduos 38, 44, 50, 52, 54, 55, 58, 61, 63 e 65. Porém, por ser uma mutação silenciosa, não confirma o diagnóstico de HF. O exon 4 não pôde ser sequenciado nos indivíduos 46, 50, 55, 62, 63 e o exon 6 no indivíduo 52 por ausência de material suficiente. Apesar disto, todos esses indivíduos tiveram o diagnóstico genético de HF confirmado devido à presença de mutações em outros exons do *LDLR*.

Destaca-se que o indivíduo 37, 75 anos, esposa do indivíduo 36 e progenitora desta família, teve o diagnóstico clínico definitivo de HF, porém, não foi possível realizar a genotipagem devido a falta de material genético suficiente. É possível que outras mutações provenientes desse indivíduo também estejam presentes no genoma dos demais integrantes da família.

O rastreamento em cascata foi ampliado para as famílias dos irmãos do indivíduo 36 (Família A de Bom Despacho-MG, representados anteriormente na figura 19). Curiosamente, os irmãos do caso índice (família A) tiveram filhos com indivíduos da família B de Bom Despacho-MG, representada anteriormente na figura 20. Alguns indivíduos relataram relações consanguíneas entre as famílias A e B, embora o exato grau não tenha sido identificado.

A irmã do caso índice, indivíduo 67 (Figura 27), apresenta um diagnóstico clínico definitivo de HF, entretanto, não foi possível realizar a identificação das mutações relacionadas com a doença devido a falta de material genético. Apesar disto, o rastreamento em cascata se estendeu para a sua filha (indivíduo 68) e dois netos (indivíduos 74 e 75) e o resultado foi ausência de diagnóstico clínico de HF, não sendo feita, dessa forma, a genotipagem. O indivíduo 68 relatou ter um relacionamento consanguíneo com o indivíduo 69, que pertence à família B. Esse indivíduo também não possuía diagnóstico clínico de HF, e não foi genotipado.

Figura 27 Heredograma da família 2B Bom Despacho-MG.

Os quadrados indicam indivíduos do sexo masculino e os círculos do sexo feminino. Os indivíduos falecidos estão representados com uma faixa diagonal. Os indivíduos com diagnóstico clínico e/ou genético para HF estão representados em preto e branco. A numeração indica o código de cada indivíduo que participou do estudo. A idade, concentração de LDL-c e principais mutações identificadas também estão representadas nessa ordem. Os indivíduos com xantomas estão indicados com a letra X, com arco corneal com a letra A e em tratamento com a letra T.

Um dos irmãos do indivíduo 69, o indivíduo 70, apresentou diagnóstico clínico ausente de HF, bem como um de seus filhos (indivíduo 76). Outro filho (indivíduo 77) apresentou diagnóstico clínico de HF possível, mas nenhuma mutação no *LDLR* confirmou o diagnóstico da doença.

Outros dois irmãos do indivíduo 69 (indivíduos 71 e 72) possuíam diagnóstico clínico provável de HF, o qual foi confirmado após a genotipagem do *LDLR*. O indivíduo 71 apresentou as mutações 661G>A e 670G>A no exon 4 do *LDLR*, e o indivíduo 72 apresentou a mutação 661G>A, além da mutação 2177C>T, no exon 10 (Figura 28). A mutação 670G>A também confirmou o diagnóstico de HF no indivíduo 78, que possuía o diagnóstico clínico provável de HF e é filho do indivíduo 73. O indivíduo 79, filho do indivíduo 72, apresentou diagnóstico clínico ausente de HF e não foi genotipado.

Figura 28 Fragmento da mutação encontrada na posição 2177C>T do exon 15 do gene *LDLR*.

```

ACCCAGGAGACATCCACCGTCAGGCTAAAGGTCAGCTCC
ThrGlnGluThrSerThrValArgLeuLysValSerSer'
.....T.....

```

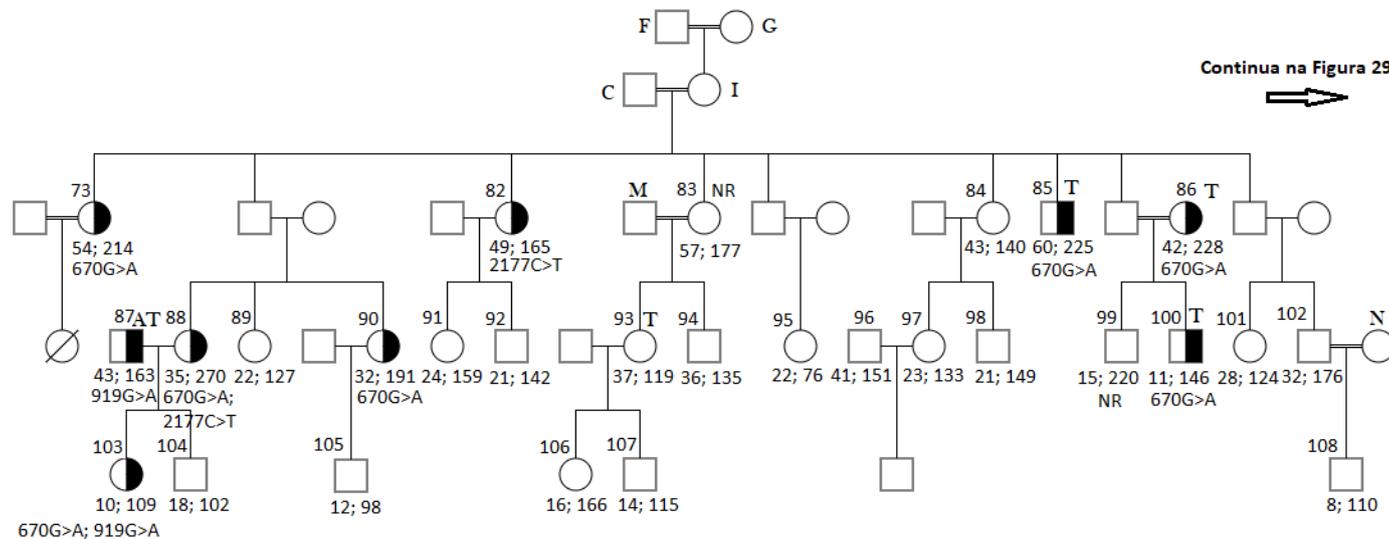
Substituição não sinônima do nucleotídeo citosina por timina, envolvendo a substituição do aminoácido treonina por isoleucina na posição 726 da cadeia proteica. 2177C>T ou p.726 Thr/Ile. Phred 47.

Um irmão do indivíduo 69 não participou do estudo, mas uma filha desse irmão aceitou participar (indivíduo 81). Ela não apresentava sinais da doença e teve o diagnóstico clínico de HF ausente, não sendo, portanto, genotipada. Entretanto, durante o rastreamento dos demais familiares, observou-se que ela se casou com o indivíduo 80, que também apresenta diagnóstico clínico ausente de HF, mas este se encontrava em tratamento com hipolipemiante oral. Ele é irmão do indivíduo 87 (Figura 29), com diagnóstico provável de HF. Dessa forma, optou-se por fazer o sequenciamento do *LDLR* nos irmãos e a mutação 919G>A foi encontrada no exon 6, confirmando o diagnóstico de HF nos dois indivíduos.

Outro irmão do indivíduo 69 que não participou do estudo casou com uma prima (indivíduo 73). Ela possuía diagnóstico clínico provável de HF, que foi confirmado após a genotipagem do *LDLR* através da identificação da mutação 670G>A. Esse casal teve uma filha vítima de DCV precoce, ela era considerada o caso índice da família B de Bom

Despacho-MG e motivou a participação desta família no estudo. Suspeita-se que possa ser um caso homozigoto para a mutação 670G>A. O heredograma com as relações familiares do indivíduo 73 está representado na figura 29. Observa-se que o indivíduo 23, assim como seus irmãos, é fruto de um relacionamento consanguíneo entre o indivíduo C (da família A de Bom Despacho-MG) e o indivíduo I (da família B de Bom Despacho-MG). Os progenitores não participaram do estudo.

Figura 29 Heredograma da família 2C de Bom Despacho-MG.



Os quadrados indicam indivíduos do sexo masculino e os círculos do sexo feminino. Os indivíduos falecidos estão representados com uma faixa diagonal. Os indivíduos com diagnóstico clínico e/ou genético para HF estão representados em preto e branco. A numeração indica o código de cada indivíduo que participou do estudo. A idade, concentração de LDL-c e principais mutações identificadas também estão representadas nessa ordem. Os indivíduos com xantomas estão indicados com a letra X, com arco corneal com a letra A e em tratamento com a letra T.

Dentre os irmãos do indivíduo 73, o indivíduo 85, que possuía o diagnóstico clínico possível de HF, também apresentou a mutação 670G>A. Em outra irmã com o diagnóstico clínico possível de HF (indivíduo 82), devido a falta de material genético, não foi possível sequenciar o exon 6 do *LDLR* visando identificar essa mutação, entretanto, foi verificada a presença da mutação 2177C>T no exon 10, a qual tinha sido encontrada anteriormente em um dos primos (indivíduo 72).

Também devido a falta de material genético, não foi possível realizar a genotipagem no indivíduo 83, que possuía o diagnóstico clínico possível de HF e casou-se com um primo que não participou do estudo (indivíduo M). O rastreamento em cascata de seus filhos (indivíduos 93 e 94) e netos (indivíduos 106 e 107) mostrou diagnóstico clínico ausente de HF e, por isso, eles não foram genotipados.

Um dos irmãos desta família não participou do estudo. Entretanto, três filhas participaram (indivíduos 88, 89 e 90). O indivíduo 89 apresentou diagnóstico clínico ausente de HF e, por isso, não foi genotipado. Os indivíduos 88 e 90 apresentaram o diagnóstico clínico provável de HF e ambos apresentaram a mutação 670G>A, já identificada anteriormente em outros membros da família, confirmando, assim, o diagnóstico de HF. Assim como uma das tias (indivíduo 82), o indivíduo 88 também apresentou a mutação 2177C>T.

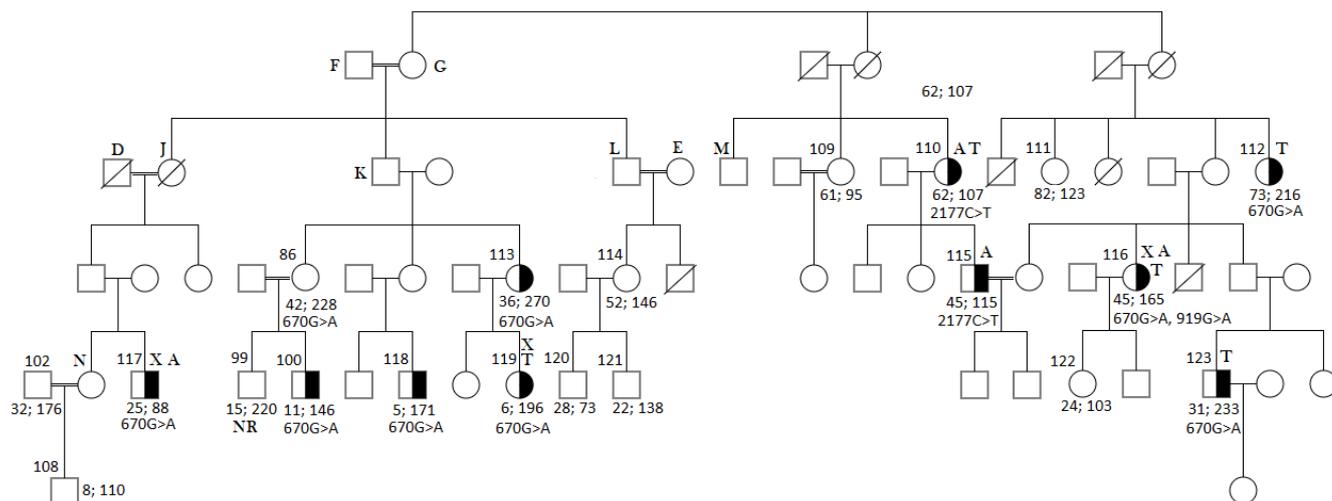
Coincidentemente, o indivíduo 88 se casou com o indivíduo 87, que apresentava o diagnóstico clínico de HF e teve a confirmação do diagnóstico após a identificação da mutação 919G>A no exon 6 do *LDLR*. A mesma mutação foi identificada no seu irmão, o indivíduo 80. Os filhos do casal, indivíduos 103 e 104, apresentaram o diagnóstico clínico ausente de HF, mas devido ao histórico familiar, optou-se por buscar as mesmas mutações presentes na família. As mutações 670G>A (proveniente da família materna) e 919G>A (proveniente da família paterna) foram identificadas no indivíduo 103, de apenas 10 anos de idade, que confirmou o diagnóstico de HF.

O filho do indivíduo 90 (indivíduo 105) apresentava diagnóstico clínico possível de HF, porém, a genotipagem do *LDLR* não confirmou o diagnóstico.

Os filhos do indivíduo 82 (indivíduos 91 e 92) apresentaram diagnóstico clínico ausente de HF e, por isso, não foram genotipados. Também não foram genotipados os indivíduos 84, 95, 96, 97, 98, 101, 102 e 108 por apresentarem diagnóstico clínico ausente de HF.

Um dos irmãos desta família, e que não participou do estudo, casou com uma prima (indivíduo 86), a qual possuía diagnóstico clínico provável de HF e apresentou a mutação 670G>A, confirmando o diagnóstico. Os filhos do casal, indivíduos 99 e 100, que apresentavam diagnóstico clínico possível e ausente de HF, respectivamente, foram genotipados e o indivíduo 100 apresentou a mutação 670G>A, confirmando o diagnóstico de HF. Não foi possível realizar a genotipagem do indivíduo 99 devido à falta de material genético.

Para finalizar o rastreamento em cascata, a figura 30 apresenta os últimos membros da família que participaram do estudo. Nesta figura são apresentados outros três filhos dos indivíduos F e G, bem como duas irmãs do indivíduo G e seus descendentes.

Figura 30 Heredograma da família 2D de Bom Despacho-MG.

Os quadrados indicam indivíduos do sexo masculino e os círculos do sexo feminino. Os indivíduos falecidos estão representados com uma faixa diagonal. Os indivíduos com diagnóstico clínico e/ou genético para HF estão representados em preto e branco. A numeração indica o código de cada indivíduo que participou do estudo. A idade, concentração de LDL-c e principais mutações identificadas também estão representadas nessa ordem. Os indivíduos com xantomas estão indicados com a letra X, com arco corneal com a letra A e em tratamento com a letra T. NR: Não foi possível realizar a genotipagem.

Uma das filhas do casal F-G, indivíduo J, teve um casamento consanguíneo com o indivíduo D (da família A de Bom Despacho-MG). Eles têm dois filhos, que não participaram do estudo, e dois netos (indivíduos N e 117), que foram descritos. O indivíduo 117 apresentou diagnóstico clínico definitivo de HF e foi identificada a mutação 670G>A no exon 4 do *LDLR*.

O indivíduo K não participou do estudo, mas duas de suas filhas (indivíduos 86 e 113) e quatro netos (indivíduos 99, 100, 118 e 119) participaram. Assim como a irmã, o indivíduo 113, que possuía o diagnóstico clínico provável de HF, teve seu diagnóstico confirmado após a identificação da mutação 670G>A. A mesma mutação foi identificada na sua filha (indivíduo 119), que possuía diagnóstico clínico definitivo de HF. Uma das sobrinhas, indivíduo 118, possuía o diagnóstico clínico ausente de HF, porém, devido à idade de cinco anos, optou-se por sequenciar o exon 4 do *LDLR*, e a presença da mutação 670G>A confirmou o diagnóstico de HF nesse indivíduo. Devido a falta de material, não foi possível a genotipagem do indivíduo 99, que possuía diagnóstico clínico possível de HF. Seu irmão, o indivíduo 100, também apresentou a mutação 670G>A.

Outro casamento consanguíneo ocorreu entre os indivíduos L (família B de Bom Despacho) e E (família A de Bom Despacho). Ambos não participaram do estudo, mas uma filha do casal (indivíduo 114) e dois netos (indivíduos 120 e 121) participaram. Os três possuíam diagnóstico clínico ausente de HF e, por isso, não foram genotipados.

Uma irmã do indivíduo G não participou do estudo, mas duas filhas (indivíduos 109 e 110) participaram. O indivíduo 109 apresentava diagnóstico clínico de HF ausente e, por isso, não foi genotipado. O indivíduo 110 possuía o diagnóstico clínico possível de HF e a genotipagem do *LDLR* permitiu a identificação da mutação 2177C>T, confirmando o diagnóstico. A mesma mutação confirmou o diagnóstico de HF no indivíduo 115, que possuía diagnóstico clínico provável de HF.

A segunda irmã do indivíduo G também não participou do estudo, mas duas filhas (indivíduos 111 e 112) participaram. O indivíduo 111 apresentou diagnóstico clínico ausente de HF e não foi genotipado. O indivíduo 112 apresentou diagnóstico clínico provável e a identificação da mutação 670G>A confirmou o diagnóstico de HF nesse indivíduo. Uma irmã dos indivíduos 111 e 112 não participou do estudo, mas a sua filha (indivíduo 116) e um neto (indivíduo 123) participaram.

Ambos apresentaram diagnóstico clínico provável de HF e a identificação da mutação 670G>A confirmou o diagnóstico.

Alguns indivíduos da família de Bom Despacho-MG apresentaram os polimorfismos silenciosos 1413A>G, 1959T>C e 1773C>T (Quadro 9), que não confirmam o diagnóstico HF.

O Quadro 9 indica as diferenças entre os diagnósticos clínico e genético, além das mutações encontradas em cada indivíduo da família de Bom Despacho-MG. Dentre os indivíduos genotipados, 44 apresentaram diagnóstico clínico ausente de HF. Entretanto, cinco desses indivíduos tiveram o diagnóstico genético confirmado. Em três indivíduos com diagnóstico clínico ausente, não foi possível realizar a genotipagem devido a falta de material genético, mas há indicativos de que o diagnóstico clínico possa estar equivocado e recomenda-se acompanhar os pacientes. Dentre 15 indivíduos com diagnóstico clínico possível de HF, cinco não apresentaram mutações no *LDLR*; seis tiveram o diagnóstico confirmado após a genotipagem; dois indivíduos não puderam ser sequenciados por falta de amostra de DNA e optou-se por não sequenciar dois indivíduos, pois não havia fortes indícios de HF. Todos os 18 indivíduos com o diagnóstico clínico provável de HF tiveram o diagnóstico confirmado após a genotipagem do *LDLR*. Dentre 11 indivíduos com diagnóstico clínico definitivo de HF, sete indivíduos apresentaram mutações no *LDLR* indicativas de HF e quatro indivíduos não puderam ser genotipados por falta de amostra.

Quadro 9 Diferenças entre o diagnóstico clínico e genético, e mutações encontradas em cada indivíduo de Bom Despacho-MG.

Indivíduo	Diagnóstico clínico	Diagnóstico genético	Mutações
36	Provável	Definitivo	862G>A, 919G>A, 670G>A, 2232A>G
37	Definitivo	NR	-
38	Definitivo	Definitivo	661G>A, 670G>A, 682G>A, 919G>A, 2232A>G
39	Ausente	NR	-
40	Possível	-	-
41	Ausente	-	-
42	Ausente	-	-
43	Provável	Definitivo	670G>A, 919G>A, 2232A>G
44	Possível	Ausente	2232A>G
45	Ausente	-	-
46	Definitivo	Definitivo	862G>A, 919G>A ^a
47	Definitivo	NR	-
48	Definitivo	NR	-
49	Possível	-	-
50	Definitivo	Definitivo	919G>A, 2232A>G ^a
51	Possível	Ausente	-
52	Provável	Definitivo	670G>A, 2232A>G ^b
53	Ausente	-	-
54	Definitivo	Definitivo	661G>A, 670G>A, 682G>A, 862G>A, 2232A>G
55	Provável	Definitivo	919G>A, 862G>A, 2232A>G ^a
56	Ausente	-	-
57	Ausente	-	-
58	Possível	Definitivo	670G>A, 2232A>G
59	Possível	Ausente	-

NR: Não foi realizada a genotipagem por falta de DNA. ^aNão foi sequenciado o exon 4. ^bNão foi sequenciado o exon 6. ^cNão foi sequenciado o exon 15.

Quadro 9 Continuação

Indivíduo	Diagnóstico clínico	Diagnóstico genético	Mutações
60	Ausente	Definitivo	670G>A
61	Provável	Definitivo	670G>A, 862G>A, 919G>A, 2232A>G
62	Possível	Definitivo	919G>A ^a
63	Possível	Definitivo	919G>, 2232A>G ^a
64	Ausente	NR	-
65	Definitivo	Definitivo	670G>A, 919G>A, 2232A>G
66	Ausente	NR	-
67	Definitivo	NR	
68	Ausente	-	-
69	Ausente	-	-
70	Ausente	-	-
71	Provável	Definitivo	661 G>A, 670G>A, 1413A>G, 1773C>T, 1959T>C
72	Provável	Definitivo	661G>A, 1959T>C, 2177C>T, 2232T>C NR exon 10
73	Provável	Definitivo	670G>A, 1959T>C
74	Ausente	-	-
75	Ausente	-	-
76	Ausente	-	-
77	Possível	Ausente	1959T>C
78	Provável	Definitivo	670G>A, 2232T>C
79	Ausente	-	-
80	Ausente	Definitivo	919G>A, 2232A>G
81	Ausente	-	-
82	Possível	Definitivo	2177C>T ^b
83	Possível	NR	-
84	Ausente	-	-

NR: Não foi realizada a genotipagem por falta de DNA. ^aNão foi sequenciado o exon 4. ^bNão foi sequenciado o exon 6. ^cNão foi sequenciado o exon 15.

Quadro 9 Continuação

Indivíduo	Diagnóstico clínico	Diagnóstico genético	Mutações
85	Possível	Definitivo	670G>A,1959T>C, 2232A>G
86	Provável	Definitivo	670G>A,1959T>C,
87	Provável	Definitivo	919G>A
88	Provável	Definitivo	670G>A, 2177C>T, 2232A>G
89	Ausente	-	-
90	Provável	Definitivo	670G>A ^c
91	Ausente	-	-
92	Ausente	-	-
93	Ausente	-	-
94	Ausente	-	-
95	Ausente	-	-
96	Ausente	-	-
97	Ausente	-	-
98	Ausente	-	-
99	Possível	NR	-
100	Ausente	Definitivo	670G>A, 2232A>G
101	Ausente	-	-
102	Ausente	-	-
103	Ausente	Definitivo	670G>A, 919G>A, 2232A>G
104	Ausente	-	-
105	Possível	Ausente	-
106	Ausente	-	-
107	Ausente	-	-
108	Ausente	-	-
109	Ausente	-	-
110	Possível	Definitivo	1413A>G, 2177C>T
111	Ausente	-	-

NR: Não foi realizada a genotipagem por falta de DNA. ^aNão foi sequenciado o exon 4. ^bNão foi sequenciado o exon 6. ^cNão foi sequenciado o exon 15.

Quadro 9 Continuação

Indivíduo	Diagnóstico clínico	Diagnóstico genético	Mutações
112	Provável	Definitivo	670G>A, 1413A>G, 1959T>C
113	Provável	Definitivo	670G>A, 2232G>A ^b
114	Ausente	-	-
115	Provável	Definitivo	1959T>C, 2177C>T, 2232A>G
116	Provável	Definitivo	670G>A, 919G>A
117	Definitivo	Definitivo	670G>A, 2232A>G
118	Ausente	Definitivo	670G>A, 2232A>G ^b 13_14 NR
119	Definitivo	Definitivo	670G>A, 1413A>G, 2232A>G
120	Ausente	-	-
121	Ausente	-	-
122	Ausente	-	-
123	Provável	Definitivo	670G>A, 1413A>G, 1773C>T, 1959T>C

NR: Não foi realizada a genotipagem por falta de DNA. ^aNão foi sequenciado o exon 4. ^bNão foi sequenciado o exon 6. ^cNão foi sequenciado o exon 15.

5.2.2.1 Avaliação bioquímica e clínica dos pacientes de Bom Despacho-MG

A Tabela 5 apresenta os valores séricos de glicose de jejum, de função hepática e renal e de marcador inflamatório dos 88 indivíduos avaliados na família de Bom Despacho-MG. Do total, seis indivíduos (6,8%) apresentaram valores de glicose de jejum alterados, sendo que apenas dois indivíduos tiveram suspeita de diabetes e esses não possuíam diagnóstico de HF. Os outros quatro indivíduos diagnosticados com glicemia de jejum alterada, tiveram o diagnóstico de HF confirmado.

Em relação à função hepática, 21 (23,9%) indivíduos apresentaram alteração na enzima AST, sendo que desses, nove (42,8%) eram portadores de HF. A atividade da enzima ALT esteve elevada em 15 (%) indivíduos, sendo que cinco (33,3%) tiveram diagnóstico de HF confirmado. Três (3,4%) indivíduos apresentaram concentração elevada

de ureia, sendo que nenhum deles teve diagnóstico definitivo de HF. Nenhum indivíduo apresentou creatinina elevada. Inflamação subclínica foi identificada em 63 (71,6%) indivíduos, sendo que 27 (42,8 %) tiveram o diagnóstico de HF confirmado. A concentração de Apo B foi realizada em 80 (90,9%) indivíduos que apresentavam forte suspeita de serem portadores de HF, sendo que 18 deles (22,5%) apresentaram valores elevados, e todos apresentam posteriormente diagnóstico definitivo de HF. Da mesma forma, a Lp(a) foi quantificada em apenas 40 (45,4%) indivíduos, não sendo indentificadas alterações nas concentrações de Lp(a).

Tabela 5 Características bioquímicas séricas dos membros da família de Bom Despacho-MG.

Indivíduo	Idade (anos)	Glicose (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina ^h (mg/dL)	PCR-as (mg/L)	ApoB (mg/dL)	Lp (a) (mg/dL)
36	75	105 ^b	27	21	39	1,23	6,4 ^f	230 ^g	4
37	75	95	31	37	35	0,93	0,7	74,3	2,53
38	36	101 ^b	19	21	27	0,73	7,0 ^f	233 ^g	4,29
39	32	143 ^a	19	19	24	0,83	3,6 ^f	86,9	2,53
40	55	86	33	27	54 ^e	1,13	9,9 ^f	150	20,6
41	54	93	22	28	26	0,63	0,3	97,5	5,79
42	39	76	32	41	32	0,83	0,6	65,8	2,53
43	39	83	16	21	32	0,63	4,3 ^f	87,9	4,26
44	50	183 ^a	25	34	28	0,83	1,6 ^f	163	2,53
45	49	112	21	15	38	0,83	0,7	77,7	2,53
46	52	90	24	33	26	0,73	0,45	190 ^g	3,54
47	44	90	22	20	25	0,93	1,5 ^f	208 ^g	15,2
48	44	120 ^b	57 ^c	42	32	0,93	1,93 ^f	122	10,5

^a Diabetes mellitus (>126 mg/dL); ^b Pré-diabetes (100-126 mg/dL); ^c AST elevada (10-47 de 4 a 6 anos e 11-39 em adultos); ^d ALT elevada (24-49 4 a 11 anos e 11-45 em adultos); ^e ureia elevada (8-36 mg/dL entre 8 a 13 anos e 15-45 mg/dL em adultos); ^f PCR-as acima do desejável (> 1 mg/L); ^g Apo B acima do desejável (> 174 mg/dL em homens e > 142 mg/dL em mulheres); ^hValores de creatinina corrigidos.

Tabela 5 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	Glicose (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina ^h (mg/dL)	PCR-as (mg/L)	ApoB (mg/dL)	Lp (a) (mg/L)
49	37	95	16	23	28	0,73	1,29 ^f	96,1	19,6
50	33	84	24	17	30	0,63	1,32 ^f	128	3,4
51	47	99	19	25	25	0,73	1,01	111	3,72
52	34	106 ^b	23	25	29	1,03	0,5	210 ^g	6,51
53	34	76	16	20	14	0,33	10,7 ^f	115	3,57
54	7	82	34	20	29	0,43	1,38 ^f	183 ^g	3,1
55	9	87	25	21	25	0,33	3,12 ^f	215 ^g	4,62
56	28	83	22	22	28	0,93	1,14 ^f	85,9	20,4
57	31	70	15	14	25	0,63	4,05 ^f	79,2	2,53
58	9	88	28	20	24	0,33	0,17	133	2,53
59	18	79	36	27	29	0,73	0,64	69,8	2,53
60	14	92	34	27	13	0,53	0,17	67,3	3,76
61	22	66	42 ^c	52	39	0,83	0,39	192 ^g	2,53

^a Diabetes mellitus (>126 mg/dL); ^b Pré-diabetes (100-126 mg/dL); ^c AST elevada (10-47 de 4 a 6 anos e 11-39 em adultos); ^d ALT elevada (24-49 4 a 11 anos e 11-45 em adultos); ^e ureia elevada (8-36 mg/dL entre 8 a 13 anos e 15-45 mg/dL em adultos); ^f PCR-as acima do desejável (> 1 mg/L); ^g Apo B acima do desejável (> 174 mg/dL em homens e > 142 mg/dL em mulheres); ^hValores de creatinina corrigidos.

Tabela 5 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	Glicose (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina^h (mg/dL)	PCR-as (mg/L)	ApoB (mg/dL)	Lp (a) (mg/dL)
62	24	76	14	15	37	0,43	1,32 ^f	159 ^g	3,33
63	13	80	18	14	16	0,53	0,17	146 ^g	8,32
64	7	88	32	17	30	0,23	0,96	94	3,36
65	10	81	37	23	31	0,13	0,17	217 ^g	9
66	14	80	47 ^c	29	23	0,73	1,7 ^f	89,3	2,53
67	77	91	30	37	27	0,63	15,9 ^f	109	2,53
68	59	81	30	35	37	0,53	3,22 ^f	79,9	-
69	50	84	31	33	27	0,43	32,3 ^f	64,7	-
70	41	76	24	21	25	0,23	2,01 ^f	102	-
71	53	82	33	34	28	0,33	2,79 ^f	232 ^g	-
72	55	84	25	32	39	0,63	0,75	103	-
73	54	66	40	40	29	0,33	1,21 ^f	153 ^g	10,1
74	19	54	30	36	29	0,53	8,77 ^f	53,3	-
75	24	79	18	18	30	0,43	16,9 ^f	78	-

^a Diabetes mellitus (>126 mg/dL); ^b Pré-diabetes (100-126 mg/dL); ^c AST elevada (10-47 de 4 a 6 anos e 11-39 em adultos); ^d ALT elevada (24-49 4 a 11 anos e 11-45 em adultos); ^e ureia elevada (8-36 mg/dL entre 8 a 13 anos e 15-45 mg/dL em adultos); ^f PCR-as acima do desejável (> 1 mg/L); ^g Apo B acima do desejável (> 174 mg/dL em homens e > 142 mg/dL em mulheres); ^hValores de creatinina corrigidos.

Tabela 5 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	Glicose (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina^b (mg/dL)	PCR-as (mg/L)	ApoB (mg/dL)	Lp (a) (mg/dL)
76	19	74	20	31	22	0,33	0,43	78,9	-
77	23	78	32	21	29	0,23	0,69	79,2	11,3
78	23	69	29	20	19	0,23	4,62 ^f	149 ^g	2,53
79	27	73	42 ^c	73 ^d	30	0,73	9,43 ^f	118	-
80	33	65	57 ^c	77 ^d	23	0,53	3,31 ^f	152	-
81	28	69	30	14	21	0,23	6,56 ^f	73,4	-
82	49	79	66 ^c	69 ^d	35	0,33	6,17 ^f	128	2,53
83	57	79	50 ^c	56 ^d	42	0,53	1,69 ^f	123	-
84	43	78	23	19	31	0,33	3,91 ^f	85,3	-
85	60	69	39	44	29	0,33	3,05 ^f	146	-
86	42	57	82 ^c	41	22	0,32	40,5 ^f	172 ^g	2,53
87	43	56	60 ^c	70 ^d	29	0,63	4,17 ^f	118	-
88	35	71	21	21	32	0,43	3,21 ^f	174 ^g	4,28
89	22	59	39	29	22	0,13	6,95 ^f	106	-

^a Diabetes mellitus (>126 mg/dL); ^b Pré-diabetes (100-126 mg/dL); ^c AST elevada (10-47 de 4 a 6 anos e 11-39 em adultos); ^d ALT elevada (24-49 4 a 11 anos e 11-45 em adultos); ^e ureia elevada (8-36 mg/dL entre 8 a 13 anos e 15-45 mg/dL em adultos); ^f PCR-as acima do desejável (> 1 mg/L); ^g Apo B acima do desejável (> 174 mg/dL em homens e > 142 mg/dL em mulheres); ^hValores de creatinina corrigidos

Tabela 5 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	Glicose (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina^h (mg/dL)	PCR-as (mg/L)	ApoB (mg/dL)	Lp (a) (mg/dL)
90	32	88	34	43 ^d	33	0,73	15,1 ^f	141	-
91	24	74	49 ^c	45 ^d	24	0,13	2,78 ^f	-	-
92	21	62	85 ^c	111 ^d	34	0,13	2,21 ^f	113	-
93	37	80	45 ^c	30	21	0,33	5,33 ^f	65,2	-
94	36	67	47 ^c	47 ^d	29	0,63	9,19 ^f	97,5	-
95	22	78	20	19	23	0,63	4,16 ^f	-	-
96	41	83	60 ^c	83 ^d	31	0,63	4,64 ^f	108	-
97	23	70	21	24	26	0,43	2,53 ^f	88,4	-
98	21	74	27	42	27	0,63	0,8	95,1	-
99	15	83	22	22	18	0,33	0,26	-	-
100	11	69	42 ^c	29	37	0,23	22,9 ^f	99,2	2,53
101	28	76	41 ^c	60 ^d	21	0,43	7,23 ^f	97,2	-
102	32	58	41 ^c	48 ^d	29	0,83	4,24 ^f	144	-
103	10	76	28	23	21	0,23	1,26 ^f	101	-

^a Diabetes mellitus (>126 mg/dL); ^b Pré-diabetes (100-126 mg/dL); ^c AST elevada (10-47 de 4 a 6 anos e 11-39 em adultos); ^d ALT elevada (24-49 4 a 11 anos e 11-45 em adultos); ^e ureia elevada (8-36 mg/dL entre 8 a 13 anos e 15-45 mg/dL em adultos); ^f PCR-as acima do desejável (> 1 mg/L); ^g Apo B acima do desejável (> 174 mg/dL em homens e > 142 mg/dL em mulheres); ^hValores de cretinina corrigidos.

Tabela 5 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	Glicose (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina^h (mg/dL)	PCR-as (mg/L)	ApoB (mg/dL)	Lp (a) (mg/dL)
104	18	52	46 ^c	41	27	0,33	2,8 ^f	70,5	-
105	12	77	30	19	21	0,33	0,61	60,1	
106	16	66	34	18	23	0,23	23 ^f	0,84	
107	14	68	30	22	24	0,43	1,19 ^f	-	-
108	8	75	36	22	27	0,13	0,23	68,4	-
109	61	72	20	16	61 ^e	1,03	20,4 ^f	90	-
110	62	77	21	22	38	0,73	2,75 ^f	86,5	-
111	82	77	25	21	70 ^e	0,93	3,89 ^f	29,7	-
112	73	96	33	24	29	0,23	5,15 ^f	194 ^g	-
113	36	67	19	18	31	0,43	2,92 ^f	176 ^g	2,78
114	52	96	23	31	28	0,53	28,3 ^f	-	-
115	45	68	34	54 ^d	30	0,43	5,22 ^f	119	-
116	45	80	16	18	25	0,33	0,4	107	-
117	25	63	43 ^c	27	28	0,43	0,2	61,2	-

^a Diabetes mellitus (>126 mg/dL); ^b Pré-diabetes (100-126 mg/dL); ^c AST elevada (10-47 de 4 a 6 anos e 11-39 em adultos); ^d ALT elevada (24-49 4 a 11 anos e 11-45 em adultos); ^e ureia elevada (8-36 mg/dL entre 8 a 13 anos e 15-45 mg/dL em adultos); ^f PCR-as acima do desejável (> 1 mg/L); ^g Apo B acima do desejável (> 174 mg/dL em homens e > 142 mg/dL em mulheres); ^hValores de cretinina corrigidos.

Tabela 5 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	Glicose (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina^h (mg/dL)	PCR-as (mg/L)	ApoB (mg/dL)	Lp (a) (mg/dL)
118	5	74	88 ^c	32	29	0,17	0,17	125	-
119	6	58	23	20	29	0,23	8,03 ^f	127	-
120	28	98	37	59 ^d	38	0,83	4,29 ^f	-	-
121	22	81	45 ^c	65 ^d	31	0,73	3,02 ^f	-	-
122	24	73	35	23	23	0,23	5,81 ^f	48,9	-
123	31	75	29	23	34	0,73	0,51	136	-

^a Diabetes mellitus (>126 mg/dL); ^b Pré-diabetes (100-126 mg/dL); ^c AST elevada (10-47 de 4 a 6 anos e 11-39 em adultos); ^d ALT elevada (24-49 4 a 11 anos e 11-45 em adultos); ^e ureia elevada (8-36 mg/dL entre 8 a 13 anos e 15-45 mg/dL em adultos); ^f PCR-as acima do desejável (> 1 mg/L); ^g Apo B acima do desejável (> 174 mg/dL em homens e > 142 mg/dL em mulheres); ^hValores de cretinina corrigidos.

A obesidade foi identificada em 17 (19,3%) indivíduos, sendo que desses, sete (41,2%) confirmaram o diagnóstico de HF. O sobrepeso foi observado em 23 (26,1%) indivíduos, dois quais seis (26,1%) eram portadores de HF (Tabela 6). A obesidade abdominal também foi identificada em 35 (39,8%) indivíduos, sendo 11 (31,4%) desses com diagnóstico de HF confirmado (Tabela 6). Hipertensão arterial foi identificada em 11 indivíduos (12,5%), sendo que sete (63,6%) tiveram o diagnóstico de HF confirmado. Esteatose foi verificada em 14 (15,9%) indivíduos, sete (50,0%) deles com HF confirmada. Placas ateroscleróticas foram identificadas em 17 indivíduos (19,3%), sendo sete (41,2%) com presença de placas em ambas as artérias carótidas e 12 (70,6%) tiveram diagnóstico confirmado de HF.

Tabela 6 Características clínicas dos indivíduos estudados da família de Bom Despacho-MG.

Indivíduo	Idade (anos)	IMC (kg/m ²)	CC (cm)	PS (mmHg)	PD (mmHg)	Esteatose	Placa Ateroscl.	Obstrução da CD (%)	Obstrução da CE (%)
36	75	30,6 ^b	103,2 ^c	155 ^d	90	Não	Sim	71,6	74,7
37	75	23,7	78,7	145 ^d	100	Não	Sim	7,5	21,3
38	36	32,5 ^b	98,3 ^c	145	80	Não	Não	0	0
39	32	24,9	73,2	105	70	Não	Não	0	0
40	55	25,5 ^a	94,2 ^c	175 ^d	105	Não	Não	0	0
41	54	19,4	66,8	130	80	Não	Não	0	0
42	39	29,7 ^a	93,8 ^c	115	80	Não	Não	0	0
43	39	24,4	76,8	130	75	Não	Não	0	0
44	50	28,6 ^a	91,7 ^c	150 ^d	90	Não	Não	0	29,8
45	49	29,1 ^a	97,7 ^c	150 ^d	100	Não	Sim	0	15,6
46	52	22,7	78,4	120	75	Não	Sim	35,9	24,2
47	44	22,7	78,6	125	70	Não	Sim	49,4	31,3
48	44	27,5 ^a	90,9	140	87,5	Sim	Sim	24,6	20,9
49	37	28,3 ^a	96,1 ^c	135	80	Não	Não	0	0
50	33	20,7	67	120	75	Não	Sim	16,9	0

IMC: índice de massa corporal; CC: Circunferência da cintura; OS: pressão sistólica; PD: pressão diastólica; CD: Carótida Direita; CE: Carótida Esquerda. ^a Sobrepeso (IMC entre 25-29,99); ^b Obesidade (IMC \geq 30), ^c Obesidade abdominal (CC \geq 94 em homens e \geq 80 em mulheres); ^d Hipertensão.

Tabela 6 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	IMC (kg/m ²)	CC (cm)	PS (mmHg)	PD (mmHg)	Esteatose	Placa Ateroscl.	Obstrução da CD (%)	Obstrução da CE (%)
51	47	24,3	77	110	70	Não	Não	0	0
52	34	22,4	81,4	140 ^d	90	Não	Sim	27,6	28,6
53	34	22,4	75,4	110	75	Não	Não	0	0
54	7	16,6	55,5	100	40	Não	Não	0	0
55	9	22,5	65,4	95	55	Não	Não	0	0
56	28	23,1	78,5	135	85	Não	Não	0	0
57	31	19,3	62,8	115	75	Não	Não	0	0
58	9	18,1	60,8	115	70	Não	Não	0	0
59	18	20,2	74,9	115	75	Não	Não	0	0
60	14	18,1	61,7	117 [†]	70	Não	Não	0	0
61	22	22,7	77,9	125	70	Não	Não	0	0
62	24	20,0	64,9	115	70	Não	Não	0	0
63	13	15,4	59,5	100	60	Não	Não	0	0
64	7	14,0	51,3	95	55	Não	Não	0	0
65	10	16,8	44,5	105	65	Não	Não	0	0

IMC: índice de massa corporal; CC: Circunferência da cintura; OS: pressão sistólica; PD: pressão diastólica; CD: Carótida Direita; CE: Carótida Esquerda. ^a Sobrepeso (IMC entre 25-29,99); ^b Obesidade (IMC \geq 30), ^c Obesidade abdominal (CC \geq 94 em homens e \geq 80 em mulheres); ^d Hipertensão.

Tabela 6 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	IMC (kg/m²)	CC (cm)	PS (mmHg)	PD (mmHg)	Esteatose	Placa Ateroscl.	Obstrução da CD (%)	Obstrução da CE (%)
66	14	16,4	63,8	120	75	Não	Não	0	0
67	77	24,5	86,5 ^c	147 ^d	78	Sim	Sim	30	0
68	59	27,4 ^a	93,5	125	70	Não	Não	0	0
69	50	33,2 ^a	109,6 ^c	122	85	Não	Não	0	0
70	41	26,9 ^a	86,8 ^c	100	70	Não	Não	0	0
71	53	21,5	72,9	155 ^d	107	Não	Não	0	0
72	55	26,8 ^a	80,5	125	80	Não	Não	0	0
73	54	28,7 ^a	88,0	140 ^d	80	Sim	Sim	0	26
74	19	18,6	71,2	107	70	Não	Não	0	0
75	24	24,6	78,8	102	62	Não	Não	0	0
76	19	19,8	65,5	105	50	Não	Não	0	0
77	23	24,5	80,5 ^c	111	71	Não	Não	0	0
78	23	19,8	65,7	110	70	Não	Não	0	0
79	27	26,8 ^a	110,4 ^c	140 ^d	97	Sim	Não	0	0
80	33	26,5 ^a	91,1	127	82	Sim	Não	0	0

IMC: índice de massa corporal; CC: Circunferência da cintura; OS: pressão sistólica; PD: pressão diastólica; CD: Carótida Direita; CE: Carótida Esquerda. ^a Sobrepeso (IMC entre 25-29,99); ^b Obesidade (IMC \geq 30), ^c Obesidade abdominal (CC \geq 94 em homens e \geq 80 em mulheres); ^d Hipertensão.

Tabela 6 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	IMC (kg/m ²)	CC (cm)	PS (mmHg)	PD (mmHg)	Esteatose	Placa Ateroscl.	Obstrução da CD (%)	Obstrução da CE (%)
81	28	28,1 ^a	85,4 ^c	116	76,5	Não	Não	0	0
82	49	38,0 ^b	100,5 ^c	125	80	Não	Não	0	0
83	57	27,7 ^a	87,2 ^c	135	80	Sim	Sim	15	0
84	43	35,6 ^b	101,7 ^c	127,5	92,5	Não	Não	0	0
85	60	26,7 ^a	95,6 ^c	120	80	Não	Sim	10	22
86	42	27,8 ^a	83,9 ^c	132,5	82,5	Não	Não	0	0
87	43	33,4 ^b	100,4 ^c	120	80	Sim	Sim	0	10
88	35	33,2 ^b	91,8 ^c	110	72,5	Não	Não	0	0
89	22	31,8 ^b	94,3 ^c	112,5	60	Não	Não	0	0
90	32	37,7 ^b	104,2 ^c	135	80	Sim	Não	0	0
91	24	26,7 ^a	81,9 ^c	100	70	Não	Não	0	0
92	21	34,2 ^b	100,7 ^c	120	87,5	Sim	Sim	0	10
93	37	37,1 ^b	109,2 ^c	127,5	82,5	Sim	Não	0	0
94	36	27,9 ^a	97,5 ^c	116	74	Não	Não	0	0
95	22	21,1	68,0	121	62	Não	Não	0	0

IMC: índice de massa corporal; CC: Circunferência da cintura; OS: pressão sistólica; PD: pressão diastólica; CD: Carótida Direita; CE: Carótida Esquerda. ^a Sobrepeso (IMC entre 25-29,99); ^b Obesidade (IMC \geq 30), ^c Obesidade abdominal (CC \geq 94 em homens e \geq 80 em mulheres); ^d Hipertensão.

Tabela 6 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	IMC (kg/m²)	CC (cm)	PS (mmHg)	PD (mmHg)	Esteatose	Placa Ateroscl.	Obstrução da CD (%)	Obstrução da CE (%)
96	41	31,3 ^b	100,1 ^c	129	80	Sim	Não	0	0
97	23	24,2	75,8	115	75	Não	Não	0	0
98	21	28,5 ^a	91,1	125	88	Não	Não	0	0
99	15	22,2	72,5	127,5	75	Não	Não	0	0
100	11	15,0	58,5	90	50	Não	Não	0	0
101	28	37,5 ^b	105,3 ^c	135	82	Sim	Não	0	0
102	32	34,5 ^b	105,3 ^c	123	78	Sim	Não	0	0
103	10	24,9	76,4	90	50	Não	Não	0	0
104	18	35,0 ^b	97,2 ^c	120	66	Não	Não	0	0
105	12	21,5	74,8	100	45	Não	Não	0	0
106	16	24,5	76,5	100	60	Não	Não	0	0
107	14	26,3 ^a	83,1	121	65	Não	Não	0	0
108	8	15,6	56,8	100	64	Não	Não	0	0
109	61	34,8 ^b	112,6 ^c	127,5	80	Não	Sim	0	32
110	62	31,3 ^b	103,9 ^c	130	80	Não	Não	0	0

IMC: índice de massa corporal; CC: Circunferência da cintura; OS: pressão sistólica; PD: pressão diastólica; CD: Carótida Direita; CE: Carótida Esquerda. ^a Sobrepeso (IMC entre 25-29,99); ^b Obesidade (IMC \geq 30), ^c Obesidade abdominal (CC \geq 94 em homens e \geq 80 em mulheres); ^d Hipertensão.

Tabela 6 Continuação

Indivíduo	Idade (anos)	IMC (kg/m²)	CC (cm)	PS (mmHg)	PD (mmHg)	Esteatose	Placa Ateroscl.	Obstrução da CD (%)	Obstrução da CE (%)
111	82	18,5	77,0	130	72	Não	Sim	0	28
112	73	19,3	77,5	132,5	67	Não	Sim	12	0
113	36	18,4	66,4	95	60	Não	Não	0	0
114	52	23,9	79,5	95	70	Não	Não	0	0
115	45	37,5 ^b	119,2 ^c	145	100	Sim	Não	0	0
116	45	19,2	65,0	100	60	Não	Não	0	0
117	25	22,5	76,8	120	82	Não	Não	0	0
118	5	16,7	53,5	90	50	Não	Não	0	0
119	6	16,3	56,1	90	50	Não	Não	0	0
120	28	28,9 ^a	96,5 ^c	136	91	Não	Não	0	0
121	22	29,4 ^a	96,4 ^c	110	77	Não	Não	0	0
122	24	21,3	---	87,5	52	Não	Não	0	0
123	31	17,8	68,3	110	65	Não	Não	0	0

IMC: índice de massa corporal; CC: Circunferência da cintura; OS: pressão sistólica; PD: pressão diastólica; CD: Carótida Direita; CE: Carótida Esquerda. ^a Sobrepeso (IMC entre 25-29,99); ^b Obesidade (IMC \geq 30), ^c Obesidade abdominal (CC \geq 94 em homens e \geq 80 em mulheres); ^d Hipertensão.

Do total de indivíduos da família de Bom Despacho-MG (n=88), 15 eram tabagistas (17,0%), sendo cinco (33,3%) com diagnóstico genético de HF. Observou-se que a maior parte dos membros da família tem em média $8,0 \pm 4,2$ anos de educação formal. Dezoito indivíduos (20,4%) realizavam atividade física mínima, dentre eles seis (33,3%) têm diagnóstico de HF; 52 (59,1%) realizavam atividade física moderada, 23 (44,2%) desses com HF diagnosticada e 18 indivíduos (20,4%) eram ativos, 11 (61,1%) deles com diagnóstico de HF confirmado (Apêndice V).

Nesta família, dois (2,3%) indivíduos não realizaram avaliação psicológica. Sintomas de ansiedade foram identificados em 26 (30,2%) indivíduos, sendo que 12 deles tiveram diagnóstico genético de HF. Tendência à ansiedade foi identificada em 23 indivíduos (26,7%), 13 deles com HF confirmada, e 37 (43,0%) indivíduos não apresentavam sintomas de ansiedade, sendo que 13 desses têm HF. Sessenta e seis (76,7%) indivíduos não apresentavam depressão, sendo 28 com diagnóstico de HF. Tendência à depressão foi observada em 17 (19,7%) indivíduos, oito deles com diagnóstico de HF e três indivíduos apresentavam sintomas de depressão, sendo que dois deles apresentaram HF (Apêndice V).

5.2.3 Risco cardiovascular para pacientes com HF dos municípios de Papanduva-SC e de Bom Despacho-MG

Apesar de os pacientes com HF se enquadrarem como em “alto risco cardiovascular”, alguns fatores podem acentuar ainda mais o risco desses pacientes e devem ser avaliados para garantir a otimização do tratamento.

De acordo com a I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (SANTOS *et al*, 2012), dentre os 53 indivíduos com diagnóstico clínico e/ou genético definitivo de HF de Papanduva-SC e de Bom Despacho-MG, 42 (79,2%) foram reclassificados como em “muito alto risco cardiovascular”. Desses pacientes, 31 foram reclassificados por apresentar pelo menos uma das seguintes características: DCV (3 pacientes; 7,1%), histórico familiar de doença coronariana prematura (27 pacientes; 64,3%) e/ou tabagismo (oito pacientes; 19,0%).

Além disto, 11 (26,9%) pacientes foram reclassificados por apresentar dois ou mais dos seguintes fatores de risco: idade indicativa de maior risco (n = 25; 59,5%); sexo masculino (n = 25; 59,5%); LDL-c

acima de 250 mg/dL (n = 10; 23,8%); HDL-c baixo (n = 21; 50,0%); hipertensão (n = 11; 26,2%) e SM (n = 5; 11,9%). Nenhum indivíduo apresentou Lp(a) elevada e sete (29,4%) apresentaram sinais clínicos da doença. Assim, considerando a associação de fatores de risco, dentre os 11 indivíduos considerados em muito alto risco cardiovascular, um indivíduo apresentou associação de seis fatores de risco; um indivíduo apresentou quatro fatores de risco e nove indivíduos apresentaram dois fatores. Sete indivíduos possuíam apenas um fator e quatro não possuíam nenhum fator de risco.

5.2.4 Mutações identificadas nos pacientes de Papanduva-SC e Bom Despacho-MG

A genotipagem permitiu a confirmação do diagnóstico de HF em 53 (43,1%) indivíduos dos municípios de Papanduva-SC e Bom Despacho-MG, sendo superior ao diagnosticado sem a genotipagem 18 (14,6%; $p = 0,0001$).

As principais características das mutações encontradas em todos os indivíduos avaliados e as informações sobre análise *in silico* estão apresentadas no Quadro 10. A figura 31 apresenta a localização genômica de cada mutação identificada. Foram identificadas 14 mutações no gene *LDLR*, sendo cinco no exon 4, quatro no exon 6, uma nos exons 10, 12 e 13 e duas no exon 15.

Quadro 10 Características das mutações identificadas em pacientes de Papanduva-SC e Bom Despacho-MG.

Exon	Variante nucleotídica	Variante aminoacídica	Predição			Classificação de acordo com a ACMG	N° de pacientes com a mutação (Municípios)
			PolyPhen2	Mutation Taster	SIFT		
4	632A>T	211His/Leu	Provavelmente Patogênica	Causadora de doença	Patogênica	Patogênica	1 (P) 0 (B)
4	661G>A	221Asp/Asn	Provavelmente Patogênica	Causadora de doença	Patogênica	Patogênica	0 (P) 3 (B)
4	666C>A	222 Cys/Term	NA	Causadora de doença	NA	Patogênica	7 (P) 0 (B)
4	670G>A	224Asp/Asn	Provavelmente Patogênica	Causadora de doença	Tolerada	Patogênica	0 (P) 25 (B)
4	682G>A	228Glu/Lys	Provavelmente Patogênica	Causadora de doença	Patogênica	Patogênica	0 (P) 2 (B)
6	862G>A	288 Glu/Lys	Provavelmente Patogênica	Causadora de doença	Patogênica	Patogênica	0 (P) 4 (B)
6	901G>A*	301Asp/Asn	Provavelmente Patogênica	Causadora de doença	Patogênica	Provavelmente patogênica	2 (P) 0 (B)
6	919G>A	307Asp/Asn	Provavelmente Patogênica	Causadora de doença	Patogênica	Provavelmente patogênica	4 (P) 13 (B)

ACMG: *American College of Medical Genetics*. * Mutação ainda não descrita em banco de dados.

P = pacientes de Papanduva-SC (n = 35); B = pacientes de Bom Despacho-MG (n = 88).

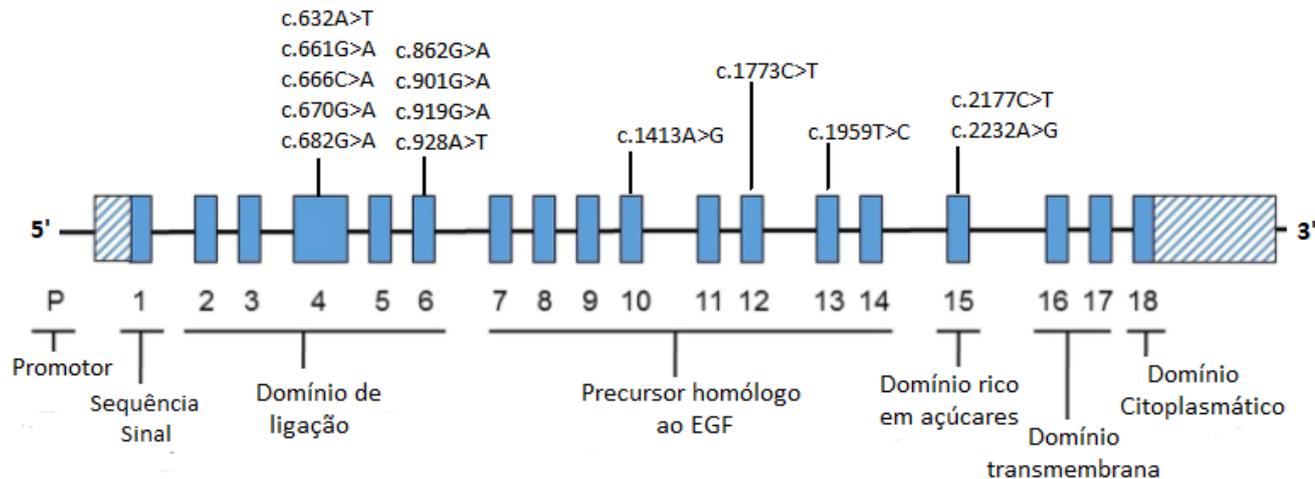
Quadro 10 Características das mutações identificadas em pacientes de Papanduva-SC e Bom Despacho-MG.

Exon	Variante nucleotídica	Variante aminoacídica	Predição			Classificação de acordo com a ACMG	N° de pacientes com a mutação (Municípios)
			PolyPhen2	Mutation Taster	SIFT		
6	928A>T*	310 Ile/Phe	Benigna	Polimorfismo	Tolerada	Provavelmente patogênica	1 (P) 0 (B)
10	1413A>G	471Arg/Arg	NA	Polimorfismo	Tolerada	Benigna	6 (P) 5 (B)
12	1773C>T	591Asn/Asn	NA	Polimorfismo	Tolerada	Benigna	5 (P) 2 (B)
13	1959T>C	653 Val/Val	NA	Polimorfismo	Tolerada	Benigna	0 (P) 9 (B)
15	2177C>T	726 Thr/Ile	Benigna	Polimorfismo	Patogênica	Provavelmente patogênica	0 (P) 5 (B)
15	2232A>G	744Arg/Arg	NA	Polimorfismo	Tolerada	Benigna	1(P) 24 (B)

ACMG: *American College of Medical Genetics*. * Mutação ainda não descrita em banco de dados.

P = pacientes de Papanduva-SC (n = 35); B = pacientes de Bom Despacho-MG (n = 88).

Figura 31 Representação esquemática da localização das mutações encontradas em cada exon do *LDLR* de pacientes de Papanduva-SC e Bom Despacho-MG.



A parte hachurada corresponde à região que não será traduzida (5'UTR e 3'UTR).

5.2.5 Comparação entre pacientes com e sem HF de Papanduva-SC e Bom Despacho-MG

A Tabela 7 apresenta a comparação entre os parâmetros lipídicos, glicêmicos, inflamatórios e de função hepática e renal dos indivíduos com e sem HF. Conforme esperado, os 53 indivíduos diagnosticados com HF nas famílias de Papanduva-SC e Bom Despacho-MG apresentaram a média de CT significativamente maior que aqueles sem o diagnóstico de HF ($p < 0,0001$), o que culminou igualmente com prevalência significativamente maior de indivíduos com CT elevado ($p = 0,0001$). A concentração de LDL-c também esteve significativamente mais elevada nos portadores de HF ($p < 0,0001$), sendo que apenas indivíduos com HF apresentaram valores de LDL-c acima de 250 mg/dL. A prevalência de LDL-c ótimo ou limítrofe foi maior nos indivíduos sem HF ($p = 0,016$ e $0,0004$, respectivamente). Os indivíduos com HF apresentaram ainda concentrações mais elevadas de sd-LDL-c ($p = 0,0001$) e triglicerídeos ($p = 0,048$). A concentração de não-HDL-c foi significativamente maior nos indivíduos com HF ($p < 0,0001$), dessa forma, a prevalência de não-HDL-c muito alto também foi maior nestes indivíduos ($p = 0,0001$). Além disto, os indivíduos sem HF tiveram maiores prevalências de não-HDL-c ótimo ou desejável ($p = 0,0001$ e $0,031$, respectivamente). Apesar de as concentrações de HDL-c estarem significativamente diminuídas nos indivíduos com HF ($p = 0,040$), isso não influenciou na diferença de prevalências de HDL-c baixo ($p = 0,085$). Não houve diferenças nas prevalências de hipertrigliceridemia e hiperglicemia, e indicadores de função hepática, renal e de inflamação subclínica alterados entre indivíduos com e sem HF.

Tabela 7 Características bioquímicas dos membros estudados das famílias de Papanduva-SC e de Bom Despacho-MG de acordo com a presença ou não de HF.

Parâmetro	Geral	Com HF	Sem HF	p
	(n = 123)	(n = 53; 43,1%)	(n = 70; 56,9%)	
Col. Total (mg/dL)	224,9 ± 77,3	278,9 ± 84,2	184,0 ± 36	<0,0001
Col. Total Alto (≥ 240 mg/dL)	37 (30,1%)	33 (62,3%)	4 (5,7%)	0,0001
Col. Total Limítrofe (200-239 mg/dL)	26 (21,1%)	10 (18,9%)	16 (22,8%)	0,659
HDL-c (mg/dL)	49,6 ± 13,6	46,7 ± 12,6	51,8 ± 14,1	0,040
HDL-c baixo (< 40 mg/dL)	29 (23,6%)	17 (32,1%)	12 (17,1%)	0,085
Não-HDL-c (mg/dL)	175,3 ± 80,2	232,1 ± 87,9	132,2 ± 34,7	<0,0001
Não-HDL-c ótimo (< 130 mg/dL)	40 (32,5%)	5 (9,4%)	35 (50%)	0,0001
Não-HDL-c desejável (130-159 mg/dL)	28 (22,8%)	7 (13,2%)	21 (30%)	0,031
Não-HDL-c alto (160-189 mg/dL)	17 (13,8%)	7 (13,2%)	10 (14,3%)	1,000
Não-HDL-c muito alto (≥190 mg/dL)	38 (30,9%)	34 (64,1%)	4 (5,7%)	0,0001
LDL-c (mg/dL)	117,2 ± 74,6	219,1 ± 79,9	124,0 ± 32,8	<0,0001
LDL-c (≥ 330 mg/dL)	4 (3,2%)	4 (7,5%)	0%	0,032
LDL-c (250-329 mg/dL)	16 (13,0%)	16 (30,2%)	0%	0,0001
LDL-c (190-249 mg/dL)	15 (12,2%)	12 (22,6%)	3 (4,3%)	0,004
LDL-c (155-189 mg/dL)	17 (13,8%)	9 (17%)	8 (10,9%)	0,434
LDL-c (130-154 mg/dL)	22 (17,9%)	4 (7,5%)	18 (25,7%)	0,009
LDL-c (100-129 mg/dL)	28 (22,8%)	4 (7,5%)	24 (34,3%)	0,0004
LDL-c (< 100 mg/dL)	21 (17,1%)	4 (7,5%)	17 (24,3%)	0,016
sd-LDL-c (mg/dL)	103,7 ± 69,7	147,1 ± 78,7	70,8 ± 37,1	<0,0001

Tabela 7 Continuação

Parâmetro	Geral (n = 123)	Com HF (n = 53; 43,1%)	Sem HF (n = 70; 56,9%)	p
Triglicerídeos (mg/dL)	100,1 ± 55,3	111,4 ± 58,1	91,6 ± 51,9	0,048
TG Limítrofe (150-200 mg/dL)	12 (9,7%)	7 (13,2%)	5 (7,1%)	0,359
TG Alto (201-499 mg/dL)	8 (6,5%)	5 (9,4%)	3 (4,3%)	0,288
TG muito alto (≥ 500 mg/dL)	0	0	0	-
Glicose (mg/dL)	83,3 ± 17,6	82,2 ± 13,6	84,1 ± 20,1	0,540
Creatinina (mg/dL)	0,609 ± 0,288	0,586 ± 0,292	0,626 ± 0,285	0,453
AST (U/L)	30,9 ± 14,8	31,6 ± 15,7	30,4 ± 14,1	0,661
ALT (U/L)	30,1 ± 18,7	29,4 ± 14,9	30,6 ± 21,2	0,723
Uréia (mg/dL)	28,7 ± 8,1	28,8 ± 6,3	28,7 ± 9,2	0,919
PCR-as (mg/L)	4,1 ± 7,0	3,83 ± 6,7	4,4 ± 7,2	0,652

De forma geral, não foram observadas diferenças de peso, obesidade abdominal, hipertensão e esteatose entre indivíduos com e sem HF de Papanduva-SC e Bom Despacho-MG (Tabela 8). O percentual de indivíduos com xantomas, arco corneal e placas aterosclerótica foi significativamente maior nos indivíduos com HF quando comparados aos indivíduos sem HF ($p = 0,0001$; $0,0009$ e $0,014$, respectivamente). Ressalta-se que nenhum indivíduo sem HF apresentou xantomas ou arco corneal.

Cerca de 50% dos indivíduos com HF utilizava medicação hipolipemiante, versus 5,7% dos indivíduos sem HF ($p = 0,0001$). O percentual de indivíduos com conhecimento sobre ter hipercolesterolemia também era significativamente maior nos indivíduos com HF ($p = 0,0001$). Os indivíduos sem HF tinham em média $7,8 \pm 4,1$ anos de educação formal, versus $6,3 \pm 4,2$ anos dos portadores de HF ($p = 0,048$). Não houve diferenças nas prevalências relacionadas com sedentarismo, ansiedade ou depressão (Tabela 9).

A avaliação nutricional dos indivíduos que participaram deste estudo, dos municípios de Papanduva-SC e Bom Despacho-MG, não apresentou diferenças significativas nos padrões alimentares dos pacientes diagnosticados com e sem HF. A Tabela 10 apresenta as médias dos principais parâmetros nutricionais avaliados.

Tabela 8 Características clínicas dos membros estudados das famílias de Papanduva-SC e de Bom Despacho-MG de acordo com a presença ou não de HF.

Parâmetros	 Geral (n = 123)	 Com HF (n = 53; 43,1%)	 Sem HF (n = 70; 56,9%)	p
Idade (anos)	35,6 ± 19,7	39,1 ± 21,4	33,0 ± 20,1	0,089
Sobrepeso	27 (21,9%)	9 (17%)	18 (25,7%)	0,278
Obesidade	19 (15,4%)	8 (15,1%)	11 (15,7%)	1,000
CC normal	83 (68,6%)	38 (71,7%)	45 (66,2%)	0,439
CC de risco	22 (18,2%)	8 (15,1%)	14 (20,6%)	0,635
CC de alto risco	16 (13,2%)	7 (13,2%)	9 (13,2%)	1,000
Pré-hipertensão	4 (3,2%)	2 (3,8%)	2 (2,8%)	1,000
Hipertensão	50 (40,6%)	22 (41,5%)	28 (40,0%)	1,000
Xantomas	20 (16,3%)	20 (37,7%)	0 (0%)	0,0001
Arco corneal	8 (6,5%)	8 (15,1%)	0 (0%)	0,0009
Placa aterosclerótica	34 (27,6%)	21 (39,6%)	13 (18,6%)	0,014
Esteatose	16 (13,2%)	8 (15,4%)	8 (11,6%)	0,595

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão e número e percentual. CC: circunferência da cintura.

Tabela 9 Características gerais dos membros estudados das famílias de Papanduva-SC e de Bom Despacho-MG de acordo com a presença ou não de HF.

Parâmetro	Geral (n = 123)	Com HF (n = 53; 43,1%)	Sem HF (n = 70; 56,9%)	p
Medicação hipolipemiante	31 (25,3%)	27 (50,9%)	4 (5,7%)	0,0001
Conhecimento sobre hipercolesterolemia	55 (44,7%)	36 (67,9%)	19 (27,1%)	0,0001
Tabagistas	34 (27,6%)	13 (24,5%)	21 (30,0%)	0,546
Educação formal (anos)	7,2 ± 4,2	6,3 ± 4,2	7,8 ± 4,1	0,048
Sedentários	25 (20,3%)	9 (17,0%)	16 (22,8%)	0,500
Fisicamente ativos	23 (18,7%)	12 (22,6%)	11 (15,7%)	0,357
Ansiedade	48 (39,0%)	19 (35,8%)	29 (41,4%)	0,578
Tendência à ansiedade	27 (21,9%)	14 (26,4%)	13 (18,6%)	0,379
Depressão	12 (9,7%)	6 (11,3%)	6 (8,6%)	0,760
Tendência à depressão	24 (19,5%)	10 (18,9%)	14 (20%)	1,000

Tabela 10 Avaliação nutricional dos indivíduos de Papanduva-SC e de Bom Despacho-MG que participaram do estudo.

Parâmetro	Geral	Com HF	Sem HF	p
	(n = 123)	(n = 53; 43,1%)	(n = 70; 56,9%)	
Calorias totais (kcal)	2222,5 ± 2699,9	2475,3 ± 3916,3	2024,2 ± 1112,7	0,341
Proteínas Totais (g)	119,5 ± 487,7	185,3 ± 739,4	94,0 ± 69,4	0,305
Gorduras Totais (g)	58,8 ± 75,4	61,9 ± 34,24	56,4 ± 43,7	0,285
Colesterol (mg)	209,3 ± 364,5	224,0 ± 224,9	333,7 ± 439,7	0,100
AGS (g)	19,9 ± 17,7	18,7 ± 18,8	20,9 ± 16,9	0,493
AGPI (g)	17,3 ± 39,6	21,7 ± 58,6	13,9 ± 11,0	0,278
AGMI (g)	21,9 ± 23,6	21,6 ± 28,5	22,2 ± 19,1	0,935
AGS (%)	36,0 ± 9,9	34,9 ± 7,9	36,8 ± 11,2	0,280
AGPI (%)	27,4 ± 11,9	28,7 ± 12,1	26,4 ± 11,8	0,292
AGMI (%)	36,6 ± 8,5	36,4 ± 7,0	36,7 ± 9,5	0,821
Fibras (g)	9,8 ± 7,5	13,0 ± 8,1	12,1 ± 7,0	0,457
Proteínas Totais (%)	18,7 ± 8,0	17,0 ± 9,1	18,9 ± 7,0	0,234
Carboidratos (%)	51,0 ± 13,8	52,7 ± 13,2	49,5 ± 14,1	0,135
Gorduras (%)	30,2 ± 11,2	30,3 ± 9,8	31,6 ± 12,2	0,673

AGS: Ácidos graxos saturados; AGPI: Ácidos graxos poliinsaturados; AGMI: Ácidos graxos monoinsaturados

6 DISCUSSÃO

6.1 DIFICULDADES NO DIAGNÓSTICO DE HF

Muitas dificuldades no diagnóstico preciso de HF podem ocorrer com a utilização de critérios tradicionais, como parâmetros clínicos e bioquímicos (VAN AALST COHEN, 2006; IACOCCA; HEGELE, 2017). Além disto, as características clínicas, especialmente os achados físicos, assumiram menos importância diagnóstica nos últimos tempos. As mudanças no estilo de vida – incluindo dieta e exercício físico, juntamente com o uso generalizado de terapias hipolipemiantes –, alteraram a apresentação "clássica" de HF. Os achados físicos de xantomas e arco corneal, que tem peso nos critérios de diagnóstico, são encontrados muito menos frequentemente hoje do que há 20 anos (IACOCCA; HEGELE, 2017). Potencialmente, as melhorias na dieta, estilo de vida e uso de medicamentos também retardaram ou atenuaram o desenvolvimento de DCV em portadores de HF. Assim, o histórico familiar, que também exerce influência no diagnóstico, pode não ser confiável ou não identificável em certas famílias (IACOCCA; HEGELE, 2017). Dessa forma, um diagnóstico "definitivo" de HF por critérios atuais está cada vez mais dependente da identificação de uma variante de DNA causal. Nesse sentido, há necessidade de ferramentas de diagnóstico simples, como a análise genética de toda a região codificadora do gene *LDLR*, o gene mais frequentemente relacionado com a HF (VAN AALST COHEN, 2006; IACOCCA; HEGELE, 2017). A crescente proeminência do diagnóstico molecular também tem implicações para o desenvolvimento de medicamentos. Em relação à triagem genética, considerada padrão ouro, a grande dificuldade para que seja realizada em grande escala, está na necessidade de um laboratório de genética molecular de alta qualidade e com pessoal qualificado em análise e interpretação dos resultados de DNA (SANTOS; FRAUCHES; CHACRA, 2015; MEHTA *et al*, 2016).

Neste estudo, descrevemos um método simples e rápido para o diagnóstico de HF através da genotipagem do *LDLR*. A estratégia de genotipagem descrita apresenta sensibilidade para a identificação das mutações causadoras de HF, o que possibilita o diagnóstico molecular e pode contribuir com o aumento da identificação do espectro de mutações do *LDLR*. O método possui especificidade, pois permite a amplificação dos segmentos de DNA pretendidos, sem a presença de subprodutos que podem interferir na análise. O presente método possui

viabilidade de execução, pois utiliza técnicas simples e disponíveis em laboratórios de pesquisa e de menor porte, incluindo em países em desenvolvimento. O método permite a genotipagem do *LDLR* utilizando apenas 200 µL de sangue total. Além disso, apesar de melhores resultados terem sido obtidos com sangue, é possível a utilização de amostras da mucosa bucal coletadas através de *swab*, o que facilita a execução do teste em crianças, em locais distantes dos centros de pesquisa e com dificuldade de refrigeração ou transporte de amostras de sangue.

Além da dificuldade em relação ao método de diagnóstico, clínico ou genético, ocorre também dificuldade em triar e/ou rastrear os indivíduos com a doença. Nenhum país implementou ainda um programa de triagem universal, e este continua a ser um tema controverso devido a problemas de custo e recursos, questões de interpretação e possíveis prejuízos para a população pelo alto número de "falsos positivos" identificados (LANGSLET; OSE, 2013). Entretanto, há evidências favorecendo uma triagem geral da população devido às baixas taxas de detecção de programas seletivos de triagem (LANGSLET; OSE, 2013).

A análise de segregação familiar utilizando procedimentos clínicos, bioquímicos e moleculares é uma prática preventiva comum no estudo de pacientes com doenças hereditárias para identificar outro membro familiar afetado, facilitar o tratamento, quando for possível, e fornecer aconselhamento genético. Um grupo de doenças hereditárias, no qual a HF está incluída, preenche os requisitos para ser incorporado em programas de rastreio de larga escala, também chamado de rastreamento em cascata (VACA *et al*, 2011). Especialistas concordam que o rastreio em cascata deve ser implementado, entretanto, não há consenso sobre o tipo de programa de triagem em cascata mais adequado. Os programas atuais são avaliados criticamente para verificar a eficácia, taxas de falso positivo/negativo, cobertura e custo-efetividade (SANTOS; FRAUCHES; CHACRA, 2015).

Os programas de rastreamento em cascata custo-efetivos precisam de investimento em infra-estrutura. Mesmo o programa mais básico requer pessoal treinado e capacitado para identificar casos índices, realizar rastreamento familiar, realizar testes, avaliar e analisar os resultados. Isso impede que muitas clínicas e hospitais conduzam o rastreamento em cascata, pois o corpo técnico já está sobrecarregado e pessoal adicional deve ser contratado especificamente para essa tarefa (SANTOS; FRAUCHES; CHACRA, 2015). Infelizmente, devido à

extensa infra-estrutura necessária para uma triagem genética em cascata, existem apenas alguns desses programas nos países desenvolvidos e apenas dois na América do Sul, sendo um no Uruguai e outro no Brasil (SANTOS; FRAUCHES; CHACRA, 2015; MEHTA *et al*, 2016).

Ambas as abordagens de rastreio, genéticas ou fenotípicas, requerem experiência e conhecimento para realizar desde o contato telefônico até aconselhamento às famílias. Além disto, um banco de dados de HF é necessário para permitir a documentação de árvores genealógicas, status de triagem e resultados dos casos índices e membros da família (SANTOS; FRAUCHES; CHACRA, 2015).

Em nosso estudo, que não faz parte de um programa nacional de rastreio, realizamos o rastreamento em cascata envolvendo, inicialmente, 210 indivíduos de duas famílias distintas, em diferentes municípios brasileiros, Papanduva-SC e Bom Despacho-MG. Todos os indivíduos que participaram do estudo foram contatados pelas equipes dos serviços de saúde da região onde vivem ou, pelos próprios parentes que já estavam participando do estudo. Muitos parentes não foram contatados por residirem em regiões distantes, não poderem comparecer nos dias previstos para as coletas e entrevistas. Outros parentes optaram por não participar do estudo por falta de informação sobre a severidade da doença ou medo do resultado.

Além da dificuldade em contatar os parentes, foram excluídos do estudo 87 indivíduos que não cumpriram todos os requisitos necessários, sendo a falta de preenchimento de questionários para o conhecimento de histórico clínico, familiar e estruturação do heredograma (70 indivíduos), o principal motivo da exclusão desses indivíduos. É possível que, se houvesse uma equipe com mais profissionais capazes de realizar a busca ativa desses indivíduos, o número de excluídos seria menor.

A identificação inicial de casos índice é essencial para qualquer tipo de programa de rastreio em cascata. Enquanto casos índice podem ser identificados em hospitais e clínicas, ainda é limitado alcançar a população como um todo. Há certa perda na triagem de membros da família que se encontram fora da área de triagem. Assim, quanto maior a área selecionada, maior a chance de sucesso (HARDCASTLE *et al*, 2014; SANTOS; FRAUCHES; CHACRA, 2015). O método escolhido para contato (direto, através de contato telefônico ou cartas das clínicas; ou indireto, mediado por pacientes que transmitem cartas/informações das clínicas) mostrou afetar drasticamente o sucesso dos programas de triagem em cascata, com taxas de "sem resposta" de até 60% com o

contato indireto e 10% com contato direto (MARKS *et al*, 2006; HALLOWELL *et al*, 2011; HARDCASTLE *et al*, 2014; SANTOS; FRAUCHES; CHACRA, 2015). O tipo de contato levanta uma série de dilemas éticos. Por exemplo, maximizar a utilidade do rastreamento em cascata, em vez de respeitar a privacidade dos probandos e parentes e prevenir danos psicológicos, prejudicando o direito dos familiares de não conhecer informações (HALLOWELL *et al*, 2011; HARDCASTLE *et al*, 2014). Além disto, o contato direto é dependente de o caso índice revelar detalhes de contato da família, o que pode levantar questões sobre confidencialidade para alguns indivíduos. Finalmente, o contato indireto pode ser uma opção mais econômica, pois economiza treinamento e emprego de pessoal especializado para rastrear e contatar parentes (HALLOWELL *et al*, 2011; HARDCASTLE *et al*, 2014).

6.2 RASTREAMENTO EM CASCATA DE FAMÍLIAS BRASILEIRAS

No presente estudo, apresentamos os resultados do rastreamento em cascata envolvendo 123 indivíduos de duas famílias brasileiras. Para a saúde pública, o rastreamento em cascata ajuda a reduzir os eventos e/ou mortes cardiovasculares através da identificação precoce de crianças, adolescentes e jovens adultos que poderiam ser beneficiados por tratamento, bem como membros da família que desconhecem possuir altos valores de LDL-c, pois permanecem assintomáticos (SANTOS; FRAUCHES; CHACRA, 2015). O fato de a HF ser uma doença comum, assintomática, que apresenta resultados adversos importantes e é tratável, sugere que o rastreio na infância seria apropriado (WATTS, 2016).

Na família de Papanduva-SC, dos 35 participantes avaliados, apenas sete apresentavam diagnóstico clínico definitivo de HF. Dois indivíduos apresentavam diagnóstico provável e 15 participantes tinham diagnóstico possível. Sendo assim, apenas 11 indivíduos tiveram o risco de HF descartado. Na família de Bom Despacho-MG, dos 88 participantes, apenas 11 apresentaram diagnóstico clínico definitivo. Diagnóstico provável foi observado em 18 indivíduos e possível em 15. Dessa forma, fica evidenciada a dificuldade em diagnosticar a HF apenas envolvendo os sinais e sintomas clínicos e histórico familiar. O método utilizado para realizar a genotipagem e identificar mutações relacionadas com a doença permitiu a confirmação do diagnóstico de HF

em 53 (43,1%) indivíduos, sendo, conforme esperado, superior ao diagnosticado sem a genotipagem 18 (14,6%; $p = 0,0001$).

6.2.1 Rastreamento em cascata em Papanduva-SC

Na família de Papanduva-SC, 35 membros foram avaliados, sendo o indivíduo mais jovem com 5 anos e o mais idoso com 89 anos. Quase metade dos participantes (45,7%) revelaram ter histórico familiar de DCV prematura e 74,3% relataram ter parentes com colesterol total elevado; o conhecimento da presença de sinais clínicos de HF em parentes foi relatado por 60% dos participantes. Essas informações foram extremamente úteis para a confirmação do diagnóstico, entretanto, podem causar viés pois depende do conhecimento prévio sobre seu histórico familiar, que nem sempre existe e, desta forma, pode gerar resultados falso positivo ou negativo. Por exemplo, os indivíduos 4 e 5 são irmãos e, assim, deveriam reportar as mesmas informações sobre histórico familiar. Ocorre que todas as respostas de quatro perguntas sobre o histórico familiar foram diferentes para os dois indivíduos. Da mesma forma, os irmãos 8, 10, 11, 12, 13, 15 e 16, apesar de apresentarem respostas semelhantes, ainda responderam algumas questões sobre histórico familiar de forma diferente.

Nessa família, apenas um indivíduo relatou ter DAC prematura e nenhum teve doença arterial cerebral ou periférica prematura. Por outro lado, alguns indivíduos com HF confirmada apresentavam idade elevada, como 77 e 89 anos, o que diverge do esperado para esses pacientes. Os hábitos de vida, bem como a possível presença de outras mutações que favorecem o metabolismo de lipídeos, podem estar envolvidos com a longevidade desses pacientes.

A análise do perfil lipídico dessa família mostrou que metade dos indivíduos apresentavam CT e LDL-c elevado, o que aumenta a suspeita de HF na família. Apesar do percentual elevado, apenas 28,6% apresentavam concentrações séricas de LDL-c superior a 190 mg/dL, o que seria sugestivo de HF. Esses percentuais divergem, embora não significativamente ($p = 0,611$), dos 37,1% de pacientes diagnosticados com HF após a genotipagem, indicando novamente a fragilidade do diagnóstico quando apenas as características bioquímicas e familiares são consideradas. A baixa prevalência de hipertrigliceridemia na família (14,3%) pode ser indicativo de que a dieta, particularmente aquela rica em carboidratos, não tem papel fundamental na dislipidemia desses indivíduos. Além disto, como será discutido adiante, não foram

observadas diferenças significativas entre os parâmetros alimentares dos indivíduos com e sem HF.

Curiosamente, nesta família de Papanduva-SC, apenas oito (22,8%) indivíduos reportaram ter realizado previamente a análise bioquímica sérica do perfil lipídico, sendo que sete apresentavam dislipidemia e quatro a tratavam. Durante o estudo, outros oito indivíduos foram diagnosticados com dislipidemia. A falta de conhecimento sobre a condição e tratamento adequado e precoce implica mais riscos para esses pacientes. Considerando o potencial controle da progressão da aterosclerose, especialmente em pacientes jovens, o tratamento precoce pode impactar substancialmente na prevenção de DCV e na redução da morbidade e mortalidade, entretanto, depende do diagnóstico (HARADA-SHIBA *et al*, 2012; BRAUTBAR, 2015).

O caso índice da família de Papanduva-SC (indivíduo 8) tinha conhecimento sobre ter dislipidemia e estava em tratamento com hipolipemiante, apesar disso, ainda apresentava concentrações de LDL-c de 281 mg/dL e cerca de 58% das partículas de LDL eram pequenas e densa, o que aumenta sua aterogenicidade. A paciente apresentava bloqueio de cerca de 30% na artéria carótida esquerda e comorbidades como hipertensão arterial. A realização da genotipagem permitiu a identificação das mutações 666C>A; 1413A>G e 1773C>T, que foram pesquisadas nos parentes. Para otimizar o custo-benefício do rastreamento, os indivíduos que não tinham laços consanguíneos com o caso índice e/ou não apresentavam nenhum indício clínico de possuir HF não foram genotipados. Da mesma forma, optou-se por genotipar indivíduos jovens que apresentavam algum indício de HF, mas que devido à idade poderiam não estar apresentando ainda sinais clínicos.

A presença da mutação 666C>A confirmou o diagnóstico de HF na filha do caso índice (#21), em dois irmãos (#12 e #15), dois tios (#4 e #5) e um primo (#18).

Trocas na primeira posição do códon tendem a especificar aminoácidos similares (senão o mesmo). Códon com pirimidinas na 2ª posição codificam, em geral, aminoácidos hidrofóbicos (Phe; Leu; Ile; Val; Ala; Pro). Códon com purinas na 2ª posição codificam, em geral, aminoácidos polares (Asn; Gln; Cys; Tyr) ou carregados (Asp; Glu; Lys; Arg). A substituição de um aminoácido hidrofóbico por um polar/carregado ou vice-versa, pode alterar a conformação da proteína afetando sua função. Em geral, qualquer mudança desse tipo no sítio ativo de uma enzima provoca um decréscimo em sua atividade

enzimática. Por outro lado, mutações pontuais na terceira posição do códon são fenotipicamente silenciosas, ou seja, o códon mutado especifica o mesmo aminoácido que o tipo selvagem (VOET; VOET, 2013).

A mutação 666C>A, encontrada no exon 4, corresponde à substituição do nucleotídeo C pelo A na posição 666 do *LDLR*, modificando o códon TGC, correspondente ao aminoácido cisteína na posição 222 da cadeia proteica, pelo códon TGA, que traduz um códon de terminação. A cisteína exerce importante papel na formação das pontes dissulfeto no LDL-R e sua presença define a conformação e funcionalidade do receptor (TATISHCHEVA *et al*, 2001). Essa mutação foi descrita pela primeira vez na Holanda e culmina com a produção de um peptídeo truncado, ou seja, a proteína, que é o receptor de LDL, não é sintetizada corretamente (LOMBARDI *et al*, 2000). A mutação já foi identificada em indivíduos japoneses (MIYAKE *et al*, 2009) e poloneses (CHMARA *et al*, 2010). No presente estudo, a família na qual a mutação foi identificada reporta ter origem polonesa e ucraniana. As ferramentas de predição utilizadas para a análise *in silico* indicaram que esta mutação é patogênica e apresenta baixa prevalência de $8,42^{-6}$ (< 1:100.000). Conforme descrito por Lombardi *et al* (2000), essa mutação pode ser identificada por análise com a enzima de restrição *PstI* e *primers* específicos que introduzem um sítio de restrição que, para o rastreamento em cascata, facilita e diminui ainda mais os custos e o tempo de análise. O exon 4, onde essa mutação se encontra, corresponde à região do *LDLR* com maior número de mutações e codifica uma parte importante do domínio de ligação da proteína LDLR. Portanto, as mutações nesse exon, com frequência, causam disfunção do LDL-R (TATISHCHEVA *et al*, 2001). A realização da análise *in silico* e o conhecimento das características de cada mutação é importante para entender a patogenicidade ou não da mutação, além de permitir a escolha do tratamento adequado a fim de garantir o sucesso da terapia medicamentosa.

Além disto, no presente estudo foram identificados dois polimorfismos com alta prevalência em todo o mundo: 1413A>G e 1773C>T. O polimorfismo 1413A>G também foi identificado nos tios e irmãos do caso índice (indivíduos 4, 5, 10, 12 e 15). Da mesma forma, o 1773C>T foi identificado nos irmãos e num primo (indivíduos 11, 12, 15 e 18) do caso índice.

No exon 10, o polimorfismo 1413A>G corresponde à substituição do nucleotídeo A por G na posição 1413 do *LDLR*, modificando o códon

AGA na posição 471 da cadeia proteica pelo códon AGG, porém, ambos codificam o aminoácido arginina. Esse polimorfismo silencioso foi identificado pela primeira vez em caucasianos do sul da África (WARNICH *et al*, 1992) e, posteriormente, na Rússia em 2001 (TATISHCHEVA *et al*, 2001). O alelo possui uma prevalência de mais de 50%, sendo, portanto, benigno (TATISHCHEVA *et al*, 2001).

No exon 12, o polimorfismo 1773C>T corresponde à substituição do nucleotídeo C por T na posição 1773 do *LDLR*, modificando o códon AAC na posição 591 da cadeia proteica pelo códon AAT, ambos codificam o aminoácido asparagina. Apesar de ser também um polimorfismo silencioso, concentrações mais elevadas de LDL-c foram descritas nos portadores do polimorfismo quando comparadas àquelas de indivíduos sem o polimorfismo (BORIGHT *et al*, 1998). O polimorfismo já foi identificado na Rússia (ZAKHAROVA *et al*, 2001) e no Marrocos (MESSAL *et al*, 2003).

Os polimorfismos 1413A>G e 1773C>T não culminam com mudanças de aminoácidos. Assim, são denominados polimorfismo do tipo silencioso e, a princípio, não se espera que afetem a síntese proteica do receptor de LDL. No entanto, embora raras, já foram detectadas alterações silenciosas capazes de alterar o fenótipo, na medida em que, apesar de não ocorrer alteração no aminoácido expresso naquela posição, originou-se alteração no local de “*splicing*”, alterando a proteína sintetizada (BOURBON *et al*, 2007; ZHU *et al*, 2007; DEFESCHE *et al*, 2008). Zhu e colaboradores (2007) demonstraram que o polimorfismo 1773C>T pode modular a eficiência do *splicing* do exon 12 do *LDLR in vitro* e está associado com a diminuição do *splicing in vivo* e bem como com aumento do CT e LDL-c, que pode chegar a 10% em mulheres na pré-menopausa. Embora pouco modesto por si só, esse aumento pode modular a susceptibilidade à doença aterosclerótica, especialmente em combinação com outros fatores moduladores do colesterol (ZHU *et al*, 2007).

Além de poder afetar o *splicing*, as mutações neutras podem ser biomarcadores genéticos adequados, uma vez que podem rastrear sua herança nas gerações sucessivas, promovendo, portanto, possibilidades de estudar a ligação entre si e/ou em associação com mutações conhecidas (TATISHCHEVA *et al*, 2001). No presente estudo, esses polimorfismos silenciosos foram acompanhados por mutações que alteraram a proteína, por isso, é difícil afirmar se estão envolvidos com a HF. De qualquer forma, a análise *in silico* das mutações 1413A>G e

1773C>T as classificou como benignas e com prevalências de 62,6% e 37,8%, respectivamente.

Curiosamente, o polimorfismo 1773C>T foi associado com o aumento das concentrações do fator de coagulação VIII. Mesmo após um modelo de regressão ajustado para os principais determinantes da variabilidade do Fator VIII (sexo, idade, IMC, tabagismo, hipertensão, diabetes, LDL-c, HDL-c, TG, TFG estimada e PCR-as), a presença do alelo T permaneceu como um preditor significativo de Fator VIII (MARTINELLI *et al*, 2010). Por outro lado, não foi encontrada associação significativa com as variáveis lipídicas, tanto na população estudada quanto nos indivíduos sem terapia hipolipemiante. Consistente com as altas concentrações de Fator VIII, os portadores do alelo T estavam mais representados dentre os pacientes com DAC no estudo. Assim, esse polimorfismo pode estar relacionado com DCV independentemente dos lipídeos plasmáticos (MARTINELLI *et al*, 2010).

Uma irmã do caso índice com possível diagnóstico clínico de HF (indivíduo 10) apresentou apenas a mutação 1413A>G. Considerando que essa é uma mutação silenciosa e que a paciente apresentou placas ateroscleróticas, outros exons do *LDLR* foram genotipados e a mutação 919G>A foi encontrada. A mutação 919G>A confirmou o diagnóstico de HF nesse indivíduo e foi também encontrada nos tios e num irmão do caso índice (indivíduos 4, 5 e 15). A mutação 919G>A corresponde à substituição do nucleotídeo G pelo A na posição 919 do *LDLR*, modificando o códon GAT, correspondente ao aspartato, para AAT, correspondente à asparagina, na posição 307 da cadeia proteica. A análise *in silico* apresentou essa mutação como sendo “provavelmente patogênica”. Ela foi descrita pela primeira vez na República Tcheca (DUSKOVÁ *et al*, 2011).

Durante o sequenciamento do exon 6, também foi identificada a mutação 901G>A nos indivíduos 4 e 5. A mutação 901G>A, culmina com a substituição do códon GAC por AAC e, assim, modificando o aminoácido aspartato por asparagina na posição 301 da cadeia proteica. A posição 301 é o primeiro resíduo de uma sequência consenso altamente conservada de aminoácidos carregados negativamente e, assim, a substituição de um aminoácido negativamente carregado por um neutro pode afetar a conformação do receptor (MAVROIDIS *et al*, 1997). A análise utilizando as ferramentas de predição classificaram essa mutação como patogênica, entretanto, ela não foi descrita em outras populações até o momento. Como no presente estudo a mutação foi

identificada em apenas dois indivíduos, os quais também possuem outras mutações, ainda não é possível determinar com precisão quais são os efeitos de cada mutação no fenótipo do indivíduo. Assim, estudos funcionais com fibroblastos para avaliar a capacidade de transporte de LDL ou estudos populacionais são necessários para demonstrar definitivamente a patogenicidade do conjunto de mutações. Na mesma posição já foram descritas previamente mutações patogênicas envolvendo os aminoácidos alanina (D301A) no Reino Unido (WEBB *et al*, 1996), glicina na Grécia (MAVROIDIS *et al*, 1997) e tirosina (D301Y) no Japão (YU *et al*, 2002).

Nesta família de Papanduva-SC a presença de um casamento consanguíneo entre os indivíduos 16 e 17 aumenta a chance de seus descendentes serem portadores homozigóticos de HF. Entretanto, esses indivíduos e seus descendentes não apresentaram o diagnóstico de HF.

O segundo caso índice da família de Papanduva-SC (indivíduo 6) apresentava 284 mg/dL de LDL-c e utilizava uma dose diária de 40 mg de sinvastatina. A paciente é hipertensa, tem sobrepeso e obesidade abdominal e apresentava cerca de 33% de obstrução da artéria carótida esquerda. Além disto, é portadora de síndrome metabólica, o que aumenta seu risco cardiovascular devido à associação de fatores de risco. Ela apresentava sinais clínicos de HF, como xantomas e arco corneal. A genotipagem permitiu a identificação da mutação 632A>T, que confirma o diagnóstico de HF. Essa mutação não foi identificada em nenhum parente. A mutação 632A>T, no exon 4, é responsável pela substituição do nucleotídeo A pela Timina (T) na posição 632 do *LDLR*, modificando o códon CAC, correspondente ao aminoácido histidina na posição 211 da cadeia proteica, para o códon CTC, que traduz o aminoácido leucina. A substituição de um aminoácido com características básicas por um aminoácido apolar, pode impactar na conformação do LDL-R. As ferramentas de predição indicaram que essa é uma mutação patogênica, porém, não foram encontradas informações referentes à prevalência. A mutação 632A>T foi reportada pela primeira vez em crianças e adolescentes na Áustria em 2007 (WIDHALM *et al*, 2007).

A mãe do caso índice (indivíduo 2) possuía o diagnóstico clínico definitivo de HF, porém, apenas a mutação silenciosa 2232A>G foi encontrada no *LDLR*. A variante 2232A>G corresponde à substituição do nucleotídeo A pelo G na posição 2232 do *LDLR*, modificando o códon CGA por CGG na posição 744 da cadeia proteica. Ambos os códons codificam o aminoácido arginina e, dessa forma, não é esperado

nenhum efeito no receptor de LDL. As ferramentas de predição confirmaram se tratar de uma mutação benigna e de elevada prevalência mundial (0,776 ou 77,6%).

Mutações genéticas podem não ser encontradas em até 20-70% dos indivíduos com diagnóstico clínico positivo de HF. Pela análise do desempenho dos três principais critérios diagnósticos verificou-se que os critérios DLCN identificaram 62% de indivíduos mutantes positivos; Simon Broome identificou 52%; e os critérios MEDPED apenas 23% (MEHTA *et al*, 2016). Nesse mesmo estudo, foi verificado que o LDL-c > 170 mg/dL apresentou melhor sensibilidade e especificidade (99,5% e 97,5% respectivamente) para identificar os casos (MEHTA *et al*, 2016).

Um resultado negativo pode significar que as altas concentrações de colesterol do paciente não são devidos à HF. O diagnóstico clínico da HF tem um forte obstáculo na distinção entre pacientes com e sem HF, pois existe uma ampla sobreposição entre os valores de colesterol dos indivíduos (VAN AALST-COHEN *et al*, 2006; HARADA-SHIBA *et al*, 2012; HILGART; MERCER; THIRLAWAY, 2012; LANGSLET; OSE, 2013; NORDESTGAARD *et al*, 2013). De fato, o fenótipo entre um paciente com HF heterozigótica e um paciente com colesterol elevado devido ao estilo de vida é, na maioria das vezes, indistinguível após uma determinada idade, pois a concentração de colesterol aumenta naturalmente ao longo do tempo (STARR *et al*, 2008; SANTOS; FRAUCHES; CHACRA, 2015). Quanto mais idoso o paciente é, torna-se progressivamente mais difícil distinguir HF de não-HF, causando maior número de falsos positivos (STARR *et al*, 2008; SANTOS; FRAUCHES; CHACRA, 2015). As flutuações da concentração de LDL-c durante a adolescência também são motivo de preocupação para os programas de triagem que utilizam apenas concentrações de colesterol, tendo em vista que as concentrações nos meninos caem durante a puberdade e aumentam à medida que a idade adulta se aproxima, enquanto nas meninas, os valores de colesterol tendem a aumentar na puberdade (DANIELS *et al*, 2008).

A falta de precisão do teste de triagem também pode levar à ineficiência do rastreamento de HF. Se o teste for impreciso por causa de baixa sensibilidade, baixa especificidade, ou ambos, as proporções de "falso-positivo" e "falso negativo" serão altas, levando ao tratamento desnecessário ou não realizado, respectivamente (VAN AALST-COHEN *et al*, 2006; HILGART; MERCER; THIRLAWAY, 2012; SANTOS; FRAUCHES; CHACRA, 2015).

Quando o paciente apresentar fenótipo de HF mas não for encontrada nenhuma mutação no *LDLR* é recomendada a análise de outros genes já reconhecidos por estarem relacionados com a HF, como os genes *APOB* e *PCSK9*. O grande número de pacientes com HF aparentemente monogênica, mas sem variantes atualmente conhecidas, também sugere que outros genes, que ainda não foram identificados, podem causar HF (BRAENNE *et al*, 2016). Além disto, análises de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) podem ser úteis para a identificação de deleções ou duplicações no gene, que não são captadas pelo sequenciamento com o método de Sanger. A técnica MLPA é baseada na análise dos picos que se referem ao número de cópias de paciente comparadas a amostra controle. São utilizados pares de sondas de tamanhos diferentes especificamente posicionadas nos genes de forma uniforme, permitindo a amplificação somente das sondas que se ligaram às regiões alvo. Como o processo de amplificação é exponencial, perdas ou ganhos de material genético serão suficientes para gerar um sinal diferente daqueles obtidos em amostras controle (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2009). No caso do indivíduo 2, por exemplo, a análise por *Next Generation Sequence* (NGS) também não resultou na identificação de nenhuma mutação. Independente da presença de mutação, o fenótipo da paciente #2 é bastante severo e ela deve ser tratada com a finalidade de reduzir seu risco cardiovascular.

Um estudo com indivíduos com resultados genéticos negativos indicou que muitos participantes esperavam que o teste genético para HF detectasse alguma mutação por causa de seu histórico familiar de DCV e relataram sentir-se "aliviados" e/ou "desapontados" em resposta ao resultado negativo. Muitos participantes permaneceram incertos sobre a verdadeira causa de seu colesterol elevado (HILGART; MERCER; THIRLAWAY, 2012). A falta de um diagnóstico preciso pareceu dificultar que os participantes tivessem expectativas claras sobre sua própria saúde e cuidados com a saúde de seus filhos (HILGART; MERCER; THIRLAWAY, 2012). A maioria dos participantes interpretou o resultado do teste genético negativo para HF como significando que sua condição não era genética, e também expressou incerteza sobre a causa de sua condição. No entanto, em resposta a essa incerteza, alguns indivíduos se engajaram no processo de explorar causas alternativas ao aumento do colesterol (HILGART; MERCER; THIRLAWAY, 2012). Alguns participantes ainda atribuíram seu colesterol elevado à genética ou a uma combinação de fatores genéticos e de estilo de vida. Aqueles que estavam fortemente cientes de sua

história familiar estavam especialmente convencidos de haver algum tipo de elo para explicar sua história pessoal e familiar de colesterol elevado e DCV. Ao identificar fatores causais que contribuíram para a sua concentração elevada de colesterol, alguns participantes conseguiram encontrar sentido na sua condição e risco de DCV, independentemente do resultado inconclusivo do teste genético (HILGART; MERCER; THIRLAWAY, 2012).

Em nosso estudo, curiosamente, o filho do caso índice 8 (indivíduo 22) e sobrinho do caso índice 6, que apresentava o diagnóstico clínico de HF, não apresentou nenhuma das mutações presentes na família, mas apresentou as mutações 862G>A (E288K) e 928A>T (I310F), que também confirmam o diagnóstico de HF. A identificação dessas mutações foi algo inesperado considerando os achados na família. Destaca-se que em nosso estudo não foi realizado nenhum tipo de teste para confirmação de paternidade e, portanto, esse fator não será discutido.

A mutação 862G>A, encontrada no exon 6, corresponde à troca do nucleotídeo G do códon GAA pelo nucleotídeo A (AAA), levando à substituição do aminoácido ácido glutâmico na posição 288 da cadeia proteica pelo aminoácido lisina. Essa mutação foi descrita pela primeira vez na Alemanha (EBHARDT *et al*, 1999) e, posteriormente, também na Holanda (FOUCHIER *et al*, 2001), Nova Zelândia (BUNN *et al*, 2002), Portugal (BOURBON *et al*, 2008), Espanha (ETXEARRIA *et al*, 2012) e Itália (BERTOLINI *et al*, 2013). A análise *in silico* indicou que essa é uma mutação patogênica e possui prevalência de $3,296^{-5}$ (< 1:10.000). A patogenicidade da mutação foi confirmada por estudos com fibroblastos e microscopia confocal e de intensidade de fluorescência, as quais demonstraram que, apesar de a expressão do receptor da LDL não estar reduzida, há diminuição da ligação com a LDL, bem como também diminuição na internalização do complexo receptor-ApoB-LDL (ETXEARRIA *et al*, 2012).

Ainda no exon 6, a mutação 928A>T corresponde à substituição do nucleotídeo A por T na posição 928, levando à alteração do códon ATC para TTC e consequente substituição do aminoácido isoleucina por fenilalanina na posição 310 da cadeia proteica. Apesar de culminar com a troca de aminoácidos, ambos apolares, as ferramentas de predição indicaram que essa é uma mutação benigna. Entretanto, a mutação não foi descrita previamente, o que dificulta obter um diagnóstico preciso pelas ferramentas existentes. Estudos de co-segregação *in vivo* e estudos

funcionais em fibroblastos são necessários para confirmar a patogenicidade da variante.

Na família de Papanduva-SC, foi observada uma variedade de mutações no *LDLR*, bem como uma variedade de fenótipos. A presença concomitante de diferentes mutações dificulta a comparação entre os fenótipos. Alguns indivíduos, como o #13 e o #21, que possuem diagnóstico definitivo de HF, não apresentaram concentrações de LDL-c acentuadamente elevadas, que seria o esperado para portadores dessa doença. Além disto, também foi observada longevidade em alguns indivíduos com o diagnóstico de HF, como os indivíduos #4 e #5, que aos 77 e 89 anos, respectivamente, apesar de apresentarem concentrações elevadas de LDL-c, nunca tiveram eventos cardiovasculares. Por outro lado, foi observado elevado percentual de obstrução da artéria carótida em indivíduos sem o diagnóstico clínico e/ou genético e com concentrações de LDL-c moderadamente elevadas. Outra diferença identificada nos participantes de nosso estudo, é que indivíduos com a mesma mutação, por exemplo os indivíduos #8, #12 e #18 (666C>A), apesar de apresentarem concentrações semelhantes de LDL-c no momento da avaliação, apresentavam diferentes graus de obstrução das carótidas, sendo que o indivíduo #18 não apresentou obstrução. Além disto, o indivíduo #8 apresentava xantomas visíveis e palpáveis, enquanto o #12 e o #18, não. O indivíduo #8 estava em tratamento com hipolipemiante oral e supõe-se que suas concentrações basais de LDL-c seriam superiores. Além do indivíduo #8, observou-se que outros indivíduos, mesmo em tratamento com hipolipemiantes orais, permaneciam com concentrações de LDL-c consideravelmente elevadas, como nos casos dos indivíduos #15 (319 mg/dL) e #22 (410 mg/dL).

As associações entre o genótipo e o fenótipo na HF são extremamente importantes porque permitem uma estimativa clínica da gravidade produzida pela mutação e sua resposta ao tratamento e, assim, abrem espaço para o diagnóstico precoce de pacientes e seus parentes, aconselhamento familiar e manejo ideal. Entretanto, existe uma variabilidade muito grande no fenótipo clínico da HF, o que está parcialmente relacionado ao gene. Por exemplo, as concentrações de LDL-c nos portadores de mutação com ganho de função na *PCSK9* são geralmente maiores em comparação aos portadores de mutações no *LDLR* e *APOB*; por outro lado, mutações no gene *LDLR* causam, em geral, fenótipo mais grave do que mutações na *APOB*, *LDLRAP1* ou com perda de função da *PCSK9*. A variabilidade fenotípica também se deve ao tipo de defeito genético, como por exemplo, mutações *nonsense*

e *missense*, e outros fenômenos não completamente compreendidos (FAHED *et al*, 2011; SJOUBE *et al*, 2016; IACocca; HEGELE, 2017; HARTGERS *et al*, 2018). Em estudo envolvendo indivíduos portadores de HF homozigótica, observou-se que aqueles que não apresentavam mutações no *LDLR* tinham fenótipo mais suave, refletido por concentrações de LDL-c significativamente mais baixas. A prevalência de doenças cardíacas e vasculares também foi menor nos indivíduos não portadores da mutação no *LDLR*, mas não foi estatisticamente significativa (FAHED *et al*, 2011). Os pacientes sem mutação no *LDLR* também tiveram frequência significativamente menor de arco corneal, que foi mais marcante do que a diferença em xantomas, xantelasmas e doenças cardíacas e vasculares. Essa diferença marcante na frequência do arco corneal pode ser simplesmente devido às concentrações mais baixas de LDL-c. No entanto, como não foi observada a mesma diferença nos demais indicadores clínicos, suspeita-se de uma associação genética das mutações do *LDLR* com o arco corneal (FAHED *et al*, 2011).

Houve grandes esforços para determinar diferenças no fenótipo entre pacientes portadores de mutações em diferentes loci do gene *LDLR*; no entanto, a maioria desses foi mal sucedida (FAHED *et al*, 2011). Assim como no presente estudo, outros pesquisadores/autores também observaram variabilidade clínica e bioquímica mesmo entre indivíduos com a mesma mutação e na mesma família. A variabilidade pode ser devida a fatores ambientais e genéticos, como o genótipo de numerosos polimorfismos em muitos locais que, individualmente, modificam discretamente os valores sanguíneos de CT e LDL-c (VACA, 2011; BRAENNE *et al*, 2016).

Como o diagnóstico da HF heterozigótica é mais complicado que a homozigótica, e por ser muito mais prevalente em todo o mundo, a maioria dos estudos envolve populações heterozigotas. Estudos familiares em populações com HF homozigótica poderiam produzir, no entanto, melhor compreensão da doença e permitir melhores associações genótipo-fenótipo (FAHED *et al*, 2011).

Em geral, a presença de uma única mutação é identificada e suficiente para confirmar o diagnóstico genético de HF. É interessante destacar que, nesta família de Papanduva-SC, os indivíduos 4 e 5 apresentaram três variantes patogênicas, uma no exon 4 e duas no exon 6. Da mesma forma, o indivíduo 15 apresentou duas variantes envolvendo os exons 4 e 6 e o indivíduo 22 apresentou duas variantes no exon 6. A presença de mutações distintas no mesmo gene caracteriza o

indivíduo como heterozigoto composto, enquanto a presença de mutações em genes diferentes caracteriza um duplo heterozigoto (SJOUBE *et al*, 2016; HARTGERS *et al*, 2018). Com exceção do indivíduo 5, os outros três indivíduos caracterizados no estudo como heterozigotos compostos apresentaram concentrações de LDL-c maiores que 300 mg/dL, valor superior à média da família (257 mg/dL).

Os heterozigotos compostos ou duplo heterozigotos, em geral, apresentam um fenótipo intermediário entre os heterozigotos e os homozigotos (SJOUBE *et al*, 2016; AL-ALLAF *et al*, 2017; HARTGERS *et al*, 2018). Embora as consequências clínicas de mutações heterozigotas e homozigotas em um dos genes que causam a HF sejam descritas frequentemente, pouco se sabe sobre os fenótipos de portadores duplos heterozigotos ou heterozigotos compostos. A grande sobreposição de fenótipos dentro do espectro de portadores de mutação relacionadas à HF pode explicar a subnotificação dos heterozigotos duplos ou compostos e sugere que este diagnóstico é facilmente perdido (SJOUBE *et al*, 2016). Existem relatos de que pacientes homozigotos ou heterozigotos compostos para mutações no *LDLR* ou heterozigotos duplos para *LDLR* e mutações no gene *APOB* têm valores mais altos de LDL-c, xantomatose mais extensa e DAC prematura mais grave do que heterozigotos simples (AL-ALLAF *et al*, 2017; HARTGERS *et al*, 2018). A questão que permanece em discussão é se um diagnóstico genético “em dobro” têm relevância clínica quando os pacientes já são diagnosticados fenotipicamente e adequadamente tratados com terapia hipolipemiante (SJOUBE *et al*, 2016). No entanto, é de importância clínica perceber que essa população deve ser educada diferentemente em relação à herança, uma vez que a herança de dois distúrbios monogênicos combinados difere daqueles de um único distúrbio monogênico, pois quatro genótipos diferentes podem ser identificados nos pais e filhos de um portador de mutação dupla (SJOUBE *et al*, 2016). Desta forma, a informação pode ser útil no aconselhamento genético familiar em relação à prole de casamentos consanguíneos.

6.2.2 Rastreamento em cascata em Bom Despacho-MG

Na família de Bom Despacho-MG, 88 indivíduos foram avaliados, sendo o indivíduo mais jovem com 5 anos e o mais idoso com 82 anos.

Mais da metade dos participantes (60,2%) revelaram ter histórico familiar de DCV prematura e quase todos (93,2%) relataram ter parentes com CT elevado. Apesar da alta prevalência de dislipidemia na família,

a maioria dos participantes desconhecia a presença de sinais clínicos de HF em parentes, fato que foi relatado por apenas 9,1% dos participantes. Assim como na família de Papanduva-SC, foi observado que os indivíduos desta família de Bom Despacho-MG apresentaram respostas distintas sobre seu histórico familiar. A falta de conhecimento e a falta de sinais clínicos dificultam o diagnóstico de HF quando a genotipagem não é realizada.

A análise do perfil lipídico desta família de Bom Despacho-MG mostrou que 52,3% dos indivíduos apresentavam CT elevado, enquanto o LDL-c esteve elevado em 65,9%. Apesar disso, apenas 30,7% apresentavam concentrações séricas de LDL-c sugestivas de HF. Esses percentuais divergem dos 45,4% de pacientes diagnosticados com HF após a genotipagem, embora sem diferença significativa ($p = 0,062$). Apesar do alto índice de diagnóstico de HF nessa família, nenhum indivíduo relatou ter DAC cerebral ou periférica prematura e, assim como em Papanduva-SC, os pacientes atingiram uma idade consideravelmente maior do que o esperado.

Nesta família de Bom Despacho-MG, um percentual maior de indivíduos (61,4%) reportou ter realizado previamente a análise bioquímica do perfil lipídico. Apesar disso, 20 indivíduos que apresentaram dislipidemia nunca haviam realizado a análise sérica do perfil lipídico, indicando desconhecimento sobre a gravidade da doença na família. Cinco indivíduos que indicaram ter dislipidemia, mas estavam em tratamento, não apresentaram valores alterados dos lipídeos, o que, apesar de indicar que o tratamento está sendo efetivo, também dificulta o diagnóstico de HF devido à ausência de sinais e sintomas. Na família de Bom Despacho-MG, 34% dos indivíduos estavam em tratamento com hipolipemiantes.

Em Bom Despacho-MG, um patriarca (indivíduo 36) foi o caso índice, o que possibilitou o rastreamento de seus descendentes, bem como de seus irmãos. O caso índice possui 75 anos de idade e, apesar de estar em tratamento com hipolipemiante, apresentava concentrações séricas de 305 mg/dL de LDL-c, sendo que 93,4% corresponde a partículas pequenas e densas. Apesar de nunca ter sofrido infarto ou AVC, 71,6% da artéria carótida direita e 74,7% da artéria carótida esquerda estavam obstruídas, indicando doença aterosclerótica avançada e alto risco cardiovascular. O paciente apresentava, ainda, outras comorbidades como hipertensão, obesidade e obesidade abdominal.

O caso índice possuía um diagnóstico clínico provável de HF, que foi confirmado após a genotipagem do *LDLR*, que permitiu a identificação das mutações 670G>A, 862G>A, 919G>A e 2232A>G.

A mutação 670G>A, encontrada no exon 4, corresponde à troca do nucleotídeo G do códon GAC pelo nucleotídeo A (AAC), levando à substituição do aminoácido aspartato na posição 224 da cadeia proteica pelo aminoácido asparagina. A mutação gera um receptor com menos de 2% de sua atividade normal e já foi descrita anteriormente em portugueses (HOBBS; BROWN; GOLDSTEIN, 1992) e canadenses (WANG; BAN; HEGELE, 2005). Essa mutação é, provavelmente, a mais importante identificada nesta família de Bom Despacho-MG, estando presente em 26 indivíduos genotipados, sendo eles os filhos e netos do caso índice, e também em primos e sobrinhos de 2° e 3° graus do caso índice.

A mutação 862G>A, também descrita em um indivíduo da família de Papanduva-SC, não teve prevalência tão acentuada, sendo encontrada apenas em uma filha e dois netos do caso índice.

A mutação 919G>A, também descrita anteriormente em alguns membros da família de Papanduva-SC, foi encontrada em 14 indivíduos da família de Bom Despacho-MG. Essa mutação também possui importância diagnóstica para os membros dessa família pois, como já comentado, por apresentarem mutações em exons diferentes são classificados como heterozigóticos compostos. Essa característica pode aumentar o risco cardiovascular dos portadores. É interessante notar que essa mutação, além de estar presente nos membros com conexão sanguínea ao caso índice, também foi identificada nos indivíduos 30, 38, 80 e 87, o que pode indicar maior prevalência da mutação 919G>A em famílias brasileiras.

A mutação 2232A>G no exon 15, também descrita em um indivíduo de Papanduva-SC, foi identificada em diversos indivíduos da família de Bom Despacho-MG, entretanto, por ser mutação silenciosa, não tem valor para diagnóstico da HF.

Em Bom Despacho-MG, uma das filhas do caso índice (indivíduo 39), que não apresentou diagnóstico clínico de HF, casou-se com o indivíduo 38, que foi diagnosticado com a doença e, além de apresentar as mutações 670G>A e 919G>A, apresentou também as mutações 661G>A, 682G>A. Um dos filhos do casal (indivíduo 54) apresentou três mutações também encontradas no pai e uma no avô materno. É importante ressaltar que a associação das mutações pode prejudicar ainda mais o fenótipo do paciente e aumentar o seu risco cardiovascular.

Além disto, a associação dificulta a determinação do papel de cada mutação no fenótipo. Nesse caso, o indivíduo 54, assim como seu pai, apresentou xantomas tendinosos, sinais característicos de HF, apesar de ambos apresentarem concentrações de LDL-c menores se comparadas à irmã (indivíduo 55) e ao avô materno (indivíduo 36), que apresentavam mutações diferentes e maior concentração de LDL-c, porém não apresentavam xantomas. Dessa forma, é razoável supor que as mutações presentes no indivíduo 38 estejam mais relacionadas com o surgimento de xantomas, independente das concentrações lipídicas.

A mutação 661G>A, encontrada no exon 4, culmina com a substituição do codon **GAC** por **AAC**, modificando o aminoácido aspartato por asparagina na posição 221 da cadeia proteica. Desta forma, ocorre a substituição de um aminoácido carregado negativamente e que é importante para a atividade de ligação do ligante, por um aminoácido fracamente bipolar. O códon 221 parece ser um ponto mutacional no qual várias outras mutações patogênicas foram detectadas (EBHARDT *et al*, 1999). A mutação já foi identificada em ingleses (SUN; PATEL; KNIGHT; SOUTAR, 1997) alemães (EBHARDT *et al*, 1999), coreanos (KIM *et al*, 2004), noruegueses (LEREN *et al*, 2004) e holandeses (FOUCHIER; KASTELEIN; DEFESCHE, 2005).

A mutação 682G>A, também no exon 4, corresponde à troca do códon **GAG** por **AAG**, o que leva à substituição do ácido glutâmico por lisina na posição 228 da cadeia proteica. Essa mutação origina a troca de um aminoácido básico por um aminoácido ácido, e essa mudança prejudica o transporte do receptor da LDL do retículo endoplasmático para a superfície celular (LEITERSDORF *et al*, 1990). Essa variante foi identificada pela primeira vez em franco-canadenses (LEITERSDORF *et al*, 1990), mas também foi descrita em indivíduos de ascendência italiana (HOBBS; BROWN; GOLDSTEIN, 1992; BERTOLINI, 2000), mexicano-americana (HOBBS; BROWN; GOLDSTEIN, 1992), em holandeses (PIMSTONE *et al*, 1997), chineses (PIMSTONE *et al*, 1998; CHANG *et al*, 2003) e mexicanos (VACA *et al*, 2011). A mutação 682G>A resulta em uma proteína (LDL-R) com menos de 2% de atividade normal em células cultivadas. Mutações na extremidade 3' do exon 4 do *LDLR* são causa comum de HF e alterações de base única idênticas nessa região curta, especialmente em dinucleotídeos CG, ocorrem em diferentes populações. Assim, é pouco provável que a mutação tenha sido herdada de um ancestral comum (PIMSTONE *et al*, 1998).

A mutação 1959T>C, encontrada no exon 13, corresponde à troca do nucleotídeo T do códon GTT pelo nucleotídeo C (GTC), ambos os códons codificam o aminoácido valina na posição 653 da cadeia proteica. A mutação tem prevalência de 0,409 (40,9%) e já foi descrita no Marrocos (MESSAL *et al*, 2003), na Rússia (KOMAROVA *et al*, 2013) e na Polônia (SHARIFI *et al*, 2016).

No exon 15, a mutação 2177C>T corresponde à substituição do nucleotídeo C por T na posição 2177, levando à alteração do códon ACC para ATC e consequente substituição do aminoácido treonina por isoleucina na posição 726 da cadeia proteica. A mutação pode ser identificada utilizando a enzima de restrição NsiI. Apesar de a mutação culminar com a troca de aminoácido, as ferramentas de predição não são unânimes em prever sua patogenicidade. Entretanto, estudos com co-segregação de indivíduos indicaram que é uma variante benigna, ou seja, não estaria relacionada com a HF (LOMBARDI *et al*, 1997; EBHARDT *et al*, 1999). Além disto, a variante já foi identificada em indivíduos normocolesterolemicos (LOMBARDI *et al*, 1997). Por outro lado, na presença de outras mutações específicas (combo), a associação das variantes pode ser patogênica (LOMBARDI *et al*, 1997; EBHARDT *et al*, 1999; FAHED *et al*, 2011). Por exemplo, há apenas 15-30% de atividade do receptor de LDL quando a mutação 2177C>T está associada com a mutação 718G>A (E240K). Além disto, a presença da variante heterozigótica C681X pode piorar o fenótipo clínico, motivando o início precoce e aumentando a gravidade da doença (FAHED *et al*, 2011). A mutação foi descrita pela primeira vez em franceses (HOBBS; BROWN; GOLDSTEIN, 1992; LOUX *et al*, 1992) e, posteriormente, também em holandeses (LOMBARDI *et al*, 1995), ingleses (DAY *et al*, 1997), alemães (EBHARDT *et al*, 1999; BRAENNE *et al*, 2016), noruegueses (LEREN *et al*, 2004), libaneses (FAHED *et al*, 2011), mexicanos (VACA *et al*, 2011), italianos (BERTOLINI *et al*, 2013) e poloneses (SHARIFI *et al*, 2016).

6.2.3 Mutações identificadas no Brasil e no mundo

A carga causada pela HF varia entre países e grupos étnicos. As principais informações existentes atualmente sobre a HF são proveniente de estudos de coorte Europeus ou de países com registros nacionais. Na América Latina, a prevalência de HF é praticamente desconhecida e há falta de conscientização pública em relação à HF (MEHTA *et al*, 2016). Considerando a população brasileira em torno de

220 milhões de habitantes, e a estimativa de prevalência de casos heterozigotos de HF de 1/200 a 1/500 casos, existe a expectativa de 400.000 a 670.000 portadores de HF no país, sendo menos de 1% diagnosticados (JANNES *et al*, 2015).

Embora algumas das mutações aqui encontradas já tenham sido relatadas em outros países, apenas uma das mutações (682G>A) identificadas nas famílias estudadas foi descrita em estudos realizados no Brasil (JANNES *et al*, 2015; MOLFETTA *et al*, 2017). No entanto, deve-se considerar que o Brasil é um país multirracial e, assim, espera-se que uma população tão heterogênea abrigue uma série de novas mutações genéticas. Neste contexto, é importante notar que apenas alguns estudos com HF no Brasil foram encontrados na literatura. Uma recente revisão sobre a HF na América Latina identificou apenas nove estudos no Brasil, incluindo relatos de caso e estudos de coorte, publicados entre 1992 e 2015 (MEHTA *et al*, 2016).

Os primeiros relatos de mutações relacionadas com a HF no Brasil, ocorreram na região de São Paulo e reportaram origem libanesa, que inicialmente era considerada a causa mais comum da doença no Brasil (JANNES *et al*, 2015). É provável que, quanto maior o número de indivíduos triados em diferentes regiões do país, maior será o número de mutações identificadas. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a população do país é composta principalmente de descendentes de portugueses, africanos, espanhóis, italianos, sírios, libaneses, alemães e japoneses. Assim, mais estudos são necessários para comparar as mutações identificadas em nossa população com as desses países e, então, entender a origem das mutações (JANNES *et al*, 2015).

A delimitação das mutações no gene *LDLR* em uma população representa um pré-requisito para a implementação de testes genéticos nacionais para HF. A estimativa de prevalência de mutações específicas, bem como a compilação de uma base de dados de todas as mutações causadoras de HF em um determinado país, podem facilitar a seleção da abordagem de diagnóstico molecular mais apropriada (LOMBARDI *et al*, 2000).

Com base nos resultados genéticos que confirmaram o diagnóstico de HF nos pacientes aqui descritos, há necessidade de rastrear geneticamente outras famílias para o diagnóstico precoce de HF, possibilitando o tratamento adequado para prevenir a morbidade e mortalidade por DCV prematura (WATTS *et al*, 2014; BRAUTBAR *et al*, 2015).

6.3 IMPACTOS DO DIAGNÓSTICO DE HF

De fato, o impacto do diagnóstico se estende além do paciente afetado para vários parentes e em inúmeras gerações (BRAUTBAR *et al*, 2015). Além da presença ou ausência de uma mutação no gene *LDLR*, as diferenças no prognóstico devido ao tipo de mutação também podem influenciar a iniciação do tratamento hipolipemiante (VAN AALST-COHEN *et al*, 2006). Definitivamente, existem situações nas quais saber o genótipo pode afetar as decisões de tratamento. Os exemplos mais óbvios são os indivíduos HFHo, cujo curso de doença e necessidades de tratamento são dramaticamente diferentes daqueles com HFHe. A confirmação de mutações que afetam ambos os alelos do *LDLR* ou outro gene causador (homozigose simples ou heterozigose composta) ou mutações dentro de dois genes diferentes (heterozigose dupla) tem implicações para modalidades de tratamento específicas para essas condições, como plasmáferese, mipomersen ou lomitapide. Além disto, considerando que a PCSK9 se liga ao LDL-R e induz sua degradação por endocitose impedindo a reciclagem para a superfície celular, a inibição da PCSK9 com o anticorpo monoclonal reduz os valores de LDL-c aumentando a quantidade de LDL-R na superfície dos hepatócitos, resultando em maior captação de partículas de LDL. Assim, o modo de ação do anticorpo envolve *LDLR*, ApoB e PCSK9 (e provavelmente outras proteínas, tais como o *LDLRAP1*, que interagem com o *LDLR*), e mutações nos genes que codificam essas proteínas poderiam afetar o efeito do tratamento (HARTGERS *et al*, 2018). A heterogeneidade em resposta à inibição de PCSK9 foi observada em pacientes com HFHo, dependendo do seu genótipo: indivíduos com pelo menos um alelo *LDLR* com função residual prevista (ou seja, "defeito do receptor") apresentaram redução de 25% de LDL-c com evolocumab, enquanto indivíduos que apresentaram duas mutações *LDLR* nulas não apresentaram resposta a esse tratamento (IACOCCA; HEGELE, 2017).

Além disto, conforme comentado anteriormente, nos pacientes com HF, o tipo de mutação prevê amplamente o grau de elevação de LDL-c. Indivíduos com mutações heterozigóticas nos genes *APOB* ou *PCSK9*, ou indivíduos com alta carga poligênica, em geral, podem ser mais frequentemente gerenciados com estatina em monoterapia do que indivíduos com mutações heterozigóticas de *LDLR*, que mais frequentemente exigem terapia combinada. Além disto, dentre as mutações do *LDLR*, a elevação do LDL-c é maior nos indivíduos com

mutações de *Copy Number Variation* (CNV), *nonsense* e *splicing* do que naqueles com mutações *missense*, indicando, novamente, a necessidade de tratamento mais agressivo usando combinações ou novos tratamentos biológicos, como inibidores da PCSK9 (IACOCCA; HEGELE, 2017). A informação mutacional também pode ser importante para o aconselhamento genético. Um resultado de teste genético positivo pode ter impacto positivo na atitude do paciente e do profissional de saúde; muitos pacientes acham a informação poderosa e motivadora, especialmente porque muito pode ser feito para reduzir o desenvolvimento de sinais clínicos e eventos cardiovasculares (IACOCCA; HEGELE, 2017). Um estudo norueguês identificou em seguimento de 6 meses após o teste genético que 31,3% dos 146 familiares afetados relataram mudanças na dieta e 53,4% relataram mudanças na terapia medicamentosa subsequente ao teste genético (LEREN *et al*, 2004).

No contexto econômico, o rastreo genético em cascata de parentes de casos índice é mais fácil e altamente custo-efetivo, uma vez que 50% deles herdam a mutação (HOVINGH *et al*, 2013; NORDESTGAARD *et al*, 2013; WATTS *et al*, 2014; WIEGMAN *et al*, 2015). Além disto, os testes moleculares têm, praticamente, sensibilidade e especificidade de 100% para os parentes do primeiro grau do caso índice, enquanto o diagnóstico clínico de HF na prática geral tem 46% de sensibilidade e 88% de especificidade (LEREN *et al*, 2008; WIEGMAN *et al*, 2015).

As avaliações econômicas de saúde mostraram que o custo por ano de vida obtido para o rastreamento em cascata com base no DNA e na terapia intensiva para HF é comparável a outras estratégias de triagem, como por exemplo, mamografia para câncer de mama (WONDERLING *et al*, 2004; LEREN *et al*, 2008; ADEMI *et al*, 2013; PEARS *et al*, 2015; WIEGMAN *et al*, 2015). Na Holanda, 26 infartos do miocárdio foram evitados por cada 100 pessoas diagnosticadas e tratadas com estatinas entre 18 e 60 anos. O custo anual de vida obtido (CAV) foi de USD 8,700 (WONDERLING *et al*, 2004), enquanto o CAV para prevenção secundária em indivíduos não portadores de FH foi estimado em USD 13,300 (LEREN *et al*, 2008). Na Austrália, para cada 100 pessoas testadas, houve ganho global de aproximadamente 25 anos de vida e 29 anos de vida com qualidade ajustados (QALY), com índice de custo-efetividade incrementado (ICE) em 4,155 AUD (USD 5,850) por anos de vida salvos e AUD 3,565 (USD 5,093) por QALY ganhos (ADEMI *et al*, 2013). Na Austrália, uma intervenção associada ao ICE de 15,000 AUD por anos de vida ganho e AUD 45,000 para QALY é

considerada rentável (ADEMI *et al*, 2013). Um estudo do Reino Unido estimou que o rastreamento em cascata baseado no DNA para identificar e tratar parentes afetados tinha um ICE de £ 3,666 por QALY ganho, bem abaixo do limiar da ICE para custo-efetividade (£ 20,000) (NHERERA *et al*, 2011).

O principal responsável pelo custo do rastreamento em cascata não é o teste de DNA, mas o tratamento (cerca de 80%) ao longo da vida útil do parente identificado (MARANG-VAN DE MHEEN *et al*, 2002; PEARS *et al*, 2015). Além disto, vale mencionar que a análise dos genes associados à HF precisa ser realizada apenas uma vez na vida e o fato de se procurar em parentes apenas a mutação identificada no caso índice reduz significativamente o custo da análise (TADA *et al*, 2017).

6.4 PERSPECTIVAS PARA O DIAGNÓSTICO DE HF

Durante os últimos anos, métodos de alto rendimento baseados no *Next Generation Sequence* (NGS) tornaram-se disponíveis para análises de DNA (VANDROVCOVA *et al*, 2013; IACOCCA; HEGELE, 2017). A maioria dos métodos NGS, independentemente da sua química de sequenciamento, tem três componentes principais: 1) fragmentação do DNA de origem em milhões de pequenos fragmentos aleatórios, que são usadas para preparar bibliotecas de sequenciamento; 2) amplificação e enriquecimento, geralmente imobilizando o DNA, o que agiliza centenas de milhares de reações químicas simultâneas e; 3) detecção dos sinais dessa série maciça de reações de sequenciamento (IACOCCA; HEGELE, 2017). Dada a grande quantidade de dados gerados, é fundamental ter um *pipeline* de bioinformática integrado e validado, que reúne a leitura de milhões de sequências de fragmentos pequenos sobrepostos em uma série de grandes informações de sequência contínuas. A sequência da amostra é então comparada com um banco de dados de referência do genoma humano, gerando uma lista menor e gerenciável de variações na sequência. Utilizando novos critérios de priorização, variantes potencialmente patogênicas ou causais relacionadas ao fenótipo de interesse (ou seja, HF) são retiradas dessa lista e avaliadas, às vezes, manualmente (IACOCCA; HEGELE, 2017). Estes métodos de NGS não só demonstraram sucesso na identificação de novos genes relacionados à doença, mas, após a disponibilidade de sequenciadores "de bancada" econômicos, também se tornaram mais facilmente aplicáveis ao sequenciamento direcionado para diagnóstico. A combinação de alto rendimento e a seleção de alvos de DNA

relativamente pequenos, permite que muitos genes e amostras sejam processados simultaneamente, tornando-se uma solução atraente para o processamento de grande número de amostra em um laboratório de diagnóstico de rotina. Além disto, o *design* flexível desses ensaios permite que a triagem molecular seja estendida a outros genes e polimorfismos relevantes que não são cobertos por testes de rotina (VANDROVCOVA *et al*, 2013; IACocca; HEGELE, 2017). Acredita-se que no futuro essa tecnologia será utilizada em laboratórios de rotina, o que irá colaborar com o aumento no rastreamento de novos casos da doença e, conseqüentemente, com o aumento de indivíduos tratados e com menor chance de eventos cardiovasculares. Enquanto os custos e dificuldades de operação e pessoal qualificado impedem que a técnica seja utilizada na rotina da maioria dos laboratórios, o sequenciamento de Sanger continua sendo uma ferramenta viável e com resultados satisfatórios para o diagnóstico de mutações.

6.5 RISCO CARDIOVASCULAR DE PACIENTES COM HF

A exposição às concentrações muito elevadas de LDL-c ao longo da vida pode explicar o fato de que pacientes com HF apresentam alto risco de DCV (KHERA *et al*, 2016; PANG, 2016; WONG *et al*, 2016; PAQUETTE; BAASS, 2018). Em nosso estudo, conforme esperado, os indivíduos diagnosticados com HF apresentaram concentrações de CT, LDL-c e não-HDL-c significativamente maior que aqueles sem o diagnóstico de HF ($p < 0,0001$), o que culminou com prevalência significativamente maior de indivíduos com esses parâmetros elevados ($p = 0,0001$). Observou-se ainda que, enquanto a maioria dos pacientes com HF apresentava concentrações de LDL-c acima de 155 mg/dL, cerca de 85% dos pacientes sem HF apresentavam concentrações inferiores a esse valor. Além disto, apenas indivíduos com HF apresentaram valores de LDL-c acima de 250 mg/dL.

Em relação à concentração de LDL-c e a presença ou não de mutações relacionadas à HF, quando comparados a um grupo de referência com LDL-c < 130 mg/dL e sem mutação, os participantes com LDL-c ≥ 190 mg/dL e sem mutação apresentaram risco 6 vezes maior para DAC (OR 6,0; IC95% 5,2-6,9) enquanto aqueles com LDL-c ≥ 190 mg/dL e com mutação tiveram risco aumentado em 22 vezes (OR 22,3; IC95% 10,7-53,2) (KHERA *et al*, 2016). Após ajuste para LDL-c, a razão de chance para DAC em portadores de alguma mutação

relacionada à HF foi 4,2 [IC 95%; 1,9-10,4] e para indivíduos sem a mutação foi 1,6 (IC 95%; 1,3-2,1) (KHERA *et al*, 2016).

Embora o risco cardiovascular em pacientes com HF seja impulsionado principalmente pelo grau de elevação do LDL-c, o risco de DAC na HF não se deve apenas ao LDL-c e a sua gravidade e expressão clínica é variável dentro da mesma família, apesar de todos os parentes carregarem o mesmo defeito genético (SHARIFI; RHAKIT; HUMPHRIES; NAIR, 2016).

Apesar de os pacientes deste estudo não se reportarem portadores de DCV, dentre os 53 indivíduos com diagnóstico clínico e/ou diagnóstico genético definitivo de HF, 42 (79,2%) pacientes foram reclassificados como em “muito alto risco cardiovascular”. A avaliação ultrassonográfica fornece evidências diretas de doença vascular prematura, mesmo na ausência de sinais e sintomas da doença. Nos pacientes de Papanduva-SC, placas ateroscleróticas foram identificadas em 15 indivíduos (42,8%), sendo nove (60,0%) com o diagnóstico de HF confirmado. Em Bom Despacho-MG, 17 indivíduos (19,3%) apresentaram placas ateroscleróticas, sendo 12 (70,6%) com diagnóstico de HF. Um estudo identificou que, dentre os pacientes com HF, os indivíduos portadores de alelos nulos do *LDL-R* tiveram maiores medidas da espessura da camada íntima-média da carótida (EIMC) do que aqueles com alelos defeituosos do *LDL-R*. A EIMC em pacientes com HF pode ajudar a diferenciar pacientes com formas graves de HF, com aterosclerose mais avançada e que estão em maior risco de DCV (SHARIFI; RHAKIT; HUMPHRIES; NAIR, 2016).

Em Papanduva-SC, 45,7% dos indivíduos relataram ter histórico familiar de parentes de 1º grau portador de doença vascular coronariana prematura, enquanto em Bom Despacho, o número foi 60,2%. A história familiar de um evento coronariano precoce em parentes de primeiro ou segundo grau geralmente coloca o paciente em maior risco (SHARIFI; RHAKIT; HUMPHRIES; NAIR, 2016).

Mesmo em pacientes com HF geneticamente confirmada, a idade em que ocorre a DCV varia de acordo com o ambiente, estilo de vida e fatores genéticos que têm impacto na gravidade da doença (PANG, 2016; WONG *et al*, 2016; PAQUETTE; BAASS, 2018). Embora não haja dúvidas sobre a necessidade de início precoce da terapia em todos os pacientes com HF, fatores de risco adicionais podem ajudar a estratificar o risco de DCV em indivíduos com HF e poderia orientar a intensidade do tratamento farmacológico (WONG *et al*, 2016; PAQUETTE; BAASS, 2018).

Em nosso estudo, não houve diferenças significativas nas prevalências de HDL-c baixo, hipertrigliceridemia e hiperglicemia, e indicadores de função hepática, renal e de inflamação subclínica alterados entre indivíduos com e sem HF. Também não foi observada diferença de peso, obesidade abdominal, hipertensão e esteatose entre indivíduos com e sem HF. O risco de DAC na HF é aumentado pela presença de hipertensão, diabetes, tabagismo, obesidade, insuficiência renal e Lp (a) elevada (PANG, 2016; SHARIFI; RHAKIT; HUMPHRIES; NAIR, 2016; WONG *et al*, 2016; PAQUETTE; BAASS, 2018). Entretanto, os fatores de risco de DCV bem estabelecidos na população geral podem não ter a mesma importância na HF, devido à chance de o risco ser subestimado e, além disto, vale notar que as diretrizes atuais sobre o manejo dessa doença não abordam adequadamente a questão da estratificação de risco (PANG, 2016; SHARIFI; RHAKIT; HUMPHRIES; NAIR, 2016; PAQUETTE; BAASS, 2018).

Apesar da dificuldade de estratificar o risco, a análise de regressão multivariada de pacientes com HF mostrou que o aumento da idade (OR, 1,07; IC 95%, 1,06 - 1,09), IMC (OR, 1,05; IC 95%, 1,02 - 1,09), diabetes tipo 2 (OR, 1,58; IC95%, 0,95 - 2,61), hipertensão arterial (OR, 1,83; IC95%, 1,27 - 2,63), tabagismo (OR, 2,50; IC95%, 1,82 - 3,44) e Lp (a) superior a 50 mg/dL (OR, 2,14; IC95%, 1,57 - 2,92) foram independentemente associados à presença de DCV. Como os pacientes e controles pertenciam às mesmas famílias, a história familiar de DCV precoce não foi associada à presença de DCV (ISLA *et al*, 2016).

Conforme esperado, o percentual de indivíduos com xantomas, arco corneal e placas ateroscleróticas foi significativamente maior dentre os indivíduos com HF quando comparados aos indivíduos sem HF ($p = 0,0001$; $0,0009$ e $0,014$, respectivamente). Ressalta-se que nenhum indivíduo sem HF apresentou xantomas ou arco corneal. Por causa da semelhança lipídica e celular entre os xantomas e as placas ateroscleróticas (constituídos principalmente por colágeno e células espumosas), é concebível que os indivíduos com HF e xantomas possam ter maior predisposição para a aterosclerose (CIVEIRA *et al*, 2005; OOSTERVEER *et al*, 2009). De fato, a presença de xantomas foi associada à DAC prematura. Essa forte associação costuma estar presente em todas as idades, mas foi mais pronunciada em mulheres em qualquer idade e em homens com menos de 51 anos (CIVEIRA *et al*, 2005). Em outro estudo, foi observado que em pacientes com HF geneticamente confirmada, os xantomas foram associados a risco 3,2

vezes maior de DCV (IC95% 2,12 - 4,82, $p < 0,01$) (OOSTERVEER *et al.*, 2009).

Pacientes com diagnóstico clínico definitivo de HF apresentaram maior razão de chance de mortalidade por DAC do que aqueles com diagnóstico clínico possível de HF (2,94 e 2,05, respectivamente). Como uma mutação pode ser encontrada em 80% dos pacientes com HF definitiva, a maioria desse grupo tem uma causa monogênica. Por outro lado, uma mutação só pode ser detectada em apenas 25%-30% dos pacientes com diagnóstico clínico possível de HF, significando que a maioria desses pacientes de "menor risco" tem uma causa poligênica (SHARIFI; RHAKIT; HUMPHRIES; NAIR, 2016).

Portadores de uma mutação no *LDLR* apresentam aumento de 10 vezes no risco de DAC prematura em comparação com a população geral. Foi demonstrado que portadores de HF monogênica têm risco maior de DCV do que os pacientes com hipercolesterolemia não familiar com valores semelhantes de LDL-c ou aqueles com HF poligênica (PAQUETTE; BAASS, 2018). Entretanto, nem todos os portadores de HF monogênica desenvolverão aterosclerose e, em última análise, terão eventos cardiovasculares (PAQUETTE; BAASS, 2018).

Em nosso estudo, analisamos apenas mutações no *LDLR*. Entretanto, o tipo de mutação pode influenciar o risco cardiovascular do portador de HF. Por exemplo, foi verificado que, após ajuste para idade, sexo, tabagismo e pressão arterial, em comparação com os pacientes em que nenhuma mutação foi identificada, a razão de chance de DAC em pacientes com as mutações nos genes *LDLR*, *APOB* ou *PCSK9* foi de 1,84; 3,4 e 19,9, respectivamente, com diferença significativa entre os grupos ($p = 0,003$) (HUMPHRIES *et al.*, 2006). Além disto, comparados àqueles com uma causa monogênica de HF, a prevalência de DAC naqueles com causa poligênica é menor (SHARIFI; RHAKIT; HUMPHRIES; NAIR, 2016). É provável que seja devido ao fato de que os indivíduos monogênicos apresentaram concentrações de LDL-c severamente elevados desde o nascimento, enquanto o grupo poligênico desenvolveu concentrações mais elevadas de LDL-c apenas com o aumento da idade. Pode ser também que no grupo poligênico, outros fatores de risco para DAC sejam menos prevalentes, como por exemplo, concentrações mais altas de Lp(a) ou mais baixas de HDL-c, ambos importantes na determinação do risco de DCV (SHARIFI; RHAKIT; HUMPHRIES; NAIR, 2016).

Dentre as mutações genéticas, aquelas que prejudicam gravemente a função do receptor da LDL (mutações no *LDLR* com alelo nulo) estão

associadas ao maior grau de DCV e início precoce. A mutação específica no gene *PCSK9* com ganho de função da proteína (p.Asp374Tyr), mutação no gene da enzima lipase lipoproteica (p.Asn291Ser) e a presença de alelos E2 e E4 na apolipoproteína E são conhecidos por aumentar o risco de doença coronariana em pacientes com HF, enquanto algumas variantes com perda de função da *PCSK9* e mutações do gene *APOB* estão associadas a menor risco cardiovascular (SHARIFI; RHAKIT; HUMPHRIES; NAIR, 2016).

Em nosso estudo, a longevidade de alguns pacientes, inclusive sem a ocorrência de eventos cardiovasculares, surpreendeu. Entretanto, Raal *et al* (2016) demonstraram que, quando pacientes homocigotos foram estratificados de acordo com a funcionalidade do LDL-R, uma ampla faixa de idade e valores de LDL-c foram observados independentemente do status de mutação no *LDLR*. A idade média do primeiro evento cardiovascular foi de 26 anos, mas variou de 6 a 63 anos, e dois terços dos indivíduos avaliados não apresentaram evidências clínicas de DCV (RAAL; SJOUKE; HOVINGH; ISAAC, 2016).

Dentre os indivíduos que participaram do nosso estudo, o conhecimento sobre ter hipercolesterolemia era significativamente maior nos indivíduos com HF ($p = 0,0001$). Cerca de 50% dos indivíduos com HF estava em tratamento com medicação hipolipemiante versus 5,7% dos indivíduos sem HF ($p = 0,0001$). Apesar de o percentual significativamente maior, observa-se que metade dos pacientes portadores de HF não realizavam tratamento adequado, aumentando, assim, as chances de apresentarem eventos cardiovasculares. De fato, além de a HF ser causa frequentemente subdiagnosticada de DAC, dentre os diagnosticados muitos são tratados inadequadamente. Além disto, a incidência de DAC e expectativa de vida varia entre pacientes com HF tratada e não tratada (BOS *et al*, 2017). Se não tratados, 50% dos pacientes masculinos com HF e 20% dos pacientes femininos com HF desenvolvem doença cardíaca coronária fatal aos 60 anos de idade. Embora o tratamento com estatinas diminua mais da metade do risco de eventos coronarianos em adultos com HF, pacientes com HF assintomática apresentam uma variabilidade significativa na extensão da aterosclerose coronariana subclínica, apesar do uso de terapia agressiva com estatina (BOS *et al*, 2017). Em portadores de HF com mesma idade, gênero, IMC, pressão arterial sistólica e diastólica e fatores genéticos que podem influenciar o risco de DAC, os valores plasmáticos de HDL-c e a razão CT/HDL são dois importantes fatores de risco coronariano. Assim, o tratamento da HF deve concentrar-se não apenas

na redução do CT e LDL-c, mas também no aumento dos valores do HDL-c para a prevenção de doenças coronárias (REAL *et al*, 2001).

A apo (a) é uma apolipoproteína altamente polimórfica presente na Lp(a) e uma característica genética quantitativa que é herdada independentemente das variantes genéticas que causam a HF (PANG, 2016). Assim, a Lp(a) é considerada fator de risco estabelecido para DCV e, independentemente do LDL-c, sua concentração sérica tem sido consistentemente relatada como significativamente maior em pacientes com HF, especialmente naqueles com DAC precoce (NENSETER *et al*, 2011; PANG, 2016). Apesar disso, nenhum dos pacientes avaliados em nosso estudo apresentou concentrações elevadas de Lp(a).

Há evidências limitadas disponíveis no uso de novos biomarcadores cardíacos, tais como PCR-as e citocinas inflamatórias na estratificação de risco de pacientes assintomáticos com HF (SHARIFI; RHAKIT; HUMPHRIES; NAIR, 2016). A grande variação na incidência de DAC em portadores de HF sugere que há outros fatores, além de colesterol elevado, que podem desempenhar papel no desenvolvimento de aterosclerose nesses indivíduos. Usando análises proteômicas, seis novos biomarcadores protéicos foram associados à DAC em 60 pacientes com HF geneticamente confirmada: alfa-2-glicoproteína rica em leucina, a cadeia pesada H3 do inibidor da interalfa tripsina, componente C4-B do sistema complemento, subcomponente C1q da subunidade B do sistema complemento, antígeno de diferenciação de monócitos (CD14) e glicoproteína rica em histidina. No entanto, esses são estudos retrospectivos ou transversais com pequeno tamanho de amostra. Assim, esses novos resultados precisam ser validados em coortes maiores usando um projeto prospectivo (BOS *et al*, 2017).

6.6 AVALIAÇÃO ALIMENTAR

Dieta para diminuir colesterol e várias outras intervenções dietéticas têm sido sugeridas como abordagem para gerenciar de forma isolada ou como adjuvante da terapia medicamentosa o tratamento da HF em crianças e adultos (SHAFIQ *et al*, 2010; NEGELE *et al*, 2015). Especialmente na infância, é desejável utilizar métodos dietéticos redutores de lipídios, enquanto os fármacos devem ser aplicados apenas após ineficiência da terapia da dieta. Além disto, uma alteração precoce dos hábitos alimentares no tratamento dos pacientes é extremamente favorável e pode retardar a necessidade de medicação para reduzir a

concentração plasmática dos lipídeos para um momento posterior da vida, minimizando, assim, os potenciais efeitos colaterais (NEGELE *et al*, 2015).

Neste estudo, não foram observadas diferenças significativas entre indivíduos com e sem HF quando comparamos os principais parâmetros dietéticos avaliados. Apesar disso, os indivíduos com HF apresentaram, em média, consumo diário maior de calorias totais (22,3%) e proteínas (97,1%). Por outro lado, embora igualmente não significativo, houve menor consumo de colesterol e gordura saturada (32,9% e 10,5%, respectivamente). Os pacientes com diagnóstico de HF ou dislipidemias, foram aconselhados a procurar orientação nutricional através da rede básica de saúde de seus municípios.

Para o tratamento dietético da HF, recomenda-se uma dieta para reduzir as concentrações séricas de colesterol com base nos seguintes princípios, os quais são seguidos no Reino Unido, EUA e noutros países: *i.* redução do consumo de ácidos graxos saturados; *ii.* redução na ingestão de colesterol; *iii.* redução no consumo total de gordura e; *iv.* manipulação da ingestão de carboidratos para substituir o déficit de energia da dieta com baixo teor de gordura (SHAFIQ *et al*, 2010; MALHOTRA *et al*, 2014; TORVIK *et al*, 2016). Essa recomendação dietética é considerada monótona e pode ocasionar alguns problemas. Por exemplo, a redução na ingestão de gordura, se levada ao extremo, poderia levar à deficiência de ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis e redução no conteúdo energético total da dieta, que tem implicações para a saciedade e crescimento de crianças, as quais têm necessidades energéticas relativamente altas (SHAFIQ *et al*, 2010; MALHOTRA *et al*, 2014). Um aumento no teor de carboidratos da dieta pode levar ao aumento dos TG, que também é fator de risco para DCV. Além disto, o objetivo da dieta é diminuir a concentração total de colesterol no sangue. No entanto, isso pode resultar não só numa redução do LDL-c mas também do HDL-c. O HDL-c esta envolvido na remoção do colesterol dos tecidos periféricos, incluindo artérias e lesões ateroscleróticas e, portanto, qualquer intervenção que diminua sua concentração pode ter efeito prejudicial (SHAFIQ *et al*, 2010; MALHOTRA *et al*, 2014). Em vista disso, várias outras terapias dietéticas foram consideradas para o tratamento da HF, incluindo: *i.* manipulação de diferentes tipos de ácidos graxos, mantendo a ingestão normal de gordura total; *ii.* aumento da ingestão de fibra solúvel; *iii.* aumento da ingestão de antioxidantes e; *iv.* aumento da ingestão de certos componentes dietéticos (alho, cebola, proteína de soja, esteróis e

estanois vegetais e ácidos graxos ômega-3 (SHAFIQ *et al*, 2010; MALHOTRA *et al*, 2014).

No entanto, nenhuma conclusão pode ser feita sobre a eficácia de uma dieta para reduzir o colesterol sérico ou qualquer uma das outras intervenções dietéticas sugeridas para HF, devido à falta de dados adequados (SHAFIQ *et al*, 2010; MALHOTRA *et al*, 2014). A pouca quantidade de estudos disponíveis, curto tempo de duração das intervenções e diferentes tipos de condução dos estudos, torna difícil a comparação dos diferentes tipos de tratamentos (MALHOTRA *et al*, 2014). Desta forma, grandes estudos paralelos, randomizados e controlados são necessários para investigar a eficácia das modificações dietéticas em indivíduos com HF (SHAFIQ *et al*, 2010; MALHOTRA *et al*, 2014). Entretanto, o que já pode ser comprovado é que a adição de esteróis e estanois vegetais, especialmente em altas doses, tem eficácia para diminuir significativamente o CT e LDL-c. As fibras, quando acompanhadas do tratamento com fibratos, apresentaram melhores resultados para diminuir o LDL-c do que os fibratos sozinhos (MALHOTRA *et al*, 2014).

Nas últimas décadas, vários estudos documentaram um efeito positivo nas concentrações plasmáticas de colesterol pela ingestão de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e poliinsaturados (AGPI) em adultos hipercolesterolêmicos. Portanto, há interesse crescente em seu uso como terapia alternativa em pacientes jovens com HF heterozigótica. Especialmente os ácidos graxos ômega-3 podem ser de grande importância, devido aos seus efeitos biológicos na prevenção de DCV (NEGELE *et al*, 2015). Um estudo piloto envolvendo famílias de jovens com HF, demonstrou que, a utilização de óleos vegetais de qualidade, associada à diminuição dos ácidos graxos saturados e do teor de colesterol na dieta, levou à redução significativa das concentrações de CT e LDL-c, que pode ser alcançada em 13 semanas de intervenção. Essa dieta não resultou em mudança significativa no HDL-c e apoA1 (NEGELE *et al*, 2015). Além disto, a utilização de óleo de canola parece ter efeitos mais favoráveis em relação às subfrações de lipoproteínas no sangue e marcadores de risco em comparação com o óleo de girassol (NEGELE *et al*, 2015).

Um estudo com crianças e adolescentes com HF demonstrou que a ingestão de gordura saturada foi positivamente associada às concentrações plasmáticas de CT, LDL-c e Apo B. Nessas crianças, o perfil lipídico plasmático foi melhorado após aconselhamento dietético

onde o foco estava na redução da ingestão de gordura saturada e colesterol (TORVIK *et al*, 2016).

Apesar da falta de comprovação científica específica da dietoterapia para a HF, de forma geral, a gordura saturada, a gordura insaturada trans e a ingestão de colesterol devem ser limitadas e uma ingestão regular de frutas e vegetais, grãos integrais, nozes, produtos lácteos com pouca gordura e sem gordura, feijão, peixe e carnes magras deve ser incentivada. O consumo de álcool deve ser moderado. A suplementação dietética com esteróis ou estanois de plantas pode ser usada para diminuir gradativamente o LDL-c plasmático (GIDDING *et al*, 2015).

Pessoas com HF podem ser mais suscetíveis a consequências psicológicas e nutricionais potencialmente prejudiciais para o seu tratamento dietético. Por essa razão, é decepcionante notar que poucos estudos avaliam o estado nutricional e nenhum avaliou a qualidade de vida dos pacientes portadores de HF (MALHOTRA *et al*, 2014).

6.7 AVALIAÇÃO PSICOSSOCIAL

A preocupação em realizar a avaliação psicológica nos pacientes estudados ocorreu porque um distúrbio genético pode ter interferências psicológicas e psicossociais. Cada paciente confrontado com o diagnóstico de HF tem uma perspectiva única sobre todos os aspectos médicos, diagnóstico e tratamento ao longo da vida. Certos pacientes podem ter seu convívio social afetado, incluindo estresse familiar e vulnerabilidade emocional (GIDDING *et al*, 2015). Entretanto, em nosso estudo, após avaliação psicológica, não observamos diferenças nas prevalências de depressão e ansiedade quando comparamos os indivíduos com e sem HF. Em Papanduva-SC, sintomas de ansiedade foram identificados em 22 indivíduos, sendo que apenas sete são portadores de HF. Tendência à ansiedade foi identificada em quatro indivíduos, mas nenhum com HF confirmada. Nove indivíduos apresentavam depressão, sendo três com diagnóstico de HF. Tendência à depressão foi observada em sete indivíduos, três com HF. Em Bom Despacho-SC, sintomas de ansiedade foram identificados em 26 indivíduos, sendo que 12 tiveram diagnóstico de HF. Tendência à ansiedade foi identificada em 23 indivíduos, 13 com HF confirmada. Tendência à depressão foi observada em 17 indivíduos, oito deles com diagnóstico de HF e três indivíduos apresentavam sintomas de depressão, dois deles portadores de HF. Cabe ressaltar que a avaliação

psicológica foi realizada no início do estudo, quando a maior parte dos pacientes ainda desconhecia seu diagnóstico e/ou a severidade da doença.

É comum que portadores de um distúrbio genético às vezes cresçam pessimistas sobre si mesmos e menos otimistas sobre sua saúde futura após a detecção do distúrbio, embora o humor em geral pareça não ser afetado (MAARLE; STOUTHARD; BONSEL, 2003). Um estudo com holandeses portadores de HF identificou que mulheres com hipertensão e/ou qualquer outra doença crônica, e aqueles com maior percepção do risco, mostraram mais ansiedade. Os indivíduos que sentiram algum tipo de pressão social para realizarem a triagem, mostraram mais ansiedade e piores resultados na escala de depressão. Além disto, na escala de depressão, os participantes mais velhos e aqueles com alguma doença crônica, obtiveram resultados piores. Apesar disto, assim como em nosso estudo, as diferenças não foram consideradas significativas quando comparados com os resultados de indivíduos sem HF (MAARLE; STOUTHARD; BONSEL, 2003).

Da mesma forma, no estudo de Agard e colaboradores (2005), os entrevistados não sentiram que sua infância e adolescência foi significativamente afetada pela consciência de que alguns de seus parentes tinham histórico de DCV precoce ou altas concentrações de colesterol. Outros entrevistados sequer refletiram sobre o fato de que uma doença hereditária poderia ocorrer em suas famílias antes de receberem o diagnóstico. Ao receber o diagnóstico, alguns entrevistados pensaram que isso significava que eles provavelmente morreriam em um futuro relativamente próximo. No entanto, esse medo durou apenas por um curto período de tempo. Ele desapareceu gradualmente, principalmente como resultado de mais informações e/ou uma resposta terapêutica positiva para a diminuição do colesterol. A grande maioria dos entrevistados relatou que queria saber se estavam sofrendo de HF, pois o conhecimento do diagnóstico possibilitou o tratamento adequado. O benefício em termos de prevenir ou retardar as DCVs foi, em geral, maior do que os diferentes tipos de inconveniências que podem resultar do conhecimento desse distúrbio genético (AGARD *et al*, 2005). Outro estudo também demonstrou que indivíduos com diagnóstico genético confirmado de HF não ficaram mais ansiosos após receberem os resultados dos testes e tiveram escores semelhantes de qualidade de vida em longo prazo em comparação àqueles que são negativos para HF (HILGART; MERCER; THIRLAWAY, 2012).

No estudo de Gidding e colaboradores (2015), embora o processo de diagnóstico de HF possa ter criado preocupações com custos, implicações de seguros, perda de privacidade e possível discriminação, o rastreamento em cascata e o diagnóstico de HF não levou a danos psicológicos ou sociais em adultos ou crianças (GIDDING *et al*, 2015). Para Gidding (2015), a orientação sobre tratamentos ajuda a garantir que os pacientes entendam os benefícios e riscos, a minimizar eventos adversos e maximizar os benefícios, a aumentar a adesão do tratamento, a reduzir a ansiedade e melhorar a qualidade de vida. Assim, os profissionais de saúde precisam reconhecer a variação na percepção de risco porque pode afetar a vulnerabilidade do paciente, a busca de saúde e a motivação para o tratamento (GIDDING *et al*, 2015). Além disto, várias questões psicológicas, incluindo tristeza, culpa, culpa do sobrevivente, raiva e mágoa, que alteram relações familiares podem ocorrer e tudo isso pode precisar ser abordado (GIDDING *et al*, 2015).

Por outro lado, em estudo com adultos jovens, um certo impacto emocional foi relatado, como por exemplo, através da preocupação com opiniões ou pressão social dos colegas e a participação restrita em atividades sociais quando essas estavam relacionadas com alimentação. Outros indivíduos endossaram sentimentos de vergonha decorrente da crença de que ter um distúrbio genético ou estar sob medicação torna-se "insalubre", independente de não apresentar manifestações físicas (SLIWINSKI *et al*, 2016).

É consenso que a identificação do risco genético de crianças e adolescentes pode protegê-los das consequências potencialmente fatais. Por outro lado, conhecer o risco de um evento cardíaco pode provocar sentimentos de ansiedade ou depressão e afetar a auto-estima, especialmente quando eles experimentaram tais eventos na família. Além disto, sua liberdade de movimento é limitada devido a restrições em atividades físicas e pela regulamentação da dieta. Consequências emocionais e funcionais podem afetar negativamente as relações sociais (SMETS *et al*, 2008). Apesar disso, estudos que investigaram as consequências para crianças, não mostraram efeitos prejudiciais significativos no seu bem-estar psicológico (SMETS *et al*, 2008). Usando um questionário padrão de qualidade de vida relacionada à saúde, não foram identificados problemas com o bem-estar dessas crianças: suas pontuações foram comparáveis àquelas de um amostra controle (SMETS *et al*, 2008). Critérios como "Humor e emoções", "Autonomia", "Apoio social e colegas" e "Ambiente escolar" mostraram

pontuações mais baixas para as crianças portadoras de HF, no entanto, sem significância estatística (SMETS *et al.*, 2008).

Curiosamente, uma única opinião bastante distinta, foi apresentada por Hopcroft (2007), que defende o impacto psicológico adverso de rastreamento de pais e filhos para HF. Não importa quão boa seja a comunicação, o conhecimento da doença exacerbará a neurose do colesterol que grande parte da população já parece ter. Se houver crianças envolvidas, a ansiedade será ainda maior. Dizer aos pais que seus filhos têm colesterol alto os preocupará, o que dificulta colocar as coisas em perspectiva. Arrisca-se a sombrear a infância porque os pais vêem sua progênie como ameaçada ou frágil. Isso será agravado pelo fato de que nenhuma ação terapêutica imediata pode ser tomada. Os pais sentirão que seu filho é vulnerável e que nada pode ser feito a curto prazo. Na melhor das hipóteses, isso os deixará desconfortáveis e na pior das hipóteses, poderia arruinar sua paternidade.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pacientes com HF geralmente apresentam risco aumentado de DAC, conseqüentemente, o rastreio da HF dentro das famílias está em curso em vários países, especialmente na Europa. Entretanto, no Brasil, o grau de suspeição dos pacientes ainda é inferior a 1% dos casos estimados.

Durante o desenvolvimento deste estudo, identificamos a falta da descrição de detalhes específicos das metodologias publicadas para o diagnóstico de casos índices, o que impedia a reprodução do método e dificultavam estudos nesta área. Além disto, identificamos que existe apenas um pequeno número de profissionais experientes para lidar com o diagnóstico de HF no Brasil. Essas poderiam ser algumas das razões pelas quais o Brasil tem baixo percentual de diagnóstico de HF. Assim, desenvolvemos um método simples e rápido para a genotipagem do *LDLR*, com base na reação em PCR e sequenciamento de Sanger, métodos que utilizam equipamentos de baixo custo e facilmente acessíveis em laboratórios de rotina e de pesquisa. O método é eficiente e esperamos que sua divulgação permita ampliar os estudos sobre HF no país e suprir um déficit de profissionais capacitados para lidar com o diagnósticos e acompanhamento genético dos pacientes portadores de HF. Acreditamos que o custo do método pode diminuir ainda mais quando implantado na rotina clínica.

Além disto, a identificação de novas mutações no Brasil ajudará a aumentar o conhecimento sobre as bases genéticas da doença no país e, conseqüentemente, pode ajudar a aumentar o número de diagnósticos em pacientes brasileiros. A partir do momento em que se tem o conhecimento sobre as mutações mais prevalentes no país, é possível delinear a triagem de forma ainda mais específica, o que aumenta o custo-benefício do rastreamento. Considerando que o tratamento é de alto custo, o conhecimento da mutação específica causadora da doença é de fundamental importância para garantir o sucesso do tratamento.

O nosso estudo demonstrou a eficiência do rastreamento genético em cascata e, por isso, há a necessidade de triar geneticamente outras famílias brasileiras visando a continuação da ampliação dos diagnósticos, proporcionando um tratamento adequado e reduzindo a mortalidade precoce. Acreditamos que a metodologia apresentada poderá ajudar e incentivar o desenvolvimento de novos estudos nessa área no país para que no futuro, possamos ter um banco de dados

nacional com as mutações aqui encontradas e um percentual maior de portadores de HF diagnosticados.

8 CONCLUSÕES

- O método de genotipagem descrito foi tecnicamente efetivo e útil para o sequenciamento e identificação de mutações no *LDLR* e pode ser usado para realizar o rastreamento genético em cascata para o diagnóstico de HF.
- O teste genético é altamente custo-efetivo e há necessidade de rastrear geneticamente outras famílias suspeitas para o diagnóstico precoce de HF e tratamento adequado.
- O conhecimento da mutação causadora da doença pode ajudar a determinar o tratamento ideal do paciente. Tendo em vista que o tratamento é de alto custo, sua otimização é fundamental.
- Neste estudo, encontramos mutações que estão sendo descritas pela primeira vez no Brasil e no mundo, o que ajuda a obter mais informações sobre bases moleculares da HF e também expande o conhecimento sobre o espectro de mutações no *LDLR*.
- Considerando que a população brasileira é altamente heterogênea, é importante determinar o espectro geográfico das mutações no *LDLR* para fornecer informações sobre o prognóstico e o tratamento de cada paciente.
- A maior parte dos indivíduos diagnosticados como portadores de HF apresentou “muito alto risco” cardiovascular e precisam ser adequadamente tratados para reduzir a morbimortalidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIFADEL, M., *et al.* Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. **Nature Genetics**. v. 34, n. 2, p. 154-156, 2003.

ADEMI, Z., *et al.* A systematic review of economic evaluations of the detection and treatment of familial hypercholesterolemia. **International Journal of Cardiology**. v. 167, p. 2391-2396, 2013.

AGARD, A.; BOLMSJO, I. A.; HERMEREN, G.; WAHLSTOM J. Familial hypercholesterolemia: ethical, practical and psychological problems from the perspective of patients. **Patient Education and Counseling**. v. 57, p. 162-167, 2005.

AHN, C. H.; CHOI, S. H. New drugs for treating dyslipidemia: Beyond statins. **Diabetes & Metabolism Journal**. v. 39, p. 87-94, 2015.

AL-ALLAF, A. F., *et al.*, 2017. Compound heterozygous LDLR variant in severely affected familial hypercholesterolemia patient. **Acta Biochimica Polonica**. v. 64, n. 1, p.75-79, 2017.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/colesterol-alto-ganha-tratamento-inedito-no-pais/219201>. Acesso em: 13 de Novembro de 2017, 21h32.

BARTER, P. J.; RYE, K. A. New era of lipid-lowering drugs. **Pharmacological Reviews**. v. 68, p. 458-475, 2016.

BAYS, H. E., *et al.* National Lipid Association annual summary of clinical lipidology 2016. **Journal of Clinical Lipidology**. v.10, p. S1-S43, 2016.

BERTOLINI, S., *et al.* Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v. 20, n. 9, p. E41-E52, 2000.

BERTOLINI, S., *et al.* Spectrum of mutations and phenotypic expression in patients with autosomal dominant hypercholesterolemia identified in Italy. **Atherosclerosis**. v. 227, n. 2, p. 342-348, 2013.

BESSELING, J.; SJOUKE, B.; KASTELEIN, J. J. P. Screening and treatment of familial hypercholesterolemia e Lessons from the past and opportunities for the future (based on the Anitschkow Lecture 2014). **Atherosclerosis**. v. 241, p. 597-606, 2015.

BLOM, D. J., *et al.* Long-Term efficacy and safety of the microsomal triglyceride transfer protein inhibitor lomitapide in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. **Circulation**. v. 136, p. 332-335, 2017.

BORIGHT, A. P., *et al.* Association and linkage of LDLR gene variation with variation in plasma low density lipoprotein cholesterol. **Journal of Human Genetics**. v. 43, n. 3, p. 153-159, 1998.

BOS, S., *et al.* Novel protein biomarkers associated with coronary artery disease in statin-treated patients with familial hypercholesterolemia. **Journal of Clinical Lipidology**. n. 11, p. 682-693, 2017.

BOURBON, M.; SUN, X-M.; SOUTAR, A. K. A rare polymorphism in the low density lipoprotein (LDL) gene that affects mRNA splicing. **Atherosclerosis**. v. 195, n. 1, p. e17-e20, 2007.

BOURBON, M., *et al.* Familial hypercholesterolaemia in Portugal. **Atherosclerosis**. v. 196, n. 2, p. 633-642, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças Crônicas Não Transmissíveis**. Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31877&janela=1> Acesso em: 12 de Abril de 2013, 14h26.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de atenção Básica. Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde: Norma técnica do sistema de vigilância alimentar e nutricional – SISVAN.1 ed. Brasília-DF, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Tecnologia da informação a serviço do SUS DATASUS. Cadernos de informação de saúde.** Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/tabdata/cadernos/cadernosmap.htm>> Acesso em: 18 de Abril de 2013b, 15h23.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Alertas de monitoramento do horizonte tecnológico. MIPOMERSEN (KYNAMRO®) para Hipercolesterolemia Familiar Homozigótica.** v. 2, n. 2, 2016.

BRAENNE, I., *et al*, Systematic analysis of variants related to familial hypercholesterolemia in families with premature myocardial infarction. **European Journal of Human Genetics.** v. 24, n. 2, p. 191-197, 2016.

BRAUTBAR, A., *et al*. Genetics of familial hypercholesterolemia. **Current Atherosclerosis Reports.** v. 17, n. 4, p. 491-507, 2015.

BUNN, C. F.; LINTOTT, C. J.; SCOTT, R. S.; GEORGE, P. M. Comparison of SSCP and DHPLC for the Detection of LDLR Mutations in a New Zealand Cohort. **Human Mutation.** v. 19, n. 3, p. 311-315, 2002.

CAVALCANTE, L.; SILVA, E. L. Application of a modified precipitation method for the measurement of small dense LDL-cholesterol (sd-LDL-C) in a population in southern Brazil. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.** v. 50, n. 9, p. 1649-1656, 2012.

CIVEIRA, F.; *et al*. Tendon xanthomas in familial hypercholesterolemia are associated with cardiovascular risk independently of the low-density lipoprotein receptor gene mutation. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology.** v. 25, p. 1960-1965, 2005.

CHANG, J. H.; PAN, J. P.; TAI, D. Y.; HUANG, A. C. Identification and characterization of LDL receptor gene mutations in hyperlipidemic Chinese. **Journal of Lipid Research.** v. 44, n. 10, p. 1850-1858, 2003

CHMARA, M., *et al*. Molecular characterization of Polish patients with familial hypercholesterolemia: novel and recurrent LDLR mutations. **Journal of Applied Genetics.** v. 51, n. 1, p. 95-106, 2010.

CUCHEL, M., *et al.* Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein in familial hypercholesterolemia. **The New England Journal of Medicine**. v. 356, p. 148-156, 2007.

CUCHEL, M., *et al.* Efficacy and safety of a microsomal triglyceride transfer protein inhibitor in homozygous familial hypercholesterolemia. **The Lancet**. v. 381, n. 9860, p. 40-46, 2013.

DANIELS, S., *et al.* Lipid screening and cardiovascular health in childhood. **Pediatrics**. v. 122, n. 1, p. 198-208, 2008.

DAY, I. N. M.; WHITTALL, R. A.; O'DELL, S. D.; HADDAD, L. Spectrum of LDL receptor gene mutations in heterozygous familial hypercholesterolemia. **Human Mutation**. v. 10, p. 116-127, 1997.

DEATON, C., *et al.* The global burden of cardiovascular disease. **The Journal of Cardiovascular Nursing**. v. 26, n. 4S, p. S5-S14, 2011.

DEFESCHE, J. C., *et al.* Silent exonic mutations in the low-density lipoprotein receptor gene that cause familial hypercholesterolemia by affecting mRNA splicing. **Clinical Genetics**. v. 73, p. 573-578, 2008.

DUSKOVÁ, L., *et al.* An APEX-based genotyping microarray for the screening of 168 mutations associated with familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**. v. 216, n. 1, p. 139-145, 2011.

EBHARDT, M., *et al.* Mutation analysis in 46 German families with familial hypercholesterolemia: Identification of 8 new mutations. **Human Mutation**. v. 13, n. 3, p. 257, 1999.

EMA – European Medicines Agency. Science Medicines Health. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=/pages/medicines/human/medicines/002429/smops/Negative/human_smp_000460.jsp&mid=WC0b01ac058001d127> Acesso em: 22 de janeiro de 2018, 21h41.

EMA – European Medicines Agency. Science Medicines Health. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=/pages/medicines/human/medicines/003766/human_med_001890.jsp&mid=WC0b01ac058001d124> Acesso em: 13 de novembro de 2017, 21h13.

EMA – European Medicines Agency. Science Medicines Health. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2015/07/news_detail_002377.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1> Acesso em: 13 de novembro de 2017b, 21h22.

ETXEBARRIA, A., *et al.* Functional characterization of splicing and ligand-binding domain variants in the LDL receptor. **Human Mutations**. v. 33, n. 1, p. 232-243, 2012.

FAHED, A. C., *et al.* Homozygous familial hypercholesterolemia in Lebanon: A genotype/phenotype correlation. **Molecular Genetics and Metabolism**. v. 102, n. 2, p.181-188, 2011.

FAHED, A. C.; NEMER, G. M. Familial hypercholesterolemia: the lipids or the genes? **Nutrition & Metabolism**. v. 8, n.1, p. 23-34, 2011.

FOUCHIER, S. W.; DEFESCHE, J. C.; UMANS-ECKENHAUSEN, M. W.; KASTELEIN, J. P. The molecular basis of familial hypercholesterolemia in The Netherlands. **Human Genetics**. v. 109, n. 6, p. 602-615, 2001.

FOUCHIER, S. W.; KASTELEIN, J. P.; DEFESCHE, J. C. Update of the molecular basis of familial hypercholesterolemia in The Netherlands. **Humam Mutation**. v. 26, n. 6, p. 550-556, 2005.

FRANCKE, U.; BROWNS, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Assignment of the human gene for the low density lipoprotein receptor to chromosome 19: Synteny of a receptor, a ligand, and a genetic disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 81, n. 9, p. 2826-2830, 1984.

GENEST, J., *et al.* Canadian cardiovascular society position statement on familial hypercholesterolemia. **Canadian Journal of Cardiology**. v. 30, p. 1471-1481, 2014.

GIAMMANCO, A.; CAFALÚ, A. B.; NOTO, D.; AVERNA, M. R. The pathophysiology of intestinal lipoprotein production. **Frontiers in Physiology**. v. 6, p. 61-70, 2015.

GIDDING, S. S., *et al.* The agenda for familial hypercholesterolemia a scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**. v. 132, p. 2167-2192, 2015.

GIULIANO, I. C. B., *et al.* I Diretriz de prevenção da aterosclerose na infância e na adolescência. Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 85, supl. VI, 2005.

GOLBERG, A.C., *et al.* Familial hypercholesterolemia: screening, diagnosis and management of pediatric and adult patients. clinical guidance from the National Lipid Association Expert Panel on familial hypercholesterolemia. **Journal of Clinical Lipidology**. v. 5, p. S1-S8, 2011.

GRADINARU, D.; BORSA, C.; IONESCU, C.; PRADA, G. I. Oxidized LDL and NO synthesis - Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**. v. 151, p. 101-113, 2015.

HALLOWELL, N., *et al.* Patients' experiences and views of cascade screening for familial hypercholesterolemia (FH): a qualitative study. **Journal of Community Genetic**. v. 2, p.249-257, 2011.

HUMPHRIES, S. E., *et al.* Genetic causes of familial hypercholesterolaemia in patients in the UK: relation to plasma lipid levels and coronary heart disease risk. **Journal of Medical Genetics**. v. 43, p. 943-949, 2006.

HARADA-SHIBA, M., *et al.* Guidelines for the management of familial hypercholesterolemia. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**. v. 19, n. 12, p. 1042-1060, 2012.

HARDCASTLE, S. J., *et al.* Patients' perceptions and experiences of familial hypercholesterolemia, cascade genetic screening and treatment. international. **Journal of Behavioral Medicine**. v. 22, n. 1, p. 92-100, 2015.

HARTGERS, M. L., *et al.* Alirocumab efficacy in patients with double heterozygous, compound heterozygous, or homozygous familial

hypercholesterolemia. **Journal of Clinical Lipidology**. v 12. n. 2, p. 390-396, 2018.

HILGART, J.; MERCER, J.; THIRLAWAY, K. Individuals' experiences of, and responses to, a negative genetic test result for familial hypercholesterolaemia. **Journal of Health Psychology**. v. 18, n. 3, p. 339-349, 2012.

HOBBS, H. H.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. **Human Mutation**. v.1, n.6, p. 445-466, 1992.

HOPCROFT, K. A. Child-parent screening may have adverse psychological effects. **British Medical Journal**. v. 335, p. 683, 2007.

HOVINGH, G. K., *et al.* Diagnosis and treatment of familial hypercholesterolaemia. **European Heart Journal**. v. 34, p. 962-971, 2013.

IACocca, M. A.; HEGELE, R. A. Recent advances in genetic testing for familial hypercholesterolemia. **Expert Review of Molecular Diagnostics**. v. 17, p. 641-651, 2017.

INNERARITY, T. L., *et al.* Familial defective apolipoprotein B-100: Low density lipoproteins with abnormal receptor binding. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 84, p. 6919-6923, 1987.

ISLA, L. P., *et al.* Coronary Heart Disease, Peripheral Arterial Disease, and Stroke in Familial Hypercholesterolaemia Insights From the SAFEHEART Registry (Spanish Familial Hypercholesterolaemia Cohort Study). **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v. 36, n. 9, p. 2004-2010, 2016.

JANSEN A. C. M., *et al.* The contribution of classical risk factors to cardiovascular disease in familial hypercholesterolaemia: data in 2400 patients. **Journal of Internal Medicine**. v. 256, n. 6, p. 482-490, 2004.

JANNES, C. E. *et al.* Familial hypercholesterolemia in Brazil: Cascade screening program, clinical and genetic aspects. **Atherosclerosis**. v. 238, p. 101-107, 2015.

KHERA, A. V., *et al.* Diagnostic yield of sequencing familial hypercholesterolemia genes in severe hypercholesterolemia. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 67, n. 22, p. 2578-2589. 2016.

KIM, J. H., *et al.* Novel and recurrent mutations of the LDL receptor gene in Korean patients with familial hypercholesterolemia. **Molecules and Cells**. v. 18, n. 1, p. 63-70, 2004.

KOMAROVA, T. Y., *et al.* Familial hypercholesterolemia mutations in Petrozavodsk: no similarity to St. Petersburg mutation spectrum. **BMC Medical Genetics**. v. 14, p. 128-132, 2013.

KOREN, *et al.* Anti-PCSK9 monotherapy for hypercholesterolemia – The MENDEL-2 randomized, controlled phase 3 clinical trial of evolocumab. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 63, n. 23, p. 2531-2540, 2014.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. Elsevier. 9ª edição. São Paulo. 2016.

LANGSLET, G.; OSE, L. Screening methods in the diagnosis and assessment of children and adolescents with familial hypercholesterolemia. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**. v.11, n. 8, p. 1061-1066, 2013.

LEIGH, S. E. A., *et al.* Update and analysis of the University College London low density lipoprotein receptor familial hypercholesterolemia database. **Annals of human genetics**. v. 72, p. 485-498, 2008.

LEITERSDORF, E.; TOBIN, E. J.; DAVIGNON, J.; HOBBS, H. H. Common low-density lipoprotein receptor mutations in the French Canadian population. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 85, n. 4, p. 1014-1023, 1990.

LEREN, T. P., *et al.* Application of molecular genetics for diagnosing familial hypercholesterolemia in Norway: results from a family-based

screening program. **Seminars in vascular medicine**. v. 4, n. 1, p. 75-85, 2004.

LEREN, T. P., *et al.* Diagnosis of familial hypercholesterolemia in general practice using clinical diagnostic criteria or genetic testing as part of cascade genetic screening. **Community Genetica**. v. 11, p. 26-35, 2008.

LOBARDI, P., *et al.* Mutations in the low density lipoprotein receptor gene of familial hypercholesterolemic patients detected by denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing. **Journal of Lipid Research**. v. 36, n. 4; p. 860-867, 1995.

LOMBARDI, P., *et al.* The T705I mutation of the low density lipoprotein receptor gene (FH Paris-9) does not cause familial hypercholesterolemia. **Human Genetics**. v. 99, p. 106-107, 1997.

LOMBARDI, M. P., *et al.* Molecular genetic testing for familial hypercholesterolemia: spectrum of LDL receptor gene mutations in the Netherlands. **Clinical Genetics**. v. 57, p. 116-124, 2000.

LOUX, N., *et al.* Screening for new mutations in the LDL receptor gene in seven French familial hypercholesterolemia families by the single strand conformation polymorphism method. **Human Mutation**. v. 1, p. 325-332, 1992.

MAARLE, M. C.; STOUTHARD, M. E. A.; BONSEL, G. J. Quality of life in a family based genetic cascade screening programme for familial hypercholesterolaemia: a longitudinal study among participants. **Journal of Medical Genetics**. v.40, n. 1, p. e3-e9, 2003.

MALHOTRA, A., *et al.* Dietary interventions (plant sterols, stanols, omega-3 fatty acids, soy protein and dietary fibers) for familial hypercholesterolaemia (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**. v. 6, 2014.

MARKS, D., *et al.* Cascade screening for familial hypercholesterolaemia: implications of a pilot study for national screening programmes. **Journal of Medical Screening**. v. 13, p. 156-159, 2006.

MARANG-VAN DE MHEEN, P. J., *et al.* Cost-effectiveness of a family and DNA based screening programme on familial hypercholesterolaemia in The Netherlands. **European Heart Journal**. v. 23, p. 1922-1930, 2002.

MARTINELLI, N., *et al.* Polymorphisms at LDLR locus may be associated with coronary artery disease through modulation of coagulation factor VIII activity and independently from lipid profile. **Blood**. v. 116, n. 25, p. 5688-5697, 2010.

MASANA, L. *et al.* Consenso de expertos sobre la detección y el manejo clínico de la hipercolesterolemia familiar. **Clínica e Investigación en Aterosclerosis**. v. 24, n. 4, p. 182-193, 2013.

MAVROIDIS, N., *et al.* A High incidence of mutations in exon 6 of the low-density lipoprotein receptor gene in Greek familial hypercholesterolemia patients, including a novel mutation. **Humam Mutation**. v. 9, n. 3, p. 274-276, 1997.

MAXWELL, K. N.; BRESLOW, J.L. Proprotein convertase subtilisin kexin 9: the third locus implicated in autosomal dominant hypercholesterolemia. **Current Opinion Lipidology**. v. 16, p. 167-172, 2005.

McCRINDLE, B. W. Familial hypercholesterolemia in children and adolescents. **Current Opinion in Lipidology**. v. 23, n. 6, p. 525-531, 2012.

MEHTA, R., *et al.* The panorama of familial hypercholesterolemia in Latin America: a systematic review. **Journal of Lipid Research**. v. 57, n. 12, p. 2115-2129, 2016.

MENDIS, S.; PUSKA, P.; NORRVING, B. **Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control**. World Health Organization – WHO; World Heart Federation; World Stroke Organization. Geneva, Switzerland, 2011.

MESSAL, M. E., *et al.* Familial hypercholesterolemia in Morocco: first report of mutations in the LDL receptor gene. **Journal of Human Genetics**. v. 48, n. 4, p.199-203, 2003.

MESMIN, B.; MAXFIELD, F.R. Intracellular sterol dynamics. **Biochimica and Biophysica Acta**. v.1791, n. 7, p. 636-645, 2009.

MIYAKE, Y., *et al.* Update of Japanese common LDLR gene mutations and their phenotypes: Mild type mutation L547V might predominate in the Japanese population. **Atherosclerosis**. v. 203, p. 1530160, 2009.

MOLFETTA, G.A., *et al.* Mutational screening in the LDLR gene among patients presenting familial hypercholesterolemia in the Southeast of Brazil. **Genetics and Molecular Research**. v. 16, n. 3, p. gmr16039226, 2017.

MORITA, S. Metabolism and modification of Apolipoprotein B-containing lipoproteins involved in dyslipidemia and atherosclerosis. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 39, p. 1-36, 2016.

MORUISI, K. G.; OOSTHUIZEN, W.; OPPERMAN, A. M. Phytosterols/stanols lower cholesterol concentrations in familial hypercholesterolemic subjects: A systematic review with meta-analysis. **Journal of the American College of Nutrition**. v. 25, n. 1, p. 41-48, 2006.

NAKASHIMA, Y., *et al.* Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology**. v. 27, p. 1159-1165, 2007.

NEGELE, L., *et al.* Effect of a low-fat diet enriched either with rapeseed oil or sunflower oil on plasma lipoproteins in children and adolescents with familial hypercholesterolaemia. Results of a pilot study. **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 69, p. 337-343, 2015.

NENSETER, M. S., *et al.* Lipoprotein(a) levels in coronary heart disease-susceptible and resistant patients with familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**. v. 216, p. 426-432, 2011.

NHERERA, L., *et al.* Probabilistic cost-effectiveness analysis of cascade screening for familial hypercholesterolaemia using alternative diagnostic and identification strategies. **Heart**. v. 97, p. 1175-1181, 2011.

NORDESTGAARD, B. G., *et al.* Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease. **European Heart Journal**. v. 34, n. 45, p. 3478-3490, 2013.

O'FLAHERTY, M.; BUCHAN, I.; CAPEWELL, S. Contributions of treatment and lifestyle to declining CVD mortality: why have CVD mortality rates declined so much since the 1960s? **Heart**. v. 99, n. 3, p. 159-162, 2012.

OOSTERVEER, D. M., *et al.* Differences in characteristics and risk of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients with and without tendon xanthomas: A systematic review and meta-analysis **Atherosclerosis**. v. 207, n. 2, p. 311-317, 2009.

OPAS – Organização Panamericana de saúde. Situação de saúde das Américas. **Panorama Regional e Perfis de Países**. Edição de 2012, n. 36. Washington DC. United States of America, 2012.

OPAS – Organización Panamericana de la salud. **Situación de salud en las Americas. Indicadores basicos**. Washington DC. United States of America. 2009.

PANG, J.; LANSBERG, P.J.; WATTS, G. F. International developments in the care of familial hypercholesterolemia: where now and where to next? **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**. v. 23, p. 505-519, 2016.

PAQUETTE, M.; BAASS, A. Predicting cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia. **Current Opinion in Lipidology**. v. 29, 2018.

PATEL, R.; SCOPELLITI, E. M., SAVELLONI, J. Therapeutic management of familial hypercholesterolemia: Current and emerging drug therapies. **Pharmacotherapy**. v.35, n. 12, p. 1189-1203, 2015.

PIMSTONE, S. N., *et al.* Phenotypic variation in heterozygous familial hypercholesterolemia: a comparison of Chinese patients with the same or similar mutations in the LDL receptor gene in China or Canada.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. v. 18, n. 2, p. 309-315, 1998.

PIMSTONE, S. N., *et al.* Differences in the phenotype between children with familial defective apolipoprotein B-100 and familial hypercholesterolemia. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.** v. 17, n. 5, p. 826-833, 1997.

QIAN, Y. W., *et al.* Secreted PCSK9 downregulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis. **Journal of Lipid Research.** v. 48, p. 1488-1498, 2007.

RAAL, F. J.; SJOUKE, B.; HOVINGH, G. K.; ISAAC, B. F. Phenotype diversity among patients with homozygous familial hypercholesterolemia: A cohort study. **Atherosclerosis.** v. 248, p. 238-244, 2016.

REAL, J. T., *et al.* Importance of HDL cholesterol levels and the total/HDL cholesterol ratio as a risk factor for coronary heart disease in molecularly defined heterozygous familial hypercholesterolaemia. **European heart journal.** v. 22, n. 6, p. 465-471, 2001.

REPATHA: Evolocumabe. Monica Carolina Dantas Pedrazzi. Porto Rico: Amgen, [2016]. Bula de remédio.

RICHARDS, S., *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine.** v. 17, n. 5, p. 405-424, 2015.

ROCHA, V. Z., *et al.* Extensive xanthomas and severe subclinical atherosclerosis in homozygous familial hypercholesterolemia. **Journal of the American College of Cardiology.** v. 61, n. 21, 2013.

ROTH, E. M., *et al.* Monotherapy with the PCSK9 inhibitor alirocumab versus ezetimibe in patients with hypercholesterolemia: Results of a 24 week, double-blind, randomized Phase 3 trial. **International Journal of Cardiology.** v.176, p. 55-61, 2014.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd Edition. Cold Spring Harbor, New York. 2001.

SANTOS, R. D., *et al.* Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 99, n. 2, Supl. 2, 2012.

SANTOS, R. D.; FRAUCHES, T. S.; CHACRA, A. P. M. Cascade screening in familial hypercholesterolemia: Advancing forward. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**. v. 22, n. 9, p. 869-880, 2015.

SEIDAH, N. G.; KHATIB, A. M.; PRAT, A. The proprotein convertases and their implication in sterol and/or lipid metabolism. **Biological Chemistry**. v. 387, p. 87-877, 2006.

SLIWINSKI, S. K., *et al.* Transitioning from pediatric to adult health care with familial hypercholesterolemia: Listening to young adult and parent voices. **Journal of Clinical Lipidology**. v. 11, n. 1, p. 147-159, 2017.

SHAFIQ, N., *et al.* Dietary treatment for familial hypercholesterolaemia. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. v. 1, p. CD001918, 2010.

SHAO, B.; *et al.* The roles of macrophage autophagy in atherosclerosis. **Acta Pharmacologica Sinica**. v. 37, p. 150-156, 2016.

SHARIFI, M., *et al.* The genetic spectrum of familial hypercholesterolemia in south-eastern Poland. **Metabolism**. v. 65, n. 3, p. 48-53, 2016.

SHARIFI, M.; RHAKIT, R. D.; HUMPHRIES, S. E.; NAIR, D. Cardiovascular risk stratification in familial hypercholesterolaemia. **Heart**. v. 102, n. 13, p. 1003-1008, 2016.

SHARIFI, M.; FUTEMA, M.; NAIR, D.; HUMPHRIES, S. E. Genetic architecture of familial hypercholesterolaemia. **Current Cardiology Reports**. v. 19, n. 5, p. 44-57, 2017.

SJOUKE, B.; DEFESCHE, J. C.; HARTGERS, M. L.; WIEGMAN, A., *et al.* Double-heterozygous autosomal dominant hypercholesterolemia: Clinical characterization of an underreported disease. **Journal of Clinical Lipidology**. v. 10, n. 6, p. 1462-1469, 2016.

SMETS, E. M. A., *et al.* Health-related quality of life of children with a positive carrier status for inherited cardiovascular diseases. **American Journal of Medical Genetics Part A**. v. 146A, p. 700-707, 2008.

SOEKI, T; SATA, M. Inflammatory biomarkers and atherosclerosis. **International Heart Journal**. v. 57, n. 2, p. 134-139, 2016.

SORIA, L. F.; *et al.* Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 86, p. 587-591, 1989.

SPOSITO, A.C., *et al.* IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. Departamento de aterosclerose da sociedade brasileira de cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 88, supl I, 2007.

STARR, B., *et al.* Development of sensitive and specific age- and genderspecific low-density lipoprotein cholesterol cutoffs for diagnosis of first-degree relatives with familial hypercholesterolaemia in cascade testing. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. v. 46, n. 6, p. 791-803, 2008.

SUN, X. M.; PATEL, D. D.; KNIGHT, B. L.; SOUTAR, A. K. Comparison of the genetic defect with LDL-receptor activity in cultured cells from patients with a clinical diagnosis of heterozygous familial hypercholesterolemia. The Familial Hypercholesterolaemia Regression Study Group. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v. 17, n. 11, p. 3092-3101, 1997.

TADA, H.; KAWASHIRI, M.; YAMAGISHI, M. Clinical perspectives of genetic analyses on dyslipidemia and coronary artery disease. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**. v. 24, p. 452-461, 2017.

- TATISHCHEVA, L., *et al.* Four new mutations and polymorphic variants of the low density lipoprotein receptor in patients with familial hypercholesterolemia in Saint Petersburg. **Genetika**. v.37, n.9, p. 1290-1295, 2001.
- TORVIK, K., *et al.* Dietary counseling is associated with an improved lipid profile in children with familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**. v. 252, p. 21-27, 2016.
- VACA, G.; ALEJANDRA, V.; MAGANA, M. T.; RAMIREZ, M. L. Mutational analysis of the LDL receptor and APOB genes in Mexican individuals with autosomal dominant hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**. v. 218, n. 2, p. 391-396, 2011.
- VAN AALST-COHEN, E. S., *et al.* Diagnosing familial hypercholesterolaemia: the relevance of genetic testing. **European Heart Journal**. v. 27, p. 2240-2246, 2006.
- VOET, D.; VOET, J. G. Bioquímica. 4ª edição. Artemed. 2013.
- VOGT, A. The genetics of familial hypercholesterolemia and emerging therapies. **The Application of Clinical Genetics**. v. 8, p. 27-36, 2015.
- WANG, J.; BAN, M. R., HEGELE, R.A. Multiplex ligation-dependent probe amplification of LDLR enhances molecular diagnosis of familial hypercholesterolemia. **Journal of Lipid Research**. v. 46, n. 2, p. 366-372, 2005.
- WARNICH, L.; KOTZE, M. J.; LANGENHOVEN, E.; RETIEF, A. E. Detection of a frequent polymorphism in exon 10 of the low-density lipoprotein receptor gene. **Human Genetics**. v. 89, n. 3, p. 362, 1992.
- WATTS, G. F., *et al.* Integrated guidance on the care of familial hypercholesterolaemia from the International FH foundation. Department of Cardiology. **International Journal of Cardiology**. v. 171, n. 3, p. 309-325 2014.
- WEBB, J.C., *et al.* Characterization of mutations in the low density lipoprotein (LDL)-receptor gene in patients with homozygous familial hypercholesterolemia, and frequency of these mutations in FH patients

in the United Kingdom. **Journal of Lipid Research**. v. 37, n. 2, p.368-381, 1996.

WIDHALM, K.; DIRISAMER, A.; LINDEMAYR, A.; KOSTNER, G. Diagnosis of families with familial hypercholesterolaemia and/or Apo B-100 defect by means of DNA analysis of LDL-receptor gene mutations. **Journal of inherited metabolic disease**. v.30, p.239-247, 2007.

WHO - World Health Organization. **Global status report on noncommunicable diseases 2014**. Attaining the nine global noncommunicable diseases targets; a shared responsibility. Geneva, Switzerland. 2014.

WHO - World Health Organization. **Prevention of Cardiovascular risk - Guidelines for assessment and management of cardiovascular risk**. Geneva, Switzerland. 2007.

WIEGMAN, A., *et al.* Familial hypercholesterolaemia in children and adolescents: gaining decades of life by optimizing detection and treatment. **European Heart Journal**. v. 36, p. 2425-2437, 2015.

WONDERLING, D., *et al.* Cost-effectiveness analysis of the genetic screening program for familial hypercholesterolemia in The Netherlands. **Seminars in Vascular Medicine**. v. 4, p. 97-104, 2004.

WONG, B., *et al.* Cardiovascular disease risk associated with familial hypercholesterolemia: A systematic review of the literature. **Clinical Therapeutics**. v. 38, n. 7, p.1696-709, 2016.

WUSTNER, D.; SOLANKO, K. How cholesterol interacts with proteins and lipids during its intracellular transport. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1848, p. 1908-1926, 2015.

YU, W., *et al.* Molecular genetic analysis of familial hypercholesterolemia: spectrum and regional difference of LDL receptor gene mutations in Japanese population. **Atherosclerosis**. v. 165, n. 2, p. 335-342, 2002.

ZAKHAROVA, F.M., *et al.* Identification of novel missense mutation G571E, novel silent mutation H229H, nonsense mutation C74X, and four single nucleotide polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor in patients with familial hypercholesterolemia from St. Petersburg. **Bioorg Khim.** v. 27, n. 5, p. 393-396, 2001.

ZHU, H., *et al.* A common polymorphism decreases low-density lipoprotein receptor exon 12 splicing efficiency and associates with increased cholesterol. **Human Molecular Genetics.** v. 16, n. 14, p. 1765-1772, 2007.

APÊNDICE I

Termo de consentimento livre, esclarecido e revogável

Você está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) da pesquisa **“Rastreamento em cascata da hipercolesterolemia familiar: Desenvolvimento de um método de genotipagem e associação do genótipo com o fenótipo dos pacientes”**. A hipercolesterolemia familiar é uma doença que passa de pai para filho, provoca aumento muito grande do colesterol no sangue e, se a pessoa não for tratada, poderá provocar a morte em poucos anos por parada do coração ou derrame. Por isto, a presente pesquisa tem como objetivo identificar corretamente, o mais cedo possível, os indivíduos que possuem hipercolesterolemia familiar. Assim, após os exames, se você tiver a doença poderá procurar um médico cardiologista de sua confiança ou, então, você será encaminhado para acompanhamento e tratamento médico adequado na Unidade Básica de Saúde do seu município. Desta forma, precisamos da sua concordância para a coleta de uma amostra de sangue (10 mL), após jejum de 12-14 h, para as análises de laboratório. Também precisamos da sua aprovação para fazer medidas do seu peso, altura, circunferência da cintura e pressão arterial e precisamos que você responda um questionário sobre o seu estado de saúde e de seus familiares mais próximos, principalmente sobre se alguém da família já teve parada do coração ou derrame. Para garantir o seu bem-estar, se houver algum cansaço ou desconforto ao responder o questionário, ele não precisará ser preenchido por completo, ou poderá ser preenchido em outro dia. Você não será obrigado a responder o questionário, se assim desejar.

A coleta de sangue será feita por profissional especializado, que tem experiência em colher sangue. Porém, mesmo assim, a coleta de sangue poderá provocar um pouco de dor causada pela picada da agulha e, às vezes, a formação de uma mancha rocha, que desaparecerá em poucos dias. Para algumas pessoas, poderá ocorrer um pequeno desmaio devido ao nervosismo. Caso isto ocorra, você será prontamente atendido pelos profissionais no próprio local da coleta.

Esta pesquisa não oferece riscos maiores do que os mencionados acima e não tem fins lucrativos. Os resultados do estudo poderão ser publicados em revistas ou eventos científicos, sem que o seu nome seja dito. A sua participação é voluntária, não provocará nenhum tipo de discriminação ou preconceito, não envolverá custo financeiro, e

se você precisar gastar dinheiro com alguma coisa relacionada com a pesquisa, você receberá todo o dinheiro de volta pelos pesquisadores abaixo assinados. Você receberá uma cópia deste termo de assentimento e poderá desistir da pesquisa em qualquer momento, sem necessidade de justificativas. Se houver danos referentes à pesquisa, garantimos a assistência total e a indenização justa e necessária. Ao final do estudo, você receberá os resultados obtidos e, conforme o resultado, você será orientado a procurar um médico cardiologista de sua confiança para iniciar o tratamento adequado.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC, situado no Prédio Reitoria II, 4º andar, sala 401 (Rua Desembargador Vitor Lima nº 222, Trindade, Florianópolis), e está de acordo com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, para proteger os direitos dos seres humanos em pesquisas

Eu, abaixo assinado, fui esclarecido sobre a pesquisa e concordo em participar deste estudo. Afirmando que estou ciente da pesquisa e da forma de coleta do material necessário e **AUTORIZO** a utilização de sangue e dos demais dados coletados, sem que haja divulgação de meus dados pessoais. Se persistir alguma dúvida ou quiser desistir do estudo, poderei fazê-lo pessoalmente com os pesquisadores no Laboratório de Pesquisa em Lipídeos, Antioxidantes e Aterosclerose, localizado no 1º andar do Bloco K, Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina (Rua Delfino Conti s/n, Trindade. CEP 88040-370, Florianópolis-SC) ou através dos telefones (48) 3721-48.51 ou 9997-69.66, sem justificativas.

Nome: _____

Endereço: _____

RG: _____ Telefone: _____

Assinatura do voluntário: _____

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Edson Luiz da Silva

Telefones de contato: (48) 3721-4159; 3721-2778

Assinatura do Pesquisador _____

Pesquisador Assistente: Heloisa Pamplona Cunha

Telefone de contato: (48) 9997-6966

Assinatura do Pesquisador _____

Florianópolis, / /2015.

APÊNDICE II

Termo de Assentimento

Você está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) da pesquisa **“Rastreamento em cascata da hipercolesterolemia familiar: Desenvolvimento de um método de genotipagem e associação do genótipo com o fenótipo dos pacientes”**. A hipercolesterolemia familiar é uma doença que passa de pai para filho, provoca aumento muito grande do colesterol no sangue e, se a pessoa não for tratada, poderá provocar a morte em poucos anos por parada do coração ou derrame. Por isto, a presente pesquisa tem como objetivo identificar corretamente, o mais cedo possível, os indivíduos que possuem hipercolesterolemia familiar. Assim, após os exames, se você tiver a doença poderá procurar um médico cardiologista de sua confiança ou, então, você será encaminhado para acompanhamento e tratamento médico adequado na Unidade Básica de Saúde do seu município. Desta forma, precisamos da sua concordância para a coleta de uma amostra de sangue (10 mL), após jejum de 12-14 h, para as análises de laboratório. Também precisamos da sua aprovação para fazer medidas do seu peso, altura, circunferência da cintura e pressão arterial e precisamos que você responda um questionário sobre o seu estado de saúde e de seus familiares mais próximos, principalmente sobre se alguém da família já teve parada do coração ou derrame. Para garantir o seu bem-estar, se houver algum cansaço ou desconforto ao responder o questionário, ele não precisará ser preenchido por completo, ou poderá ser preenchido em outro dia. Você não será obrigado a responder o questionário, se assim desejar.

A coleta de sangue será feita por profissional especializado, que tem experiência em colher sangue. Porém, mesmo assim, a coleta de sangue poderá provocar um pouco de dor causada pela picada da agulha e, às vezes, a formação de uma mancha roxa, que desaparecerá em poucos dias. Para algumas pessoas, poderá ocorrer um pequeno desmaio devido ao nervosismo. Caso isto ocorra, você será prontamente atendido pelos profissionais no próprio local da coleta.

Esta pesquisa não oferece riscos maiores do que os mencionados acima e não tem fins lucrativos. Os resultados do estudo poderão ser publicados em revistas ou eventos científicos, sem que o seu nome seja dito. A sua participação é voluntária, não provocará nenhum tipo de discriminação ou preconceito, não envolverá custo financeiro, e

se você precisar gastar dinheiro com alguma coisa relacionada com a pesquisa, você receberá todo o dinheiro de volta pelos pesquisadores abaixo assinados. Você receberá uma cópia deste termo de assentimento e poderá desistir da pesquisa em qualquer momento, sem necessidade de justificativas. Se houver danos referentes à pesquisa, garantimos a assistência total e a indenização justa e necessária. Ao final do estudo, você receberá os resultados obtidos e, conforme o resultado, você será orientado a procurar um médico cardiologista de sua confiança para iniciar o tratamento adequado.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC, situado no Prédio Reitoria II, 4º andar, sala 401 (Rua Desembargador Vitor Lima nº 222, Trindade, Florianópolis), e está de acordo com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, para proteger os direitos dos seres humanos em pesquisas.

Eu, abaixo assinado, fui esclarecido sobre a pesquisa e concordo em participar deste estudo. Afirmando que estou ciente da pesquisa e da forma de coleta do material necessário e **AUTORIZO** a utilização de sangue e dos demais dados coletados, sem que haja divulgação de meus dados pessoais. Se persistir alguma dúvida ou quiser desistir do estudo, poderei fazê-lo pessoalmente com os pesquisadores no Laboratório de Pesquisa em Lipídeos, Antioxidantes e Aterosclerose, localizado no 1º andar do Bloco K, Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina (Rua Delfino Conti s/n, Trindade. CEP 88040-370, Florianópolis-SC) ou através dos telefones (48) 3721-48.51 ou 9997-69.66, sem justificativas.

Nome: _____

Endereço: _____

RG: _____ Telefone: _____

Assinatura do responsável pelo voluntário: _____

RG do responsável pelo voluntário: _____

Pesquisador Responsável: Prof. Dr Edson Luiz da Silva

Telefone de contato: (48) 3721-41.59; 3721-27.78

Assinatura do Pesquisador _____

Pesquisador Assistente: Heloisa Pamplona Cunha

Telefone de contato: (48) 9997-6966

Assinatura do Pesquisador _____

Florianópolis, / /2015.

APÊNDICE III

Questionários de informações sobre o paciente

Nome: _____

Sexo: Masculino Feminino

Data de Nascimento __/__/____ Idade ____ anos

Endereço: _____

_____ Telefone: _____

Responsável pelas respostas Paciente Cuidador

Profissão: _____

Qual foi o último anos da escola que completou? _____

Qual sua cor de pele? Branco Negro Amarelo Pardo

Nome da mãe: _____

Idade da mãe: _____

Profissão da mãe: _____

Qual foi o último anos da escola que ela completou? _____

Fumante? Sim Não

Nome do pai: _____

Idade do pai: _____

Profissão do pai: _____

Qual foi o último anos da escola que ele completou? _____

Fumante? Sim Não

Você lembra de onde vieram seus avós ou bisavós? Quais países?

Avó materna	
Avô materno	
Avó paterna	
Avô paterno	
Bisavós paternos	
Bisavós maternos	

Horas de tela

Quantas horas, em média, passa assistindo TV ou vídeo por dia?	_____ horas
Quantas horas, em média, passa jogando <i>videogame</i> , jogos no computador ou <i>minigame</i> por dia?	_____ horas
Quantas horas, em média, passa navegando na <i>internet</i> por dia?	_____ horas

Tabagismo

1. Quantos cigarros fumou na última semana (adolescentes e adultos)	_____ cigarros
2. Com quantos anos você fumou a primeira vez ?	_____ anos

Atividade física

As perguntas abaixo estão relacionadas ao tempo que você gastou fazendo atividade física na ÚLTIMA semana. As perguntas incluem as atividades que você fez no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Por favor responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo. Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realizou por pelo menos 10 minutos contínuos de cada vez.

Para responder as questões lembre que:

- Atividades físicas VIGOROSAS são aquelas que precisam de grande esforço físico e que fazem respirar MUITO mais forte que o normal; geralmente suamos muito e não conseguimos conversar durante a atividade.

- Atividades físicas MODERADAS são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar UM POUCO mais forte que o normal moderadamente sua respiração ou batimentos do coração (POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA)

- Atividades físicas LEVES são aquelas que precisam de pouco esforço físico, e que geralmente não fazem as pessoas suarem em um dia de temperatura amena

Quantos dias da última semana você CAMINHOU por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer ou como forma de exercício?	_____ dias () Nenhum
Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou caminhando por dia?	Horas: _____ Minutos: _____
Quantos dias da última semana, você realizou atividades MODERADAS por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, quintal ou no jardim como varrer,	_____ dias () Nenhum

aspirar, ou qualquer atividade que fez aumentar um pouco sua respiração ou batimentos do coração.	
Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades por dia?	Horas: _____ Minutos: _____
Em quantos dias da última semana, você realizou atividades VIGOROSAS por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar MUITO sua respiração ou batimentos do coração.	_____ dias () Nenhum
Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades por dia?	Horas: _____ Minutos: _____

Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentando durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

Quanto tempo no total você gastou sentado durante um dia de semana, em média?	Horas: _____ Minutos: _____
Quanto tempo no total você gastou sentado durante em um dia de final de semana?	Horas: _____ Minutos: _____

Pressão arterial

Pressão arterial	Sistólica	Diastólica	Hora
Medida inicial			: hs

Você tem resultados de exames anteriores? Tem tratamentos anteriores? Por favor, descreva.

Você tem parentes com colesterol alto? Eles tomam ou tomavam remédio? Já tiveram algum ataque de coração? Com que idade?

Parentesco	Remédio	Doença arterial coronariana	Idade

Pressão arterial

Pressão arterial	Sistólica	Diastólica	Hora
Segunda medida			: hs

Antropometria e exame clínico

Estatura: _____ cm	Peso: _____ Kg	Cintura abdominal ____ cm
Localização de xantoma tendinoso	Palpável	Visível
	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
FC: _____ bpm	Arco corneano	Sopro sistólico aórtico
FR: _____ rpm	(menor que 45 anos)	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	

Tem indicação para teste ergométrico?

> 20 anos com alto risco > 30 anos com risco baixo para homens > 45 anos com risco baixo para mulheres	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
--	---

Tratamento

Orientação alimentar: _____
Aconselhamento psicológico: _____
Medicações: _____
Exames adicionais: _____

Heredograma (com nomes, para localização do indivíduo na família)

--

Presença de esteatose hepática	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
Tipo	<input type="checkbox"/> Macrovesicular <input type="checkbox"/> Microvesicular <input type="checkbox"/> Mista
Localização	<input type="checkbox"/> Focal <input type="checkbox"/> Difusa
Grau	<input type="checkbox"/> I simples <input type="checkbox"/> II esteatose + inflamação <input type="checkbox"/> III esteatose + balonização celular <input type="checkbox"/> IV esteatose + balonização + fibrose

EMIC máxima	_____ mm
Presença de placa elevada	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
Presença de obstrução coronariana	_____ %
VOP	_____ m/s

Critérios

1 ponto: item 1 OU item 2	_____ pontos
1. Alguma pessoa da família teve enfarte ou ataque do coração com menos de 55 anos de idade (se homem) ou menos de 60 anos de idade (se mulher)? Quem?	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sei <input type="checkbox"/> Mãe <input type="checkbox"/> Pai <input type="checkbox"/> Irmão <input type="checkbox"/> Primo <input type="checkbox"/> Avós <input type="checkbox"/> Tio <input type="checkbox"/> Filhos <input type="checkbox"/> Netos <input type="checkbox"/> Sobrinhos
2. Algum parente adulto de 1º ou 2º grau com colesterol total acima de 290 mg/dL?	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sei <input type="checkbox"/> Mãe <input type="checkbox"/> Pai <input type="checkbox"/> Irmão <input type="checkbox"/> Primo <input type="checkbox"/> Avós <input type="checkbox"/> Tio <input type="checkbox"/> Filhos <input type="checkbox"/> Netos <input type="checkbox"/> Sobrinhos
2 pontos: item 3 OU item 4	_____ pontos
3. Algum parente de 1º grau com xantomas tendinosos e/ou arco corneano ?	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sei <input type="checkbox"/> Mãe <input type="checkbox"/> Pai <input type="checkbox"/> Irmão <input type="checkbox"/> Avós <input type="checkbox"/> Filho <input type="checkbox"/> Netos
4. Algum parente de 1º grau com menos de 16 anos com colesterol acima de 260 mg/dL?	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sei <input type="checkbox"/> Mãe <input type="checkbox"/> Pai <input type="checkbox"/> Irmão <input type="checkbox"/> Avós <input type="checkbox"/> Filhos <input type="checkbox"/> Netos

5. Você teve enfarte ou ataque do coração com menos de 55 anos de idade (se homem) ou menos de 60 anos de idade (se mulher)? 2 pontos	_____ pontos
6. Você teve derrame ou doença arterial periférica com menos de 55 anos de idade (se homem) ou menos de 60 anos de idade (se mulher)? 1 ponto	_____ pontos
7. Xantoma tendinoso presente? 6 pontos	_____ pontos
8. Arco corneano presente (menor que 45 anos)? 4 pontos	_____ pontos
9. Nível de LDL colesterol (mg/dL) > 330 – 8 pontos 250 - 329 - 5 pontos 190 – 249 – 3 pontos 155 – 189 – 1 ponto	_____ pontos
10. Presença de mutação funcional do gene do receptor do LDL, ApoB100 ou PCSK9? 8 pontos	_____ pontos
Diagnóstico: _____ pontos	<input type="checkbox"/> Certeza (> 8 pontos) <input type="checkbox"/> Provável (6-8 pontos) <input type="checkbox"/> possível (3-5 pontos) <input type="checkbox"/> Ausente (0-2 pontos)

Critérios de alto risco para HF

Doença cardiovascular ou coronariana estabelecida	Infarto, derrame, doença arterial periférica, cirurgia de safena ou angioplastia coronariana, dor no peito, Estenose de carótida > 50%, aneurisma de aorta	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Tabagista		Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Diabetes <i>mellitus</i>	Diagnóstico definitivo ou tratamento para diabetes	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Historia familiar de insuficiência coronariana	Homens com < 45 anos	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>

precoce em parentes de 1º ou 2º graus	Mulheres com < 55 anos	
2 ou mais fatores de risco em hipercolesterolemia familiar	Tabela seguinte	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>

Fatores de Risco em Hipercolesterolemia Familiar

Critério	Parâmetro	Presença
Idade	Mulher > 40 anos Homem > 30 anos	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
LDL-C	> 250 mg/dL	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Sexo	Masculino	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Tabagismo	Tabagismo atual	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
História de ICo precoce	Parentes de 1º grau Masculino < 55 anos Feminino < 65 anos	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Síndrome metabólica	Circ abdominal > esperado para idade ou IMC > 30 ou P ₉₅ + 2 dos seguintes - TG >+ 150 mg/dL ou tto - HDL < 40 mg/dL homens < 50 mg/dL mulheres - HAS >+ 130 mmHg ou P ₉₅ >+ 85 mmHg ou P ₉₅ ou tto - Glicemia plasmática Glicemia > 100 mg/dL Diagnóstico de DM tipo II	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
HDL	< 40 mg/dL em homens < 50 mg/dL em mulheres	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
HAS	PA > 140/90 mmHg	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Lipoproteína(a)	> 60 mg/dL	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Exame físico	Xantomas	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>

APÊNDICE IV

Características gerais dos membros da família de Papanduva-SC

Indivíduo	Fumante	Anos de estudo	Exercício	Ansiedade	Depressão
1	Sim	3	Mínimo	Sim	Sim
2	Não	3	Mínimo	Tendência	Sim
3	Sim	-	Mínimo	-	-
4	Sim	0	Moderado	SSS	SSS
5	Sim	4	Moderado	Sim	SSS
6	Não	4	Moderado	Sim	Tendência
7	Sim	4	Moderado	Sim	SSS
8	Sim	4	Mínimo	SSS	SSS
9	Não	4	Moderado	SSS	SSS
10	Sim	2	Moderado	SSS	SSS
11	Sim	3	Mínimo	Sim	Tendência
12	Sim	3	Mínimo	Sim	SSS
13	Sim	2	Ativo	Sim	Sim
14	Sim	-	Mínimo	SSS	SSS
15	Sim	2	Moderado	Sim	Sim
16	Sim	2	Moderado	Sim	SSS
17	Sim	3	Moderado	Sim	SSS
18	Não	4	Moderado	SSS	SSS
19	Sim	12	Moderado	SSS	SSS
20	Sim	8	Moderado	Sim	SSS
21	Não	10	Moderado	Sim	Sim
22	Não	12	Moderado	Sim	Tendência
23	Não	8	Moderado	Sim	Sim
24	Não	8	Ativo	Sim	SSS
25	Não	8	Mínimo	Tendência	SSS
26	Não	12	Ativo	Sim	Tendência
27	Não	3	Moderado	Sim	SSS

28	Não	6	Moderado	Sim	Tendência
29	Não	5	Moderado	Sim	Sim
30	Sim	4	Moderado	SSS	Tendência
31	Não	5	Moderado	Sim	Sim
32	Sim	8	Ativo	Tendência	SSS
33	Sim	4	Moderado	Tendência	SSS
34	Não	7	Ativo	Sim	Sim
35	Não	0	Moderado	Sim	Tendência

CT: Colesterol Total; SSS: Sem sintomas significativos. * Apresentavam dislipidemia.

APÊNDICE V

Características gerais dos membros da família de Bom Despacho-MG

Indivíduo	Fumante	Anos de estudo	Exercício	Ansiedade	Depressão
36	Não	4	Moderado	Tendência	SSS
37	Não	4	Mínimo	Sim	Tendência
38	Sim	7	Mínimo	Tendência	SSS
39	Não	10	Moderado	Sim	SSS
40	Sim	8	Mínimo	Sim	Tendência
41	Não	12	Mínimo	Sim	Sim
42	Não	5	Moderado	SSS	SSS
43	Não	12	Moderado	Sim	Tendência
44	Não	12	Moderado	Tendência	SSS
45	Não	8	Moderado	Sim	SSS
46	Não	12	Moderado	Sim	SSS
47	Sim	12	Moderado	Sim	SSS
48	Não	9	Ativo	Tendência	SSS
49	Não	9	Moderado	SSS	SSS
50	Não	16	Mínimo	Tendência	SSS
51	Não	13	Mínimo	Sim	SSS
52	Não	9	Ativo	Tendência	SSS
53	Não	12	Mínimo	SSS	SSS
54	Não	2	Moderado	Tendência	SSS
55	Não	3	Moderado	Tendência	SSS
56	Não	16	Ativo	Tendência	Tendência
57	Não	16	Moderado	Sim	SSS
58	Não	4	Moderado	-	-
59	Não	6	Moderado	SSS	Tendência
60	Não	9	Moderado	SSS	SSS
61	Não	12	Moderado	Sim	SSS
62	Não	16	Moderado	SSS	SSS

63	Não	8	Ativo	SSS	SSS
64	Não	2	Moderado	Tendência	SSS
65	Não	-	Moderado	-	-
66	Não	9	Ativo	SSS	SSS
67	Não	2	Mínimo	Sim	Sim
68	Sim	4	Ativo	Sim	Tendência
69	Não	4	Moderado	Tendência	SSS
70	Não	8	Moderado	Sim	Tendência
71	Não	2	Ativo	Sim	Tendência
72	Não	4	Moderado	Tendência	Tendência
73	Sim	4	Moderado	Sim	Sim
74	Sim	8	Mínimo	SSS	SSS
75	Não	12	Moderado	Tendência	SSS
76	Não	14	Moderado	Tendência	SSS
77	Não	14	Moderado	Sim	SSS
78	Não	-	Moderado	Sim	SSS
79	Sim	12	Moderado	SSS	SSS
80	Não	10	Mínimo	Sim	SSS
81	Não	12	Moderado	Tendência	SSS
82	Não	8	Ativo	Sim	SSS
83	Sim	2	Mínimo	Sim	Tendência
84	Sim	6	Moderado	Sim	Tendência
85	Sim	2	Moderado	SSS	SSS
86	Não	8	Moderado	Tendência	Tendência
87	Não	4	Moderado	SSS	SSS
88	Não	6	Moderado	Tendência	SSS
89	Não	12	Moderado	SSS	Tendência
90	Não	14	Ativo	SSS	SSS
91	Não	14	Mínimo	SSS	SSS
92	Não	8	Ativo	SSS	SSS
93	Não	5	Moderado	SSS	SSS

94	Sim	4	Ativo	SSS	SSS
95	Não	12	Ativo	Sim	SSS
96	Não	8	Mínimo	SSS	SSS
97	Não	8	Mínimo	SSS	SSS
98	Não	6	Mínimo	SSS	SSS
99	Não	11	Moderado	SSS	SSS
100	Não	6	Ativo	Tendência	SSS
101	Não	16	Moderado	Sim	SSS
102	Sim	5	Ativo	SSS	SSS
103	Não	5	Ativo	SSS	SSS
104	Não	-	Moderado	SSS	SSS
105	Não	-	Moderado	SSS	SSS
106	Não	4	Moderado	SSS	SSS
107	Não	10	Moderado	Tendência	SSS
108	Não	3	Moderado	SSS	SSS
109	Não	3	Moderado	SSS	SSS
110	Não	2	Moderado	SSS	SSS
111	Não	2	Moderado	SSS	SSS
112	Não	3	Moderado	SSS	SSS
113	Não	12	Moderado	Sim	Tendência
114	Sim	4	Moderado	Tendência	SSS
115	Sim	6	Mínimo	SSS	Tendência
116	Não	4	Ativo	Tendência	SSS
117	Não	8	Ativo	SSS	SSS
118	Não	-	Moderado	SSS	SSS
119	Não	1	Moderado	Tendência	Tendência
120	Não	12	Mínimo	SSS	SSS
121	Sim	9	Mínimo	Tendência	SSS
122	Não	14	Moderado	Sim	Tendência
123	Não	3	Ativo	SSS	SSS

SSS: Sem sintomas significativos.

ANEXO I

Parecer do Comitê de ética em pesquisa com seres humanos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Rastreamento em cascata da hipercolesterolemia familiar a partir do desenvolvimento de um método de genotipagem e associação do genótipo com o fenótipo dos pacientes.

Pesquisador: Edson Luiz da Silva

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 54585416.1.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Programa de Pós-Graduação em Farmácia

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.694.087

Apresentação do Projeto:

Trata-se do projeto de pesquisa de Edson Luiz da Silva, que objetiva padronizar um método para a identificação de mutações causadoras de HF e, a partir dele, identificar pacientes com HF em diferentes regiões do Brasil, definir seu risco cardiovascular e associar o genótipo com o fenótipo encontrado. A coleta de amostras (sangue total, soro e swab bucal) será realizada nas regiões do país onde se obtiver apoio das Sociedades de Cardiologia, Endocrinologia e Pediatria, bem como dos profissionais responsáveis pelas coletas. Com base em informações pessoais, parâmetros laboratoriais, histórico de tratamento e genotipagem, será feita a identificação dos casos índices com HF. Após o sequenciamento dos genes causadores de HF e, a partir das mutações encontradas, será feita triagem dos parentes de 1o, 2o e 3o graus dos casos índices. Será realizada avaliação dos marcadores de risco para DCV, como colesterol total, LDL-c, HDL-c, triglicerídeos, glicose, LDL pequena e densa (sd-LDL), LDL oxidada (ox-LDL), AST, ALT, ureia, creatinina, proteína C reativa de alta sensibilidade, APOB, APOA1, lipoproteína (a) (Lp(a)), através de métodos laboratoriais. Também serão realizadas as medidas antropométricas e a aferição da pressão arterial. Com a presente proposta, espera-se, criar uma rede de pesquisa sobre HF e, a

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401

Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400

UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3721-6094

E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 1.694.087

partir do método criado, aumentar o diagnóstico dos pacientes brasileiros, propiciando o tratamento adequado e diminuindo a mortalidade precoce. A amostragem será composta por 200 participantes suspeitos de terem HF.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Este estudo tem como objetivo central o desenvolvimento de um método para diagnóstico da hipercolesterolemia familiar através da genotipagem dos três principais genes envolvidos com a doença e a realização do rastreamento genético em cascata a partir dos casos índices diagnosticados, associando as mutações identificadas com o fenótipo dos indivíduos, evidenciando assim, a gravidade de cada mutação. O estudo visa ainda, a identificação correta e precoce dos indivíduos com HF, para assim, direcioná-los ao acompanhamento e tratamento adequado.

Objetivo Secundário:

- Padronizar um método para extração de DNA de leucócitos em amostras de sangue total e de células epiteliais coletadas com swab bucal;
- Desenhar iniciadores específicos para a amplificação dos 18 exons do LDLR, 29 exons da APOB e 12 exons da proteína PCSK9; - Padronizar a amplificação dos fragmentos de DNA através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR);
- Purificar os fragmentos de DNA amplificados e sequenciá-los para posterior comparação com o banco de dados e identificação de mutações; - Triar, por meio do perfil lipídico sérico e dados clínicos, os indivíduos com suspeita de hipercolesterolemia familiar (caso-índice);
- Realizar nos casos índices, a genotipagem para identificação de mutações no gene LDLR; - Nos indivíduos com suspeita de HF que não forem encontradas mutações no LDLR, sequenciar os genes da ApoB e PCSK9; - De acordo com as mutações identificadas, realizar o rastreamento genético em cascata nos parentes de 1o, 2o e 3o graus dos acientes índices;
- Estratificar o risco cardiovascular de pacientes com diagnóstico genético de HF através de aferição das medidas antropométricas (peso, altura e circunferência abdominal); aferição da pressão arterial para identificação de pré-hipertensão ou hipertensão graus I e II; quantificação de parâmetros laboratoriais (glicose, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicerídeos, PCR-as, AST, ALT, ureia e creatinina, insulina, Apo A, Apo B, Lp (a), ox-LDL);
- Associar o genótipo com o fenótipo do paciente.
- Comparar os resultados bioquímicos entre os pacientes com e sem HF comprovada geneticamente.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 1.694.087

- Espera-se diagnosticar cerca de 20 casos-índices nos estados de Santa Catarina, Minas Gerais e São Paulo, ou seja, 20 famílias serão triadas em cascata para a identificação de novos casos de hipercolesterolemia familiar através da metodologia desenvolvida no laboratório.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos para os voluntários se resumem a dor e desconforto durante a punção para coleta de sangue. Todos os dados serão sigilosos e mantidos por 5 anos, quando serão eliminados. Todos os cuidados de biossegurança para prevenção e minimização de riscos inerentes às atividades realizadas serão tomados durante todo o período da pesquisa, visando proteção à saúde, preservação do ambiente e qualidade dos resultados obtidos.

Benefícios:

A partir do diagnóstico definitivo de HF, será possível fazer a estratificação do risco cardiovascular, nutricional, de hábitos de vida e psicológico destes pacientes e assim, providenciar tratamento e acompanhamento adequado, diminuindo então, a morbidade e mortalidade destes pacientes. Além disto, a partir da identificação dos casos índices, será possível fazer o rastreamento em cascata dos familiares, facilitando o diagnóstico e tratamento precoce da HF.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não tenho comentários.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto de pesquisa, TCLE e TALE e folha de rosto estão presentes. Não há, porém, declarações das instituições onde serão coletados os dados.

Recomendações:

Não tenho.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto só tem a liberação para coletar dados nos dois locais para os quais foram apresentadas declarações de ciência e consentimento.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 1.694.087

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_682769.pdf	17/07/2016 20:00:27		Aceito
Outros	Respostas_pendencias.pdf	17/07/2016 19:57:49	Heloisa Pamplona Cunha	Aceito
Outros	IPAQ.pdf	17/07/2016 19:56:22	Heloisa Pamplona Cunha	Aceito
Outros	Registro_alimentar.pdf	14/07/2016 17:37:04	Edson Luiz da Silva	Aceito
Outros	Questionario_geral.pdf	14/07/2016 17:36:29	Edson Luiz da Silva	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	14/07/2016 17:32:44	Edson Luiz da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Hipercol_Familiar_2.pdf	14/07/2016 17:31:28	Edson Luiz da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Assentimento_Hipercol.pdf	14/07/2016 17:27:44	Edson Luiz da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento.pdf	14/07/2016 17:27:28	Edson Luiz da Silva	Aceito
Cronograma	Cronograma_do_projeto.pdf	14/07/2016 17:26:36	Edson Luiz da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Instituicao_Colaboradora_Bom_Despacho.pdf	14/07/2016 17:25:57	Edson Luiz da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Instituicao_Colaboradora_Papanduva.pdf	14/07/2016 17:25:44	Edson Luiz da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Pesquisador_Colaborador_Isabela.pdf	14/07/2016 17:24:43	Edson Luiz da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Coordenador_Pesquisadora.pdf	22/03/2016 11:28:48	Edson Luiz da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Pesquisador_Colaborador_Thais.pdf	22/03/2016 11:27:45	Edson Luiz da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Instituicao_Departamento.pdf	22/03/2016 11:26:47	Edson Luiz da Silva	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto_HPCOL_Assinada.pdf	21/03/2016 15:23:25	Edson Luiz da Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
 UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
 Telefone: (48)3721-6094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.694.087

Não

FLORIANOPOLIS, 23 de Agosto de 2016

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

ANEXO II

Código genético

Código (1 letra)	Código (3 letras)	Aminoácido
A	Ala	Alanina
R	Arg	Arginina
N	Asn	Asparagina
D	Asp	Aspartato
C	Cys	Cisteína
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutâmico
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
K	Lys	Lisina
M	Met	Metionina
F	Phe	Fenilalanina
P	Pro	Prolina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina
V	Val	Valina