

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA
ENDOCRINOLOGIA

HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR – O IMPACTO DO TESTE GENÉTICO

MARIA JOÃO MARINHO NASCIMENTO

M

2024



Hipercolesterolemia Familiar – O Impacto do Teste Genético

Mestrado Integrado em Medicina

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto

Estudante: Maria João Marinho Nascimento

Aluna do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina (nº mecanográfico: 201807557)

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto

Endereço de correio eletrónico: up201807557@icbas.up.pt

Orientadora: Dra. Isabel Maria Gonçalves Mangas Neto da Palma

Assistente Hospitalar Graduada de Endocrinologia no Centro Hospitalar Universitário de Santo António

Professora Auxiliar Convidada do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Endereço de correio eletrónico: isabel.m.mangas@gmail.com

Coorientadoras:

Dra. Liliana Cecília Martins Fonseca

Assistente Hospitalar de Endocrinologia no Centro Hospitalar Universitário de Santo António

Professora Doutora Maria Helena Cardoso Pereira da Silva

Assistente Graduada Sénior de Endocrinologia no Centro Hospitalar Universitário de Santo António

Professora Catedrática Convidada do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

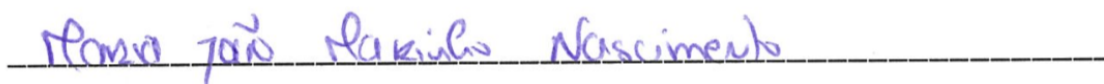
Maio de 2024

Hipercolesterolemia Familiar – O Impacto do Teste Genético

Mestrado Integrado em Medicina

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto

Estudante:



(Maria João Marinho Nascimento)

Orientadora:

Assinado por: **Isabel Maria Gonçalves Mangas
Neto da Palma**
Num. de Identificação: 07019940
Data: 2024.06.02 17:57:32+01'00'

(Dra. Isabel Maria Gonçalves Mangas Neto da Palma)

Coorientadora:



(Dra. Liliana Cecília Martins Fonseca)

Coorientadora:

Assinado por: **MARIA HELENA CARDOSO PEREIRA
DA SILVA**
Num. de Identificação: 03001313
Data: 2024.06.02 17:43:22+01'00'

(Prof. Dra. Maria Helena Cardoso Pereira da Silva)

Maio de 2024

Dedicatória

Aos meus pais e à minha irmã, a quem agradeço do fundo do coração pelo amor, pelas palavras de confiança em momentos de crise, pelo apoio incondicional, por terem acreditado sempre em mim e por me terem dado a mão durante todo este caminho, mas, acima de tudo, um agradecimento pelo que sou hoje.

Aos meus amigos, que ajudaram a tornar este percurso mais leve e a quem agradeço, diariamente, por estarem presentes em todos os momentos desta caminhada que tanto orgulho me traz.

À Prof. Dra. Carla Araújo, um agradecimento por todas as explicações, sugestões e pelo enorme contributo neste meu percurso.

Agradecimentos

Um especial agradecimento à Dra. Isabel Palma, por aceitar o meu pedido de orientação, pela disponibilidade, tranquilidade e positividade, por todo o conhecimento partilhado e, ainda, por todo o apoio que me prestou no desenvolvimento deste trabalho.

Um agradecimento às minhas coorientadoras, Dra. Liliana Fonseca e à Prof. Dra. Helena Cardoso, pela receptividade em colaborar na elaboração desta dissertação, pelo contributo na estimulação do meu espírito crítico e clínico e por todas as sugestões e apoio.

Resumo

Introdução: A Hipercolesterolemia Familiar (HF) é uma doença hereditária do metabolismo dos lípidos, que cursa com elevação do colesterol presente nas lipoproteínas de baixa densidade (c-LDL) durante toda a vida, estando associada a um elevado risco de doença cardiovascular (DCV) prematura. Esta patologia é, na maioria dos casos, resultante de mutações com perda de função do recetor do c-LDL (*LDLR*). O diagnóstico clínico da HF é realizado através de critérios que incluem antecedentes pessoais, história familiar, valores de colesterol total (CT), c-LDL e achados ao exame físico (xantomas tendinosos e/ou arco corneano). Atualmente, é realizado um painel genético com pesquisa das principais mutações associadas à HF nos doentes com suspeita de HF ou nos seus familiares de primeiro grau (rastreamento em cascata), sendo cada vez mais considerado o *gold standard* na identificação da HF.

Objetivos: Avaliar, nos doentes com suspeita clínica de HF e/ou nos familiares de primeiro grau de doentes com HF confirmada, seguidos na Consulta Multidisciplinar de Dislipidemias do Serviço de Endocrinologia da Unidade Local de Saúde de Santo António (ULSSA), entre janeiro de 2012 e dezembro de 2023, qual o impacto da realização do teste genético (1) na concordância entre os critérios de diagnóstico clínico e genético, (2) no rastreio de familiares, (3) na estratégia terapêutica aplicada, (4) na resposta aos fármacos hipolipemiantes e consequentemente na capacidade de atingir o valor alvo de c-LDL.

Métodos: Estudo de coorte retrospectivo, que incluiu os doentes com suspeita clínica de HF e/ou os familiares de 1º grau dos doentes com HF confirmada, seguidos na Consulta Multidisciplinar de Dislipidemias entre janeiro de 2012 e dezembro de 2023. Foram excluídos os doentes sem resultado do teste genético ou sem estudo analítico. Foram aplicados os critérios de *Dutch Lipid Clinic Network* (DLCN) e de *Simon Broome Register* (SBR) para diagnóstico clínico de HF, enquanto o resultado do teste genético foi utilizado para confirmação definitiva de HF. A informação clínica foi obtida por revisão manual do processo clínico eletrónico. Para a análise estatística, foi utilizado o *software* SPSS® (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 26.0 para MacBook®, considerando-se um nível de significância de 0,05.

Resultados: Dos 80 doentes em estudo, 61,3% (n=49) eram do sexo feminino, com idade mediana de 38,50 (24,00-54,75). Verificou-se a presença de pelo menos uma mutação genética associada à HF em 61,3% (n=49) dos casos, sendo o gene do *LDLR* o mais frequentemente mutado. Relativamente aos critérios de diagnóstico clínico, existe uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) nas classificações obtidas no SBR e DLCN antes e após o resultado do teste

genético. Sem o teste genético, o SBR apresenta uma sensibilidade de 71,43% e uma especificidade de 64,52% quando consideramos “provável” e “definitivo” como resultado positivo, enquanto o DLCN sem o teste genético apresenta uma sensibilidade de 41,86% e especificidade de 81,48% nas mesmas condições. Ainda, evidenciou-se que níveis mais elevados de c-LDL são um preditor independente da presença de uma mutação genética. Os doentes com HF confirmada tinham um valor mediano de c-LDL inicial de 224,00 (187,00-284,50) mg/dL, tendo sido verificada uma redução estatisticamente significativa ($p<0,001$) no c-LDL após a introdução da terapêutica hipolipemiante com valor mediano pós-terapêutica de 109,00 (69,43-150,75) mg/dL, contudo, apenas 25,0% (n=10) dos doentes se encontram no alvo recomendado de c-LDL.

Conclusões: Embora os critérios clínicos de diagnóstico de HF sejam utilizados para selecionar os doentes que devem realizar o teste genético, sem a inclusão do teste genético têm uma baixa utilidade na prática clínica, pois são incapazes de distinguir entre doentes e não doentes devido à baixa correlação genótipo-fenótipo verificada. Existe a necessidade de adaptar os critérios existentes para melhorar a sua acuidade diagnóstica. O c-LDL é o principal preditor de mutação genética identificado. Reforça-se o teste genético como *gold-standard* no diagnóstico da HF, no rastreio de familiares, na otimização dos critérios clínicos e na seleção da terapêutica mais adequada para cada doente. A HF permanece subdiagnosticada e subtratada, salientando-se a importância do diagnóstico precoce e de uma otimização da terapêutica farmacológica e não-farmacológica nestes doentes.

Palavras-chave: Dislipidemias; Colesterol, LDL; Hiperlipoproteinemia Tipo II; Teste Genético

Abstract

Introduction: Familial Hypercholesterolemia (FH) is an inheritable lipid metabolism disorder that results in a very high plasmatic concentration of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) throughout life, which is related to a higher risk of premature cardiovascular disease. This condition is, in most cases, the result of loss-of-function mutations in the LDL receptor (LDLR). The clinical diagnosis of FH is based upon clinical criteria, which include personal history, family history, total cholesterol (TC), LDL-c values, and physical examination findings (tendinous xanthomas and/or corneal arch). Currently, a genetic panel is carried out to search for the main mutations associated with FH in patients suspected of having FH or in their first-degree relatives (cascade screening), which is considered the gold standard in identifying FH.

Objectives: We aimed to assess, in patients with clinical suspicion of FH and/or first-degree relatives of patients with confirmed FH, followed in a Multidisciplinary Dyslipidemia Consultation of the Endocrinology Service of the Local Health Unit of Santo António (ULSSA), between January 2012 and December 2023, the impact of carrying out genetic testing (1) on the agreement between clinical and genetic diagnostic criteria, (2) on family screening, (3) on the therapeutic strategy applied, (4) response to lipid-lowering drugs and, consequently in the ability to reach the target LDL-c value.

Methodology: Retrospective cohort study, which included patients with clinical suspicion of FH and first-degree relatives of patients with confirmed FH, followed in a Multidisciplinary Dyslipidemia Consultation between January 2012 and December 2023. Patients without genetic test results or without analytical study were excluded. The Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) and Simon Broome Register (SBR) criteria were applied for clinical diagnosis of FH, while the genetic test result was used for definitive confirmation of FH. Clinical information was obtained through consultation of the electronic clinical file. For statistical analysis, the SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences) software, version 26.0 for MacBook® was used. Statistical significance was defined at a $< 0,05$ p value.

Results: The final cohort included 80 patients, of whom 61.3% ($n=49$) were female, with a median age of 38.50 (24.00-54.75). Genetic testing identified the presence of at least one mutation associated with FH in 61.3% ($n=49$) of cases, in which LDLR gene was the most frequently mutated. Regarding the clinical diagnosis criteria, statistically significant differences ($p<0.001$) were observed in the classifications obtained from SBR and DLCN before and after genetic analysis. Without genetic testing, SBR showed a sensitivity of 71.43% and a specificity of 64.52% when "probable" and

"definite" were considered positive, while DLCN, without genetic testing, exhibited a sensitivity of 41.86% and a specificity of 81.48% under the same conditions. Furthermore, higher c-LDL levels were identified as an independent predictor of genetic mutation presence. Patients with confirmed FH had an initial median LDL-c value of 224.00 (187.00-284.50) mg/dL, with a statistically significant reduction ($p<0.001$) in LDL-c after the introduction of therapy with a median post-therapy value of 109.00 (69.43-150.75) mg/dL, however, only 25.0% (n=10) of patients are within the recommended LDL-c target.

Conclusions: In spite of the current use of FH's clinical criteria to identify patients who should undergo genetic analysis, these criteria offer limited utility in clinical practice without genetic testing due to their inability to differentiate between patients and non-patients, given the low genotype-phenotype correlation observed. There is a need to adapt existing criteria to enhance their diagnostic accuracy. LDL-C is the primary identified predictor of genetic mutations. Genetic testing is highlighted as the gold standard in FH diagnosis, in cascade screening, in clinical criteria improvement and in the selection of the most suitable therapies for each patient. Anyhow, FH remains underdiagnosed and undertreated, emphasizing the necessity of optimizing pharmacological and non-pharmacological therapy for these patients.

Keywords: Dyslipidemias; Cholesterol, LDL; Hyperlipoproteinemia Type II; Genetic Testing

Lista de Abreviaturas

APOB	Apolipoproteína B
c-HDL	Colesterol presente nas lipoproteínas de alta densidade
c-LDL	Colesterol presente nas lipoproteínas de baixa densidade
c-não-HDL	Colesterol não presente nas lipoproteínas de alta densidade
CT	Colesterol Total
DCV	Doença Cardiovascular
DEFI	Departamento de Ensino, Formação e Investigação
DLCN	<i>Dutch Lipid Clinic Network</i>
EAS/ESC	Sociedade Europeia de Aterosclerose / Sociedade Europeia de Cardiologia
EPHF	Estudo Português da Hipercolesterolemia Familiar
HDL	<i>High Density Lipoproteins</i>
HF	Hipercolesterolemia Familiar
HTA	Hipertensão Arterial
ICBAS	Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar
IMC	Índice de Massa Corporal
LDLR	<i>LDL-Receptor</i>
Lp(a)	Lipoproteína (a)
MEDPED	<i>Make Early Diagnoses Prevent Early Deaths Program Diagnostic</i>
PCSK9	<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9</i>
ROC	<i>Receiver-Operating Characteristic Curve</i>
SBR	<i>Simon Broome Register</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TA	Tensão Arterial
TAS	Tensão Arterial Sistólica
TAD	Tensão Arterial Diastólica
TG	Triglicerídeos
ULSSA	Unidade Local de Saúde de Santo António

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	I
AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
1. INTRODUÇÃO	1
2. METODOLOGIA	4
DESENHO DO ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA	4
COLHEITA DE DADOS E VARIÁVEIS ANALISADAS	4
ANÁLISE ESTATÍSTICA	6
CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	6
3. RESULTADOS	7
SELEÇÃO DA AMOSTRA	7
CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	7
COMPARAÇÃO ENTRE OS CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO ANTES E APÓS REALIZAÇÃO DO TESTE GENÉTICO	8
AValiação DOS PREDITORES DE MUTAÇÃO PARA A HF NO TESTE GENÉTICO	10
AValiação DA EFICÁCIA DA TERAPÊUTICA NOS DOENTES COM HF CONFIRMADA GENETICAMENTE E CAPACIDADE DE ATINGIR ALVO DE C-LDL	10
4. DISCUSSÃO	12
VALIDAÇÃO E ANÁLISE DA AMOSTRA	12
O IMPACTO DO TESTE GENÉTICO	13
AValiação DOS PREDITORES DE MUTAÇÃO PARA A HF NO TESTE GENÉTICO	16
AValiação DA EFICÁCIA DA TERAPÊUTICA NA HF	16
LIMITAÇÕES DO ESTUDO	17
5. CONCLUSÕES	18
ANEXOS	19
TABELAS	19
FIGURAS	45
BIBLIOGRAFIA	49

Lista de Tabelas

Tabela I: Critérios de Diagnóstico de Hipercolesterolemia Familiar da *Dutch Lipid Clinic Network*.

Tabela II: Critérios de Diagnóstico *Simon Broome* para Hipercolesterolemia Familiar.

Tabela III: Distribuição dos Doentes da Amostra por Sexo.

Tabela IV: Caracterização dos Parâmetros Antropométricos da Amostra.

Tabela V: Distribuição dos Doentes da Amostra por Motivo de Realização de Teste Genético.

Tabela VI: Distribuição dos Doentes da Amostra Consoante Resultados do Teste Genético.

Tabela VII: Distribuição dos Doentes da Amostra Consoante Número de Mutações Identificadas.

Tabela VIII: Distribuição dos Doentes com Mutação Identificada Consoante o Gene Mutado.

Tabela IX: Distribuição dos Doentes com Mutação Identificada Consoante a Hereditabilidade.

Tabela X: Caracterização das Mutações Identificadas.

Tabela XI: Caracterização dos Doentes da Amostra Consoante Antecedentes Pessoais.

Tabela XII: Caracterização dos Doentes da Amostra Consoante História Familiar.

Tabela XIII: Caracterização do Perfil Lipídico da Amostra na 1ª Consulta de Especialidade.

Tabela XIV: Caracterização do Hemograma da Amostra na 1ª Consulta de Especialidade.

Tabela XV: Avaliação da Classificação Obtida Pela Amostra com o SBR sem teste genético e após a realização de teste genético.

Tabela XVI: Avaliação da Classificação Obtida Pela Amostra com o SBR com teste genético e a capacidade de identificação da doença.

Tabela XVII: Avaliação da Classificação Obtida Pela Amostra com o DLCN sem teste genético e após a realização de teste genético.

Tabela XVIII: Avaliação da Classificação Obtida Pela Amostra com o DLCN com teste genético e a capacidade de identificação da doença.

Tabela XIX: Valores Preditivos dos Principais Critérios de Diagnóstico Clínico de HF do Diagnóstico Genético de HF.

Tabela XX: Fatores Preditores de Mutação para HF no Teste Genético.

Tabela XXI: Caracterização da Terapêutica Realizada pelos Doentes com HF Confirmada.

Tabela XXII: Caracterização do Perfil Lipídico dos Doentes com HF Confirmada.

Tabela XXIII: Doentes com HF Confirmada e Relação com Alvo Terapêutico de c-LDL, c-não-HDL e ApoB.

Tabela XXIV: Caracterização do Perfil Lipídico Atual dos Doentes Fora do Alvo de c-LDL.

Tabela XXV: Caracterização da Terapêutica Realizada pelos Doentes Fora do Alvo de c-LDL.

Lista de Figuras

Figura 1: Seleção da Amostra de Doentes Incluída no Estudo.

Figura 2: Curvas *ROC* para os critérios de diagnóstico clínico (SBR e DLCN) antes e após a realização do Teste Genético.

Figura 3: Curva *ROC* para avaliação da capacidade preditiva de teste genético positivo do c-LDL.

Figura 4: Comparação da redução de c-LDL nos doentes com HF face à população em geral, de acordo com a terapêutica aplicada.

1. Introdução

A Hipercolesterolemia Familiar (HF) é uma doença hereditária do metabolismo dos lípidos, com transmissão autossômica dominante, caracterizada por níveis anormalmente elevados de colesterol presente nas lipoproteínas de baixa densidade (c-LDL) ao longo da vida, associados a valores de colesterol presente nas lipoproteínas de alta densidade (c-HDL) e de triglicerídeos (TG) normais.¹⁻⁴ Esta concentração elevada de c-LDL leva ao rápido desenvolvimento de aterosclerose, resultando no desenvolvimento precoce de doença cardiovascular (DCV), que, se não for tratada adequadamente, poderá ser fatal.^{1,5,6}

Esta patologia é causada por mutações que levam a uma diminuição da função do Recetor do LDL (LDLR), localizado no cromossoma 19, o qual é responsável pela remoção do c-LDL da circulação e pelo seu transporte ao fígado para posterior processamento.^{2,3,7,8} A primeira mutação a ser identificada foi a mutação no gene do *LDLR*, responsável por 79% dos casos.^{1,3} Posteriormente, foi reconhecida a associação entre a HF e a mutação no gene da *Apolipoproteína B (APOB)*, a qual ajuda na ligação entre o LDL e o LDLR, presente em 5% dos casos.^{1,3} Por fim, identificou-se a presença de uma mutação com ganho de função no gene da *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)*, responsável pela degradação do LDLR, em <1% dos doentes com HF.^{1,3} Cada uma destas três mutações genéticas causa uma redução na captação de c-LDL e, subsequentemente, cursam com elevadas concentrações séricas de c-LDL.⁹ Estas mutações podem apresentar-se sobre a forma de um defeito homozigótico ou heterozigótico, o que irá influenciar a gravidade da doença e a idade de início das manifestações da DCV.^{3,5,10}

Na sua forma heterozigótica, a HF tem uma prevalência entre 1:200 e 1:300, sendo, por isso, considerada a doença monogénica mais comum.^{1,11} Nesta forma, o colesterol total (CT) varia entre 290 e 500 mg/dL, pelo que, se não for tratada, a maioria dos doentes irá apresentar DCV antes dos 60 anos.^{1,3} Por sua vez, a forma homozigótica é rara, afetando 1 em cada 160.000-300.000 indivíduos, é muito mais grave, associando-se a valores de CT entre os 600 mg/dL e os 1000 mg/dL e ao desenvolvimento de DCV antes dos 20 anos de idade, o que resulta numa esperança média de vida que ronda os 30 anos de idade.^{1,3,7} Os doentes homozigóticos podem ter a mesma mutação em ambos os alelos do mesmo gene, ou, mais frequentemente, podem ter diferentes mutações em cada alelo do mesmo gene, sendo heterozigóticos compostos, e, ainda, podem ser duplos heterozigóticos com mutações em dois genes diferentes, afetando a função do LDLR.¹

O diagnóstico clínico de HF é baseado nos valores séricos de colesterol, ou seja, um c-LDL elevado (>190 mg/dL em adultos) é uma condição *sine qua non* para o diagnóstico, na história

familiar de DCV prematura, nas alterações presentes no exame físico, como os xantomas tendinosos, o arco corneano (antes dos 45 anos) ou os xantelasma, embora não estejam presentes em todos os casos.^{2,10} As características principais desta doença têm sido utilizadas para desenvolver critérios que ajudem os clínicos a fazer o diagnóstico e, como tal, nos últimos 30 anos, foram desenvolvidos três sistemas diferentes de critérios clínicos para o diagnóstico da HF: critérios da *Dutch Lipid Clinical Network* (DLCN), critérios *Make Early Diagnoses to Prevent Early Deaths in Medical Pedigrees* (MEDPED) e os critérios *Simon Broome Register* (SBR).^{1,12} Os critérios MEDPED são utilizados maioritariamente nos Estados Unidos da América e têm em conta apenas os níveis de colesterol total, de c-LDL e a história familiar.^{1,2,6} Os de SBR, mais utilizados no Reino Unido, consideram os níveis de c-LDL, a história familiar, os xantomas tendinosos e a presença de mutações genéticas, classificam o diagnóstico da HF em “definitiva” ou “provável”.² Por fim, os critérios da DLCN organizam-se num sistema de pontuação que tem em conta os valores de c-LDL, os dados do exame físico, a história pessoal e familiar de doença arterial coronária e a presença das mutações genéticas, classificando a HF em “definitiva”, “provável” e “possível”.^{2,3} Apesar de não existir um consenso internacional, estes últimos são os mais utilizados, contudo, não aplicáveis em crianças.^{2,3,12}

O teste genético permite obter um diagnóstico definitivo após suspeita clínica ou auxiliar a identificação dos indivíduos cujos familiares devem ser rastreados (rastreamento em cascata).¹ Existem diferentes tipos de testes genéticos, porém, realiza-se habitualmente a pesquisa de mutações em três genes: *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*.^{1,3} Apesar disto, o diagnóstico de HF não requer sempre a realização de testes genéticos, uma vez que cerca de 1 em cada 5 doentes com diagnóstico clínico de HF vai ter um resultado negativo no teste genético para as mutações atualmente conhecidas.⁵ Nestes casos, a ausência de uma mutação não exclui o diagnóstico de HF.^{1,13} Ainda assim, os critérios clínicos podem não ser suficientes para identificar todos os doentes com HF.² Desta forma, as opiniões existentes divergem sobre se existe algum benefício em realizar o teste genético por rotina a todos os doentes já clinicamente diagnosticados com HF.⁶

Uma vez que existe um risco aumentado de DCV em todos os doentes com HF, independentemente da idade, face à população em geral, o diagnóstico precoce é de extrema importância para o início do tratamento adequado.¹⁴ O tratamento da HF tem como objetivo primordial a redução dos valores séricos de c-LDL, sendo desejável um valor de c-LDL <70 mg/dL nos doentes com HF sem outros fatores de risco cardiovascular, enquanto é pretendido um valor <55 mg/dL nos doentes com DCV ou outros fatores de risco.^{15,16} A opção terapêutica de primeira linha são as estatinas, uma vez que reduzem a mortalidade por DCV, contudo, a resposta à terapêutica parece variar de acordo com as características genéticas e fenotípicas da HF que cada

doente apresenta, já que a maioria dos doentes, mesmo sob doses altas das estatinas de elevada intensidade não alcança reduções de 50% do c-LDL.¹⁷ Como tal, é muitas vezes necessário recorrer a esquemas terapêuticos com associação de vários fármacos para alcançar os objetivos, sempre em conjugação com as modificações de estilo de vida e da dieta.¹³ De facto, o tipo de variante genética causadora da HF parece influenciar a resposta à terapêutica farmacológica, pelo que a presença de determinada mutação permite personalizar ou individualizar a terapêutica para cada doente, por exemplo, os inibidores da PCSK9 vão ser altamente eficazes nos doentes com mutações do gene da *PCSK9* com ganho de função, enquanto não vão ter qualquer efeito nos doentes homozigóticos com 2 genes *LDLR* não funcionantes. Assim, salienta-se também a importância do teste genético com base nestes pressupostos.¹⁸

Dadas as dúvidas existentes sobre a realização por rotina de testes genéticos nos doentes com suspeita de HF, o objetivo principal deste estudo é avaliar a acuidade diagnóstica dos critérios de diagnóstico da DLCN e do SBR em relação ao resultado do teste genético. Pretendemos, adicionalmente, fazer uma caracterização da população com HF seguida em Consulta Multidisciplinar de Dislipidemias na Unidade Local de Saúde de Santo António (ULSSA) e determinar quais os principais preditores de um resultado genético positivo para HF. São ainda objetivos secundários, avaliar quais as vantagens e as implicações na prática clínica associadas à realização dos testes genéticos para identificação e tipificação das mutações, bem como, analisar a eficácia das terapêuticas farmacológicas instituídas na capacidade de redução do c-LDL.

2. Metodologia

Desenho do Estudo e Seleção da Amostra

Estudo de coorte retrospectivo realizado no Serviço de Endocrinologia da ULSSA em que foram incluídos no estudo os doentes seguidos na consulta Multidisciplinar de Dislipidemias da ULSSA entre janeiro de 2012 e dezembro de 2023 com suspeita clínica de HF com base nos critérios de DLCN e/ou SBR e os familiares diretos (em 1º grau) de doentes com HF confirmada em estudo genético (avaliados por rastreio em cascata). Foram excluídos do estudo os doentes sem teste genético e sem estudo analítico dos parâmetros lipídicos.

Colheita de Dados e Variáveis Analisadas

A colheita de dados, através da revisão manual do processo clínico eletrónico, foi realizada entre janeiro e março de 2024. Foram retiradas as seguintes informações: caracterização demográfica (sexo e idade), parâmetros antropométricos (altura, peso, índice de massa corporal [IMC]), perfil tensional (tensão arterial sistólica [TAS] e tensão arterial diastólica [TAD]), estudo genético (motivo de realização, número de mutações, gene mutado, herdabilidade da mutação, descrição da mutação), parâmetros analíticos na primeira consulta de especialidade antes do teste genético e sem terapêutica (CT, c-HDL, c-não-HDL, c-LDL, TG, ApoB, Lipoproteína a [Lp(a)], hemoglobina, contagem eritrocitária, plaquetas, leucócitos), antecedentes pessoais (doença arterial coronária prematura, doença vascular periférica ou cerebral prematura), exame objetivo do doente (presença de xantomas tendinosos, presença prematura (abaixo dos 45 anos de idade) de arco corneano), antecedentes familiares em 1º ou 2º grau (doença coronária ou vascular prematura, presença de xantomas tendinosos ou arco corneano, valores de c-LDL acima do P95 para idade e sexo), classificação no DLCN (antes e após realização de teste genético), classificação no SBR (antes e após realização de teste genético), esquema terapêutico hipolipemiante instituído, perfil lipídico após instituição de terapêutica na última consulta disponível (CT, c-HDL, c-não-HDL, c-LDL, TG e ApoB).

Todas as análises bioquímicas foram efetuadas no Serviço de Química Clínica da ULSSA. O valor de c-LDL foi determinado diretamente. O c-não-HDL foi calculado através da fórmula (CT – c-HDL). As apolipoproteínas foram medidas com recurso a métodos imunoturbidimétricos. Relativamente ao estudo molecular, entre 2012 e 2016, envolveu o estudo dos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*, através das metodologias de sequenciação de *Sanger* e de *Multiplex Ligation-dependent*

Probe Amplification (MLPA) para determinação de grandes deleções no gene *LDLR*; a partir de 2017, o estudo molecular passou a ser realizado através de um painel de Sequenciação de Nova Geração (NGS) que contém 8 genes (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *APOE*, *LIPA*, *ABCG5* e *ABCG8*).¹⁹

Foi considerada obesidade um valor de IMC ≥ 30 Kg/m², hipertensão arterial (HTA) se tensão arterial sistólica (TAS) ≥ 140 mmHg e/ou tensão arterial diastólica (TAD) ≥ 90 mmHg.^{20,21} Foram considerados como eventos cardiovasculares prematuros todos os que ocorreram antes dos 55 anos nos homens e antes dos 60 anos nas mulheres.

A classificação de probabilidade de diagnóstico clínico de HF foi determinada com base na pontuação definida pelo DLCN (Tabela I) e com base na classificação do SBR (Tabela II), que foram avaliados antes e após a realização do teste genético. No entanto, a classificação da DLCN não foi aplicada nas crianças, uma vez que não está validada para esta população. Para avaliação da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) destes critérios clínicos de diagnóstico, foi definido como confirmatório de doença a presença de mutação no teste genético. Estes parâmetros foram avaliados no SBR assumindo que o resultado positivo é dado só pela classificação “definitivo”, mas também quando o resultado positivo inclui “definitivo” ou “provável. No caso dos critérios de DLCN, foi assumido como resultado positivo só o “definitivo”, posteriormente, foi assumido positivo quando classificação em “provável” e “definitivo” e, ainda, a conjugação de “possível”, “provável” e “definitivo” como resultado positivo.²² A sensibilidade e especificidade foram consideradas “baixas” quando $\leq 50\%$, “moderadas” quando >50 e $\leq 75\%$ e “elevadas” quando $>75\%$.²³

Para estabelecer os alvos terapêuticos do perfil lipídico e o risco cardiovascular foram utilizadas as *guidelines* de 2019 da Sociedade Europeia de Aterosclerose (EAS)/Sociedade Europeia de Cardiologia (ESC)²⁴ para o tratamento das dislipidemias e as recomendações de 2021 da ESC²⁵ para a prevenção de doença cardiovascular na prática clínica. Os doentes com HF podem ser estratificados como de “alto risco” se não tiverem fatores de risco adicionais, com um valor alvo de c-LDL <70 mg/dL, c-não-HDL <100 mg/dL e ApoB <80 mg/dL ou, então, “muito alto risco”, quando apresentam outros fatores de risco, tendo como valor alvo de c-LDL <55 mg/dL, c-não-HDL <85 mg/dL e ApoB <65 mg/dL. Para os doentes em idade pediátrica, foram seguidas as recomendações da ESC de 2015 para o tratamento da HF em Crianças e Adolescentes²⁶, nas quais é recomendado um valor alvo de c-LDL <130 mg/dL a partir dos 10 anos de idade, ou uma redução de 50% do c-LDL inicial em crianças entre os 8 e os 10 anos, especialmente nas que apresentam outros fatores de risco associados. A avaliação da redução percentual do c-LDL após instituição da terapêutica foi

realizada comparando o valor de c-LDL no momento do diagnóstico (sem terapêutica) e o valor de c-LDL na consulta mais recente.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada recorrendo ao *software IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*® versão 26.0 para *Macbook*®. As variáveis categóricas estão apresentadas sob a forma de valor absoluto (n) e em percentagem (%). As variáveis quantitativas apresentam-se na forma de média $\pm$ desvio-padrão se distribuição normal ou mediana e intervalo interquartil (P₂₅-P₇₅) se distribuição não normal. A normalidade da distribuição foi avaliada com a análise do histograma e com o teste de *Shapiro-Wilk*. O teste de Qui-Quadrado de *Monte Carlo* foi aplicado para analisar diferenças relativamente às variáveis categóricas (comparar o resultado do *SBR* e do *DLCN* antes e após a obtenção do resultado do teste genético), bem como, o Coeficiente Kappa de Cohen para avaliação da concordância entre os resultados obtidos. Para comparar variáveis quantitativas, foi usado o teste t de *Student* para amostras independentes se distribuição normal e o teste de *Wilcoxon* se distribuição não normal. Foram obtidas curvas *Receiver Operator Characteristic* (ROC) dos diferentes critérios clínicos e do c-LDL. Foram, ainda, utilizadas a regressão logística (univariada e multivariada) para avaliação dos preditores independentes de teste genético positivo. Considerou-se como estatisticamente significativo um valor de *p* inferior a 0,05.

Considerações Éticas

O estudo obteve parecer favorável da Comissão de Ética do Santo António|Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), da Direção do Centro Académico Clínico ICBAS|ULSSA, do Gabinete Coordenador de Investigação do Departamento de Ensino, Formação e Investigação (DEFI) da ULSSA e do Conselho de Administração do Santo António (228-DEFI/218-CE).

3. Resultados

Seleção da Amostra

De um total de 107 doentes elegíveis, foram incluídos 80 doentes na coorte final do estudo. Dos 27 doentes excluídos, 21 foram-no por ausência de resultado do teste genético, 4 por não terem colhido amostra para realização de teste genético e 2 por não estar disponível o estudo analítico. (Figura 1)

Caracterização da Amostra

A caracterização da amostra encontra-se nas tabelas III-XIV. Esta incluiu 80 utentes, dos quais 61,3% (n=49) eram do sexo feminino, com uma idade mediana de 38,50 (24,00-54,75) anos, sendo que 12,5% (n=10) da amostra apresentava idade <18 anos. Em relação aos parâmetros antropométricos, o peso médio da amostra era de $68,8 \pm 17,9$ Kg, com um IMC mediano de 25,40 (22,40-28,70) Kg/m², 20,6% (n=13) dos utentes tinham critérios de obesidade. A TAS mediana era de 122,00 (114,50-137,00) mmHg e TAD média de $72,02 \pm 10,11$ mmHg, 18,1% (n=15) estava sob terapêutica anti-hipertensora.

Relativamente ao teste genético, em 55% (n=44) dos casos, este foi realizado por existir suspeita clínica de HF, enquanto os restantes 45% (n=36) realizou teste genético no âmbito do rastreio em cascata por familiar de 1º grau com teste positivo. Verificou-se a presença de pelo menos uma mutação genética em 61,3% (n=49). Em 3,8% (n=3) dos casos estudados foram identificadas duas mutações. No grupo de indivíduos com suspeita clínica de HF (n=44), foram encontrados 25 casos-índice de HF. No grupo de indivíduos que realizou teste genético por história familiar positiva (n=36), em 66,7% (n=24) dos casos foi encontrada pelo menos uma mutação genética associada à HF.

A mutação no gene do *LDLR* foi a mais prevalente (93,9%, n=46), seguida pela mutação no gene da *APOB* (6,1%, n=3) e pela mutação no gene da *PCSK9* (2,0%, n=1). Em 98% (n=48) dos casos, verificou-se a presença da mutação em heterozigotia, com 4,1% (n=2) de heterozigóticos compostos e 2,0% (n=1) de heterozigóticos duplos, e, ainda, um doente com HF homozigótica (2% dos casos), por mutação no *LDLR*:c.661G>T (p.Asp221Tyr). As mutações mais frequentes foram as seguintes: *LDLR*:c.1216C>T (p.Arg406Trp), *LDLR*:c.693C>G (p.Cys231Trp), *LDLR*:c.326G>T

(p.Cys109Phe) e LDLR:c.530C>T (p.Ser177Leu), cada uma das quais representando 7,8% (n=4) dos casos.

Verificou-se a presença de xantelasmas em 6,3% (n=5) e de xantomas tendinosos em 2,5% (n=2). Dos antecedentes pessoais, 5% (n=4) dos indivíduos relataram eventos CVs precoces, dos quais 2,5% (n=2) apresentou doença cerebrovascular e/ou doença arterial obstrutiva periférica prematuramente. No que concerne os antecedentes familiares, 83,8% (n=67) da amostra tinha antecedentes familiares de hipercolesterolemia, 57,5% (n=46) apresentava história familiar de DCV prematura e 5% (n=4) da amostra tinha história familiar em 1º grau de xantomas tendinosos. Na população do estudo, não se verificou a existência de arco corneano prematuro nos doentes ou nos antecedentes familiares.

Na primeira consulta, a mediana do perfil lipídico foi a seguinte: CT 285,0 (245,8-335,3) mg/dL, c-LDL 202,5 (160,3-260,5) mg/dL, c-HDL 52,0 (43,0-66,0) mg/dL e os triglicerídeos 127,0 (85,0-173,5) mg/dL.

Comparação entre os critérios de diagnóstico antes e após realização do teste genético

Com o objetivo de avaliar a importância do teste genético, os doentes foram avaliados com os critérios de diagnóstico do SBR antes e após o resultado do teste genético (Tabela XV). Cerca de 12% (n=4) dos doentes classificados como “improváveis” de ter diagnóstico de HF sem o resultado genético foram classificados como tendo diagnóstico “definitivo” de HF quando se inclui o teste genético. Da mesma forma, 74,4% (n=32) dos doentes inicialmente classificados como “prováveis” passaram a “definitivos” quando realizado o teste genético. Já os doentes inicialmente classificados como “definitivos” (n=3) mantiveram todos essa mesma classificação. Verificou-se a existência de uma diferença estatisticamente significativa entre a classificação obtida no SBR sem teste genético e após a realização do mesmo para pelo menos uma das classificações inicialmente obtidas. O valor de *Kappa de Cohen* obtido foi de 0,398. A inclusão do teste genético nos critérios permitiu realizar o diagnóstico de HF em 45% (n=36) dos doentes analisados, enquanto apenas 3,75% (n=3) apresentaram diagnóstico definitivo *ab initio*. Com a inclusão do teste genético, os critérios de SBR falharam o diagnóstico genotípico em 13,75% (n=11) dos casos (Tabela XVI).

A mesma metodologia foi aplicada para os critérios de diagnóstico da DLCN (Tabela XVII). Verificou-se que 45% (n=9) dos doentes inicialmente classificados como “improváveis” de ter diagnóstico de HF passaram a obter classificação de “diagnóstico definitivo”; 59,3% (n=16) dos “possíveis” passaram a “definitivos”; 71,4% (n=10) dos “prováveis” passaram a “definitivos”. Já os

doentes inicialmente classificados como “definitivos” (n=9), mantiveram a sua classificação. Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os resultados antes e após o diagnóstico para pelo menos uma das classificações inicialmente obtidas. O valor de *Kappa de Cohen* obtido com os critérios de DLCN foi de 0,377. Neste sentido, a inclusão do teste genético nos critérios permitiu realizar o diagnóstico de HF em 50,0% (n=35) dos doentes analisados, enquanto 12,86% (n=9) dos doentes estavam diagnosticados *ad initio*. Os critérios de DLCN com inclusão do teste genético não falharam nenhum diagnóstico genotípico (Tabela XVIII).

Posteriormente, analisou-se a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para cada um dos critérios clínicos, antes e após a realização do teste genético (Tabela XIX). No caso do SBR antes da realização do teste genético, verificamos que um resultado “definitivo” tem elevada especificidade (100%), mas muito baixa sensibilidade (6,12%) para um diagnóstico de HF; quando incluímos “definitivo” e “provável”, os critérios já apresentam uma sensibilidade (71,43%) e especificidade (64,52%) moderadas. Já os critérios de SBR com o teste genético, apresentam elevada especificidade (96,77%) e sensibilidade (77,55%) quando considerado o resultado “definitivo” como teste positivo, enquanto “provável” e “definitivo” tem elevada sensibilidade (79,59%), mas moderada especificidade (64,52%).

Os critérios de DLCN antes do teste genético, apresentam uma sensibilidade de 20,93% e especificidade de 100% quando consideramos apenas “definitivo” como resultado positivo, estando associado a um baixo valor preditivo negativo (44,26%). Quando considerado resultados “provável” e “definitivo” como positivos conseguimos obter uma sensibilidade de 41,86% e uma especificidade de 81,48%. Porém, quando o resultado do teste genético está incluído, obtemos uma sensibilidade de 100% e especificidade de 96,30% para “definitivo”, bem como, uma sensibilidade de 100% e especificidade de 81,48% para “provável” e “definitivo”, associados a elevados valores preditivos negativos e positivos (Tabela XIX).

Aplicando a curva *ROC* (Figura 2), nos critérios de SBR sem o teste genético, identifica-se como melhor ponto de corte a classificação de “provável” com uma sensibilidade de 71,4% e uma especificidade de 64,5% [AUC 0,691 (0,571-0,810); $p = 0,004$]. Nos critérios de SBR com o teste genético, define-se como melhor ponto de corte a classificação de “provável” com uma com uma sensibilidade de 79,6% e uma especificidade de 64,5% [AUC 0,845 (0,756-0,934); $p < 0,001$]. No caso dos critérios de DLCN sem teste genético, o melhor ponto de corte para identificação da mutação é a classificação de “possível” com uma sensibilidade de 79,1% e uma especificidade de 40,7% [AUC 0,669 (0,544-0,795); $p = 0,018$]. Nos critérios de DLCN com teste genético, “provável”

é o melhor ponto de corte com uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 81,5% [0,981 (0,940-1,000); $p < 0,001$].

Avaliação dos Preditores de Mutação para a HF no Teste Genético

Controlando-se para as variáveis (CT, c-LDL, c-não-HDL, ApoB e o valor plaquetário), apenas o valor de c-LDL se mostrou um preditor independente para a presença de mutação genética de HF (Tabela XX). O aumento do c-LDL está associado a uma probabilidade 1,12 vezes maior de presença de mutação genética ($p < 0,05$). Utilizando a curva ROC (Figura 3) para avaliar a capacidade preditiva do c-LDL de teste genético positivo, para o grupo dos adultos, o ponto ótimo de corte identificado foi de 205,50 mg/dL com uma sensibilidade de 67,4% e uma especificidade de 70,4% (AUC 0,714; $p = 0,003$).

Avaliação da eficácia da terapêutica nos doentes com HF confirmada geneticamente e capacidade de atingir alvo de c-LDL

Os doentes com HF confirmada ($n = 49$), 26,5% ($n = 13$) estavam, à data, sob terapêutica com estatina de alta intensidade em associação com ezetimiba e 18,4% ($n = 9$) sob estatina de alta intensidade, ezetimiba e evolocumab; 8,2% ($n = 4$) estavam medicados com estatina de alta intensidade; 6,1% ($n = 3$) estavam sob estatina de moderada intensidade; 4,1% ($n = 2$) estavam a ser tratados com estatina de moderada intensidade, ezetimiba e evolocumab; 4,1% ($n = 2$) estavam sob terapêutica com estatina de alta intensidade, ezetimiba e LDL-aférese; 2,0% ($n = 1$) estava a realizar estatina de alta intensidade e evinacumab; 2,0% ($n = 1$) sob LDL-aférese em exclusivo e os restantes doentes estavam sob a terapêutica relatada na Tabela XXI.

Relativamente ao perfil lipídico, verificamos que o perfil lipídico mediano pré-terapêutica era de: CT 304,00 (258,00-362,00) mg/dL; c-LDL 224,00 (187,00-284,50) mg/dL; c-HDL 50,50 (43,00-65,25) mg/dL; c-não-HDL 234,50 (205,00-310,25) mg/dL; TG 124,00 (82,00-157,25) mg/dL e ApoB 172,00 (138,00-217,25) mg/dL. Após a instituição da terapêutica, o perfil lipídico mediano é de: CT 170,00 (140,25-223,00) mg/dL; c-LDL 109,00 (69,43-150,75) mg/dL; c-HDL 45,50 (41,00-58,75) mg/dL; c-não-HDL 122,50 (91,00-167,25) mg/dL; TG 80,00 (59,75-149,50) mg/dL; ApoB 101,50 (66,75-119,75) mg/dL. Houve uma redução estatisticamente significativa para todos os parâmetros do perfil lipídico (Tabela XXII).

Verificou-se que 25,0% (n=10) dos doentes com HF apresentavam valores de c-LDL dentro do alvo. Ainda, verificou-se que 34,2% (n=13) estão no valor alvo de c-não-HDL e 32,4% (n=12) atingiram o valor alvo que lhes está recomendado de ApoB (Tabela XXIII).

Relativamente ao grupo de doentes que não alcançaram o valor alvo de c-LDL (n=30), verificamos que estes apresentam um perfil lipídico após terapêutica de: CT 195,50 (164,00-170,25) mg/dL; c-LDL 123,50 (99,75-170,25) mg/dL; c-HDL 44,50 (39,00-54,75) mg/dL; c-não-HDL 142,50 (121,00-176,75) mg/dL; TG 80,00 (65,75-142,50) mg/dL e ApoB 111,00 (96,25-125,50) mg/dL, como descrito na tabela XXIV. No que diz respeito ao esquema terapêutico instituído neste grupo de doentes, verificamos que 40% (n=12) está sob terapêutica com estatina de alta intensidade e ezetimiba; 13% (n=4) está medicado com estatina de alta intensidade, ezetimiba e evolocumab; 10% (n=3) está a realizar estatina de moderada intensidade, tal como 10% (n=3) está com estatina de alta intensidade; os restantes encontram-se descritos na tabela XXV.

Considerando os doentes que conseguiram alcançar o alvo, 50,0% (n=5) estavam medicados com estatina de alta intensidade, ezetimiba e evolocumab em associação, enquanto 10,0% (n=1) estava sob estatina de moderada intensidade com ezetimiba; 10,0% (n=1) sob estatina de alta intensidade e ezetimiba; 10,0% (n=1) sob estatina de moderada intensidade, ezetimiba e evolocumab; 10,0% (n=1) sob estatina de alta intensidade, ezetimiba e LDL-aférese; e 10,0% (n=1) estava medicado com estatina de alta intensidade apenas.

Adicionalmente, foi avaliada a redução percentual de c-LDL verificada nos doentes com HF, por terapêutica instituída (Figura 4). Nos doentes medicados com estatina de alta intensidade (n=4), verificou-se uma redução de c-LDL mediana de 46,02% (42,79-50,41). Nos doentes a realizar estatina de moderada intensidade (n=4), houve uma redução mediana de 40,18% (31,53-42,77) no c-LDL. Nos doentes medicados com estatina de alta intensidade e ezetimiba (n=13), verificou-se uma redução mediana de 57,65% (47,92-67,68). Por fim, os doentes sob estatina de alta intensidade, ezetimiba e evolocumab (n=9) apresentaram uma redução no c-LDL mediana de 73,36% (71,79-78,81).

4. Discussão

A HF é uma doença genética que cursa com concentrações plasmáticas elevadas de c-LDL, sendo diagnosticada clinicamente através de critérios específicos, como os SBR ou DLCN, porém, apenas o estudo genético permite obter um diagnóstico definitivo.²⁷⁻³¹ Sendo a hipercolesterolemia uma condição assintomática, o diagnóstico é tardio na vida, o que faz com que esta doença continue a ser subdiagnosticada e, consequentemente, subtratada, apesar de o rastreio universal já ser recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 1998.^{29,32} O objetivo do tratamento precoce é modificar o prognóstico da doença, prevenindo a DCV.³³ A base do tratamento farmacológico são as estatinas de elevada intensidade na dose máxima tolerada, as quais podem ser associadas ao ezetimiba ou, ainda ao iPCK9.³³⁻³⁵ Ainda assim, raramente o alvo de c-LDL é atingido.³⁶

Com este trabalho, pretendeu-se avaliar e determinar a capacidade dos critérios de diagnóstico da DLCN e do SBR de prever o diagnóstico definitivo de HF; fazer uma caracterização da população com HF seguida em consulta; determinar quais os principais preditores de um resultado genético positivo; avaliar quais as vantagens e as implicações na prática clínica associadas à realização dos testes genéticos e analisar a eficácia das terapêuticas farmacológicas instituídas em termos da capacidade de atingir o alvo de c-LDL recomendado.

Validação e Análise da Amostra

Tal como descrito no Estudo Português da Hipercolesterolemia Familiar (EPHF), verificou-se a presença de uma maior percentagem de indivíduos do sexo feminino (61,3%) em comparação com o sexo masculino.³⁰ A idade mediana ao diagnóstico verificada na amostra foi de 38,50 (24,00-54,75) anos, sendo concordante com o representado na literatura internacional.³⁷ Também, o IMC mediano de 25,40 (22,40-28,70) Kg/m² verificado na nossa amostra é concordante com o expectável com base na literatura nacional.³⁰

Por outro lado, a percentagem de doentes com HF confirmada com teste genético (61,3%) é superior à verificada no EPHF, dadas as características da consulta em que se enquadrou este estudo.³⁰ A mutação mais frequentemente identificada foi no gene do *LDLR*, mutado em 93,88% dos doentes, seguido pelo gene da *APOB*, mutado em 6,12% dos casos e, finalmente, o gene da *PSCK9* em 2,04%, o que é concordante com os estudos de HF nacionais e internacionais.^{19,38} Adicionalmente, verificou-se a presença de um doente homozigótico puro, bem como, a presença

de dois heterozigóticos compostos e um heterozigótico duplo, o que parece apoiar o facto de atualmente a HF homozigótica ter uma prevalência na população superior ao inicialmente descrito pelos estudos.^{39,40} Ainda, as mutações mais frequentemente identificadas - LDLR:c.1216C>T (p.Arg406Trp), LDLR:c.693C>G (p.Cys231Trp), LDLR:c.326G>T (p.Cys109Phe) e LDLR:c.530C>T (p.Ser177Leu) – não são concordantes com as mutações mais prevalentes descritas no EPHF, uma vez que tais mutações são mais frequentes no Alentejo e Algarve (região Sul de Portugal), enquanto o nosso estudo se focou nos doentes da região Norte do país.³⁰

Relativamente aos antecedentes pessoais dos doentes com suspeita de HF, verificou-se a presença de xantomas tendinosos em 2,5% e xantelasmas em 6,3% dos indivíduos, antecedentes pessoais de DCV em apenas 5,0% da amostra, representando percentagens muito inferiores ao esperado quer com base em estudos nacionais, quer com base em estudos internacionais.^{30,41,42} A mudança na forma de apresentação clínica da HF que parece estar a ocorrer ao longo do tempo, deixando de existir a apresentação clínica “clássica” pode ser justificada pelo diagnóstico e tratamento mais precoces.^{18,43,44} Também, a história familiar de xantomas tendinosos estava presente em apenas 4,0% dos casos, o que pode ser justificado pelo anteriormente descrito. Contudo, a história familiar de eventos CVs prematuros já estava presente em 57,5% dos casos, sendo superior ao esperado, o que poderá ser justificado pelo elevado risco cardiovascular descrito para a população portuguesa, independentemente da existência de HF ou não.^{18,41,42,45}

O Impacto do Teste Genético

Quando comparamos os resultados de classificação obtidos pelos doentes com os critérios de SBR antes e após a realização do teste genético, obtemos resultados estatisticamente diferentes, sendo que em 45% dos casos, os doentes passaram de “improvável” ou “provável” para “definitivo” com o teste genético. De facto, verifica-se que os critérios de SBR sem o teste genético, têm uma sensibilidade de 6,12% e uma especificidade de 100%, quando se assume apenas a classificação “definitivo” como resultado positivo, passando para valores de sensibilidade de 71,43% e especificidade de 64,52% quando se considera como positivo “definitivo” e “provável”, sendo este último o melhor valor *cut-off* determinado pela análise da curva ROC. Isto demonstra uma baixa concordância genótipo-fenótipo.

No caso dos critérios da DLCN, existe também uma diferença significativa na classificação obtida pelos doentes antes e após a realização do teste genético, com 50,0% dos doentes a passarem de “improvável”, “possível” e/ou “provável” para “definitivo”. Os critérios sem o teste

genético, apresentam uma sensibilidade de 20,93% e especificidade de 100% quando apenas considerado “definitivo” como positivo, os quais passam a 41,86% de sensibilidade e a 81,48% de especificidade quando “provável” e “definitivo” são considerados resultados positivos, sendo este último o melhor *cut-off* de acordo com a curva ROC.

Na verdade, estes critérios são muitas vezes utilizados como um “rastreo” no sentido de selecionar quais os doentes que devem realizar teste genético para confirmação do diagnóstico e tipificação da mutação subjacente.³³ De facto, os pressupostos de um teste de rastreio implicam sensibilidade e especificidade adequadas e, apesar de estes critérios antes do teste diagnóstico até terem uma especificidade elevada, têm uma baixa sensibilidade, logo irão falhar o diagnóstico em vários doentes.⁴⁶ Tendo em conta os resultados obtidos, estes critérios de diagnóstico clínico não parecem ser uma boa forma de rastreio e de seleção dos doentes que devem ou não realizar o teste genético para a pesquisa de mutações da HF na população portuguesa. Tal poderá estar relacionado com o facto de apresentarmos cada vez menos as alterações ao exame objetivo e os antecedentes pessoais e familiares “clássicos” da HF, os quais são importantes fatores de pontuação nos critérios da DLCN e do SBR.¹⁸ Além disso, tal como verificado na população holandesa, demonstra-se uma baixa concordância genótipo-fenótipo, que poderá ser resultante de fenótipos de HF mais ligeiros.⁴⁷ Ainda, é sabido que mutações nos genes da *APOB* estão associadas a fenótipos mais ligeiros de doença, o que poderá contribuir também para esta discordância.⁴⁸ Estes resultados reforçam o já defendido para o rastreio de familiares, em que a utilização dos critérios clínicos vai estar associado ao subdiagnóstico da patologia.³¹

Claramente, quando utilizamos os critérios após a inclusão do teste genético, já obtemos, no SBR, uma sensibilidade de 77,55% e especificidade de 96,77% para “definitivo” e uma sensibilidade de 79,59% e especificidade de 64,52% para “definitivo+provável”; no DLCN, uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 96,30% para “definitivo”, enquanto o “definitivo+provável” tem uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 81,48%. Estes valores já são concordantes com os obtidos pela literatura em que referem sensibilidades e especificidades elevadas, bem como, as áreas abaixo da curva já validam a utilidade dos critérios e demonstram a melhor capacidade de diagnóstico dos critérios de DLCN em comparação com os SBR.⁴¹ De facto, estes resultados enaltecem a necessidade da realização de teste genético para efetuar o diagnóstico, uma vez que os critérios clínicos de diagnóstico só alcançam valores altos de sensibilidade e especificidade quando este está incluído.

Relativamente ao rastreio dos familiares de primeiro grau, verificamos a presença de 25 casos-índice, tendo sido pesquisados 36 familiares de primeiro grau através do rastreio em cascata

com o teste genético. Isto reflete que por cada caso-índice identificado, são pesquisados em média 1,44 familiares de primeiro grau, alcançando um resultado positivo em 0,96 familiares por caso-índice. Estes resultados são muito inferiores aos obtidos em países da Europa como Noruega ou Holanda, onde o rastreio em cascata com teste genético está implementado com muito sucesso e chega a identificar 8 familiares com HF por cada caso-índice.^{33,49} De facto, estes resultados podem ser justificados pela baixa acessibilidade à realização do teste genético.⁵⁰

Tal como já discutido, o teste genético é a melhor forma de identificação de doentes com HF, sendo importante o rastreio em cascata dos familiares para o começo precoce de terapêutica hipolipemiante e redução do risco cardiovascular associado, logo, é importante melhorar a capacidade de rastreio de familiares com HF em Portugal.⁵¹

Por outro lado, verificamos nas tabelas XVI e XVIII que existe um doente classificado como “definitivo” por ambos os critérios, assim como quatro doentes considerados como “prováveis” pelo DLCN e dez considerados “prováveis” pelo SBR, mas em que não foi identificada nenhuma mutação. Isto é ilustrador da principal limitação do teste genético, ou seja, podemos ainda não conhecer a mutação responsável pela HF destes doentes.⁵

Ainda, a tipificação das mutações através da realização do teste genético foi fulcral para seleccionar a melhor terapêutica em determinados doentes, nomeadamente a identificação do doente com HF homozigótica que começou terapêutica com evinacumab (anticorpo monoclonal anti-ANGPTL3), sendo esta a principal utilização deste fármaco com grande capacidade de redução no c-LDL; e, ainda, no doente com mutação no gene da *PCSK9*, tendo iniciado terapêutica com evolocumab (iPCSK9), apresentando uma redução no c-LDL superior à conseguida anteriormente com LDL-aférese.^{35,52} Nos restantes doentes, permitiu a otimização da terapêutica. Ademais, o teste genético permite fazer o diagnóstico diferencial com outras doenças metabólicas hereditárias, nomeadamente a sitosterolemia, a qual apresenta manifestações clínicas similares à da HF, como os xantomas tendinosos e doença aterosclerótica prematura, mas com mutações nos genes *ABCG5* e *ABCG8*.⁵³

Assim, evidencia-se o impacto do teste genético na HF, salientando a necessidade de haver uma análise clínica, molecular e funcional integrada para um correto diagnóstico de HF, mas também importante na abordagem e gestão destes doentes, confirmando o anteriormente descrito pela literatura.⁵⁴

Avaliação dos Preditores de Mutação para a HF no Teste Genético

De acordo com os nossos resultados, apenas o c-LDL é um preditor independente da existência de uma mutação genética concordante com o diagnóstico de HF. Este é um resultado expectável, tendo em conta estudos prévios, mas também porque a HF é caracterizada por valores plasmáticos elevados de c-LDL, sendo uma das condições necessárias para o diagnóstico da patologia.²² Ainda assim, a história pessoal ou a história familiar de xantomas tendinosos não foram capazes de prever a mutação genética, o que poderá ser justificado pela baixa frequência destes achados clínicos na nossa amostra como já anteriormente discutido.²² Adicionalmente, é importante salientar que o valor de c-LDL que melhor prediz a presença de uma mutação genética, apesar de ser concordante com o definido nos critérios clínicos, é inferior ao anteriormente descrito na literatura, o que poderá também justificar a presença de apresentações de doença mais ligeiras do que as classicamente descritas, podendo traduzir a necessidade de ajuste dos critérios de diagnóstico da patologia.^{22,55}

Avaliação da Eficácia da Terapêutica na HF

Tal como esperado, a maior parte dos doentes com HF seguidos em consulta estão sob um esquema terapêutico que inclui estatinas em associação com ezetimiba ou, ainda, com ezetimiba e evolocumab, mostrando a incapacidade das estatinas em monoterapia de atingir o alvo de c-LDL.^{13,36} Apesar de termos verificado uma redução significativa no valor de CT e de c-LDL nos doentes com HF após início da terapêutica, a maior parte dos doentes (75%) não alcançou o valor alvo de c-LDL que lhe estava recomendado, tendo em conta a idade e os fatores de risco CVs, o que é concordante com o verificado noutros estudos para a população com HF.³⁶ Geralmente, uma das razões admitidas para a incapacidade de alcançar o alvo é o máximo de terapêutica hipolipemiante já estar a ser realizado, o que se verifica em 13,3% dos doentes, uma vez que estão sob estatina de alta intensidade, ezetimiba e evolocumab.^{36,56} Adicionalmente, verificamos que 40,0% dos doentes estão sob um esquema de estatina de alta intensidade e ezetimiba, não tendo iniciado o evolocumab, o qual está recomendado pelas *guidelines* de tratamento da HF para os doentes incapazes de atingir o alvo.^{36,56} De facto, a utilização de iPCSK9 em Portugal no caso da HF sem eventos cardiovasculares, de acordo com as *guidelines* europeias, é recomendada quando c-LDL ≥ 180 mg/dL ou quando c-LDL ≥ 140 mg/dL com algum fator de risco adicional, tendo de se verificar uma série de condições antes, nomeadamente o tratamento com a dose máxima tolerada de

estatina de alta intensidade, o que limita a aprovação para o início do evolocumab nos doentes que continuam fora do alvo, uma vez que o c-LDL mediano verificado para este grupo é de cerca de 123,50 mg/dL, ou seja, inferior ao *cut-off* definido para o início da terapêutica com evolocumab.^{52,57} Por outro lado, na população pediátrica, a terapêutica não está otimizada, recorrendo apenas às alterações nutricionais em 3,3% ou a estatinas de moderada intensidade em 3,3%.²⁶ Ademais, devemos sempre ter em consideração razões como a baixa adesão à terapêutica e os efeitos laterais, nomeadamente das estatinas, que são limitantes no aumento das dosagens e na realização de um esquema terapêutico mais adequado.³⁶

Adicionalmente, verificamos na Figura 4 que a redução do c-LDL percentual mediano nos doentes com HF é globalmente similar ao verificado para a população sem esta doença, não sendo uma possível justificação para a incapacidade de alcance do alvo. Isto é concordante com o descrito noutros estudos, em que é referida uma capacidade de redução de c-LDL de 50% das estatinas, 10 a 15% adicional do ezetimiba em conjugação com as estatinas.^{58,59} Contudo, a redução verificada com a conjugação estatina de alta intensidade, ezetimiba e evolocumab parece ser superior à anteriormente descrita nos estudos.⁶⁰

Limitações do Estudo

Trata-se de um estudo de coorte retrospectivo, no qual as dúvidas ou inexistência de dados no processo clínico relativamente a algumas das variáveis em estudo pode condicionar a análise, bem como, o facto de alguns doentes já estarem sob terapêutica com estatina no momento da primeira avaliação na consulta. Ademais, trata-se de uma amostra pequena, o que pode limitar a generalização, bem como justificar ausência de mais achados com significância estatística. Outra limitação é a baixa representatividade da população pediátrica. Assim, seria importante de futuro realizar uma avaliação com maior número de casos-índice, mas também amplificar o rastreio de familiares no sentido de obter uma amostra maior e com maior representatividade.

5. Conclusões

Os critérios da DLCN e do SBR para o diagnóstico clínico de HF apresentaram uma baixa utilidade na prática clínica por serem incapazes de discriminar doentes de não doentes, dada a existência de fenótipos mais ligeiros de HF em comparação à apresentação “clássica”. De facto, há a necessidade de adaptar os critérios existentes para melhorar a acuidade do diagnóstico clínico de HF. Na população estudada, identificou-se o c-LDL como o principal preditor da presença de uma mutação genética.

Persiste como um desafio a identificação dos doentes com HF, no entanto, reforça-se a importância do teste genético como *gold standard* no diagnóstico da HF. Evidencia-se a necessidade de sensibilizar os clínicos para a realização do teste genético, uma vez que um teste positivo permite realizar o rastreio dos familiares, bem como, escolher a terapêutica mais adequada para cada doente. O diagnóstico precoce de HF permite mudar o prognóstico da mesma, prevenindo, através da terapêutica, a ocorrência de eventos CVs.

Anexos

Tabelas

Tabela I - Critérios de Diagnóstico de Hipercolesterolemia Familiar da *Dutch Lipid Clinic Network*. Adaptado de Nordestgaard *et al* (2013) e Austin *et al* (2004).^{38,61}

Critérios	Pontos
<u>História Familiar</u>	
Familiar em primeiro grau com doença arterial coronária ou vascular conhecida prematura OU familiar em primeiro grau com c-LDL conhecido >P95	1
Familiar em primeiro grau com xantomas tendinosos e/ou arco corneano OU crianças (<18 anos) com c-LDL >P95	2
<u>História Clínica</u>	
Antecedentes pessoais de doença arterial coronária prematura	2
Antecedentes pessoais de doença cerebral ou vascular periférica prematura	1
<u>Exame Físico</u>	
Xantomas tendinosos	6
Arco corneano antes dos 45 anos de idade	4
<u>Valores de colesterol (mg/dL)</u>	
c-LDL ≥ 330 mg/dL	8
c-LDL 250 – 329 mg/dL	5
c-LDL 190 – 249 mg/dL	3
c-LDL 155 – 189 mg/dL	1
<u>Análise de DNA</u>	
Mutação funcional no gene <i>LDLR</i> , <i>Apo B</i> ou <i>PCSK9</i>	8
<u>Diagnóstico (baseado no número total de pontos obtidos)</u>	
Diagnóstico Definitivo de Hipercolesterolemia Familiar	>8
Diagnóstico Provável de Hipercolesterolemia Familiar	6 – 8
Diagnóstico Possível de Hipercolesterolemia Familiar	3 – 5
Diagnóstico Improvável de Hipercolesterolemia Familiar	<3

Tabela II - Critérios de Diagnóstico *Simon Broome* para Hipercolesterolemia Familiar. Adaptado de Austin *et al* (2004).⁶¹

Diagnóstico	Requisitos	Critérios
Hipercolesterolemia Familiar Definitiva	(a) + (b) OU (a) + (c)	(a) Valores de CT, mg/dL Idade ≥ 16 anos: > 290 Idade < 16 anos: > 260 OU Valores de c-LDL, mg/dL Adultos: > 190 Crianças: > 155
		(b) Xantomas Tendinosos no doente ou em familiares de 1º ou 2º grau
		(c) Estudo de DNA com evidência de mutação no gene <i>LDLR</i> , <i>ApoB100</i> , <i>PCSK9</i>
Hipercolesterolemia Familiar Provável	(a) + (d) OU (a) + (e)	(d) História familiar de enfarte agudo do miocárdio antes dos 50 anos em familiar de 2º grau ou antes dos 60 anos em familiar de 1º grau
		(e) História familiar de CT elevado em familiar de 1º grau ou > 290 mg/dL em familiar de 2º grau
Hipercolesterolemia Familiar Improvável	Quando os critérios anteriores não são cumpridos.	

Tabela III – Distribuição dos Doentes da Amostra por Sexo

Sexo	N	Percentagem
Feminino	49	61,3%
Masculino	31	38,8%
Total	80	100%

Tabela IV – Caracterização dos Parâmetros Antropométricos da Amostra

	Parâmetros Antropométricos	
Peso (Kg)	n = 70	68,80 ± 17,86
Altura (m)	n = 63	1,64 ± 0,10
IMC (Kg/m²) *	n = 63	25,40 (22,40-28,70)

Dados apresentados em média ± desvio-padrão, exceto os assinalados* que estão apresentados em mediana (P25-P75).

Tabela V – Distribuição dos Doentes da Amostra por Motivo de Realização de Teste Genético

Motivo de Teste Genético	N	Percentagem
Suspeita Clínica de HF	44	55,0%
Familiar com HF Confirmada	36	45,0%
Total	80	100%

Tabela VI – Distribuição dos Doentes da Amostra Consoante Resultados do Teste Genético

Mutação de HF	N	Percentagem
Presente	49	61,3%
Ausente	31	38,8%
Total	80	100%

Tabela VII – Distribuição dos Doentes da Amostra Consoante Número de Mutações Identificadas

Número de Mutações	N	Percentagem
0	31	38,8%
1	46	57,5%
2	3	3,8%
Total	80	100%

Tabela VIII – Distribuição dos Doentes com Mutação Identificada Consoante o Gene Mutado

Gene Mutado	N	Percentagem
LDLR	44	89,80%
APOB	1	2,04%
PCSK9	1	2,04%
LDLR+APOB	1	2,04%
LDLR+LDLR	1	2,04%
APOB+APOB	1	2,04%
Total	49	100%

Tabela IX – Distribuição dos Doentes com Mutação Identificada Consoante a Hereditabilidade

Hereditabilidade	N	Percentagem
Heterozigotia	48	98,0%
Homozigotia	1	2,0%
Total	49	100%

Tabela X – Caracterização das Mutações Identificadas

Mutação Encontrada	N	Porcentagem
LDLR: p.Asp57Gy	3	5,9%
LDLR: p.Arg124Alafs*5	1	2,0%
APOB: p.Arg1867Trp	1	2,0%
LDLR: p.Asp221Tyr	1	2,0%
LDLR: p.Arg406Trp	4	7,8%
LDLR: EX8_12del	2	3,9%
LDLR: p.Glys478Arg	1	2,0%
LDLR: p.Cys698Phe	2	3,9%
LDLR: p.Asp224Asn	1	2,0%
LDLR: p.Arg458Serfs*8	3	5,9%
LDLR: p.Cys231Trp	4	7,8%
LDLR: EX2+Ex8_12Del	2	3,9%
LDLR: p.Cys109Phe	4	7,8%
PCSK9: p.Asp374His	1	2,0%
LDLR: p.Ala771_ile796del	2	3,9%
LDLR: p.Ser177Leu	4	7,8%
LDLR: p.Gly373Asp	1	2,0%
LDLR: p.His211Asp	3	5,9%
LDLR: p.Arg3527Gln	1	2,0%
APOB: p.Arg744Gln	1	2,0%
LDLR: p.Gly207Gly	2	3,9%
LDLR: p.Glu288Lys	3	5,9%

APOB: p.Ser3279Gly	1	2,0%
APOB: p.Ala980Thr	1	2,0%
LDLR: p.Gly545Trp	1	2,0%
LDLR: p.Gly207_Ser213del	1	2,0%
Total	51	100%

Tabela XI – Caracterização dos Doentes da Amostra Consoante Antecedentes Pessoais

<u>História Pessoal</u>			
N			Percentagem
História Pessoal de Alterações Ao Exame Objetivo	Xantomas	2	2,5%
	Xantelasmas	5	6,3%
	Ausente	73	91,3%
	Total	80	100%
História Pessoal de DCV Prematura	Presente	4	5,0%
	Ausente	76	95,0%
	Total	80	100%
História Pessoal de DAOP ou Cerebrovascular Prematura	Presente	2	2,5%
	Ausente	78	97,5%
	Total	80	100%

Tabela XII – Caracterização dos Doentes da Amostra Consoante História Familiar

História Familiar			
N			Percentagem
História Familiar de Xantomas Tendinosos	Presente	4	5,0%
	Ausente	76	95,0%
	Total	80	100%
História Familiar de Eventos CVs Precoces	Presente	46	57,5%
	Ausente	34	42,5%
	Total	80	100%
História Familiar de Colesterol Elevado	Presente	67	83,8%
	Ausente	13	16,3%
	Total	80	100%

Tabela XIII – Caracterização do Perfil Lipídico da Amostra na 1ª Consulta de Especialidade

Perfil Lipídico na 1ª Consulta		
CT (mg/dL) *	N = 80	285,00 (245,75-335,25)
c-LDL (mg/dL) *	N = 80	202,50 (160,25-260,50)
c-HDL (mg/dL) *	n = 77	52,00 (43,00-66,00)
c-não-HDL (mg/dL) *	n = 77	230,00 (183,00-283,50)
Triglicerídeos (mg/dL) *	n = 77	127,00 (85,00-173,50)
ApoB (mg/dL) *	n = 55	157,00 (111,00-194,00)
Lp(a) (nmol/L) *	n = 47	65,20 (32,50-129,60)

Os dados assinalados com * estão apresentados sob a forma de mediana (P25-P75).

Tabela XIV – Caracterização do Hemograma da Amostra na 1ª Consulta de Especialidade

Hemograma na 1ª Consulta de Especialidade		
Hemoglobina (g/dL)	n = 75	13,93 ± 1,35
Eritrócitos	n = 75	4,74 ± 0,48 x 10 ¹² /L
Leucócitos *	n = 75	6,96 (5,92-8,01) x 10 ⁹ /L
Plaquetas *	n = 75	249,00 (212,00-291,00) x 10 ⁹ /L

Dados apresentados em média ± desvio-padrão, exceto os assinalados* que estão apresentados em mediana (P25-P75).

Tabela XV – Avaliação da Classificação Obtida Pela Amostra com o SBR sem teste genético e após a realização de teste genético.

SBR Com Teste Genético							
SBR Sem Teste Genético			Improvável	Provável	Definitivo	Total	<i>p</i>
	Improvável	N	30	0	4	34	< 0,001
		%	88,2%	0,0%	11,8%	100,0%	
	Provável	N	0	11	32	43	
		%	0,0%	25,6%	74,4%	100,0%	
	Definitivo	N	0	0	3	3	
		%	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%	
	Total	N	30	11	39	80	
		%	37,5%	13,8%	48,8%	100,0%	

Tabela XVI – Avaliação da Classificação Obtida Pela Amostra com o SBR com teste genético e a capacidade de identificação da doença.

Hipercolesterolemia Familiar						
Critérios de SBR (com inclusão do teste genético)			Não	Sim	Total	<i>p</i>
	Improvável	N	20	10	30	< 0,001
		%	66,7%	33,3%	100,0%	
	Provável	N	10	1	11	
		%	90,9%	9,1%	100,0%	
	Definitivo	N	1	38	39	
		%	2,6%	97,4%	100,0%	
	Total	N	31	49	80	
		%	38,8%	61,3%	100,0%	

Tabela XVII – Avaliação da Classificação Obtida Pela Amostra com o DLCN sem teste genético e após a realização de teste genético.

DLCN Com Teste Genético								
DLCN Sem Teste Genético			Improvável	Possível	Provável	Definitivo	Total	<i>p</i>
	Improvável	N	11	0	0	9	20	< 0,001
		%	55,0%	0,0%	0,0%	45,0%	100,0%	
	Possível	N	0	11	0	16	27	
		%	0,0%	40,7%	0,0%	59,3%	100,0%	
	Provável	N	0	0	4	10	14	
		%	0,0%	0,0%	28,6%	71,4%	100,0%	
	Definitivo	N	0	0	0	9	9	
		%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%	
	Total	N	11	11	4	44	70	
		%	15,7%	15,7%	5,7%	62,9%	100,0%	

Tabela XVIII – Avaliação da Classificação Obtida Pela Amostra com o DLCN com teste genético e a capacidade de identificação da doença.

Hipercolesterolemia Familiar						
Critérios da DLCN (Com Inclusão do Teste Genético)			Não	Sim	Total	<i>p</i>
	Improvável	N	11	0	11	< 0,001
		%	100,0%	0,0%	100,0%	
	Possível	N	11	0	11	
		%	100,0%	0,0%	100,0%	
	Provável	N	4	0	4	
		%	100,0%	0,0%	100,0%	
	Definitivo	N	1	43	44	
		%	2,3%	97,7%	100,0%	
	Total	N	27	43	70	
		%	38,6%	61,4%	100,0%	

Tabela XIX – Valores Preditivos dos Principais Critérios de Diagnóstico Clínico de HF do Diagnóstico Genético de HF.

	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
SBR Sem Teste Genético				
“Definitivo”	6,12%	100%	100%	40,26%
“Provável” e “Definitivo”	71,43%	64,52%	76,09%	58,82%
SBR Com Teste Genético				
“Definitivo”	77,55%	96,77%	97,44%	73,17%
“Provável” e “Definitivo”	79,59%	64,52%	78,00%	66,67%
DLCN Sem Teste Genético				
“Definitivo”	20,93%	100%	100%	44,26%
“Provável” e “Definitivo”	41,86%	81,48%	78,26%	46,80%
“Possível”, “Provável” e “Definitivo”	79,07%	40,74%	68,00%	55,00%
DLCN Com Teste Genético				
“Definitivo”	100%	96,30%	97,73%	100%
“Provável” e “Definitivo”	100%	81,48%	89,58%	100%
“Possível”, “Provável” e “Definitivo”	100%	40,74%	72,88%	100%

Tabela XX – Fatores Preditores de Mutação para HF no Teste Genético.

	Univariada			Multivariada		
	OR	CI 95%	P	OR	CI 95%	P
CT	1,008	(1,001-1,014)	0,018	0,982	(0,936-1,030)	0,462
c-LDL	1,011	(1,004-1,019)	0,004	1,116	(1,009-1,234)	0,032
c-Não HDL	1,008	(1,001-1,015)	0,018	0,966	(0,862-1,083)	0,551
APO B	1,015	(1,003-1,028)	0,012	0,970	(0,899-1,046)	0,423
Plaquetas	0,992	(0,984-0,999)	0,035	0,995	(0,983-1,007)	0,422

OR = Odds Ratio; CI 95% = Intervalo de Confiança de 95%

Tabela XXI – Caracterização da Terapêutica Realizada pelos Doentes com HF Confirmada.

Esquema Terapêutico	N	Percentagem
Estatina de Moderada Intensidade	3	6,1%
Estatina de Alta Intensidade	4	8,2%
Estatina de Moderada Intensidade + Ezetimiba	1	2,0%
Estatina de Alta Intensidade + Ezetimiba	13	26,5%
Estatina de Alta Intensidade + Ezetimiba + Evolocumab	9	18,4%
Estatina de Moderada Intensidade + Ezetimiba + Evolocumab	2	4,1%
Estatina de Alta Intensidade + Ezetimiba + Fenofibrato	1	2,0%
Estatina de Alta Intensidade + Evinacumab	1	2,0%
Estatina de Alta Intensidade + Ezetimiba + LDL-Aférese	2	4,1%
LDL-Aférese	1	2,0%
Evolocumab	1	2,0%
Ácido Bempedoico	1	2,0%
Alterações Nutricionais	2	4,1%
Sem Tratamento	1	2,0%
Perda de Seguimento	7	14,3%
Total	49	100%

Tabela XXII – Caracterização do Perfil Lipídico dos Doentes com HF Confirmada.

Perfil Lipídico nos Doentes com HF Confirmada			
	Pré-Terapêutica	Pós-Terapêutica	<i>p</i>
CT (mg/dL) *	304,00 (258,00-362,00)	170,00 (140,25-223,00)	<0,001
c-LDL (mg/dL) *	224,00 (187,00-284,50)	109,00 (69,43-150,75)	<0,001
c-HDL (mg/dL) *	50,50 (43,00-65,25)	45,50 (41,00-58,75)	0,004
c-não-HDL (mg/dL) *	243,50 (205,00-310,25)	122,50 (91,00-167,25)	<0,001
Triglicerídeos (mg/dL) *	124,00 (82,00-157,25)	80,00 (59,75-149,50)	0,004
ApoB (mg/dL) *	172,00 (138,00-217,25)	101,50 (66,75-119,75)	<0,001

Os dados assinalados com * estão apresentados sob a forma de mediana (P25-P75).

Tabela XXIII – Doentes com HF Confirmada e Relação com Alvo Terapêutico de c-LDL, c-não-HDL e ApoB.

Alvo Terapêutico	Sim		Não		Total	
	N	%	N	%	N	%
c-LDL	10	25,0%	30	75,0%	40	100%
c-não-HDL	13	34,2%	25	65,8%	38	100%
ApoB	12	32,4%	25	67,6%	37	100%

Tabela XXIV – Caracterização do Perfil Lipídico Atual dos Doentes Fora do Alvo de c-LDL.

Perfil Lipídico Atual		
CT (mg/dL) *	n = 30	195,50 (164,00-170,25)
c-LDL (mg/dL) *	n = 30	123,50 (99,75-170,25)
c-HDL (mg/dL) *	n = 30	44,50 (39,00-54,75)
c-não-HDL (mg/dL) *	n = 30	142,50 (121,00-176,75)
Triglicerídeos (mg/dL) *	n = 30	80,00 (65,75-142,50)
ApoB (mg/dL) *	n = 28	111,00 (96,25-125,50)

Os dados assinalados com * estão apresentados sob a forma de mediana (P25-P75).

Tabela XXV – Caracterização da Terapêutica Realizada pelos Doentes Fora do Alvo de c-LDL.

Esquema Terapêutico	N	Percentagem
Estatina de Moderada Intensidade	3	10,0%
Estatina de Alta Intensidade	3	10,0%
Estatina de Alta Intensidade + Ezetimiba	12	40,0%
Estatina de Alta Intensidade + Ezetimiba + Evolocumab	4	13,3%
Estatina de Moderada Intensidade + Ezetimiba + Evolocumab	1	3,3%
Estatina de Alta Intensidade + Ezetimiba + Fenofibrato	1	3,3%
Estatina de Alta Intensidade + Evinacumab	1	3,3%
Estatina de Alta Intensidade + Ezetimiba + LDL-Aférese	1	3,3%
LDL-Aférese	1	3,3%
Evolocumab	1	3,3%
Alterações Nutricionais	1	3,3%
Sem Tratamento	1	3,3%
Total	30	100%

Figuras

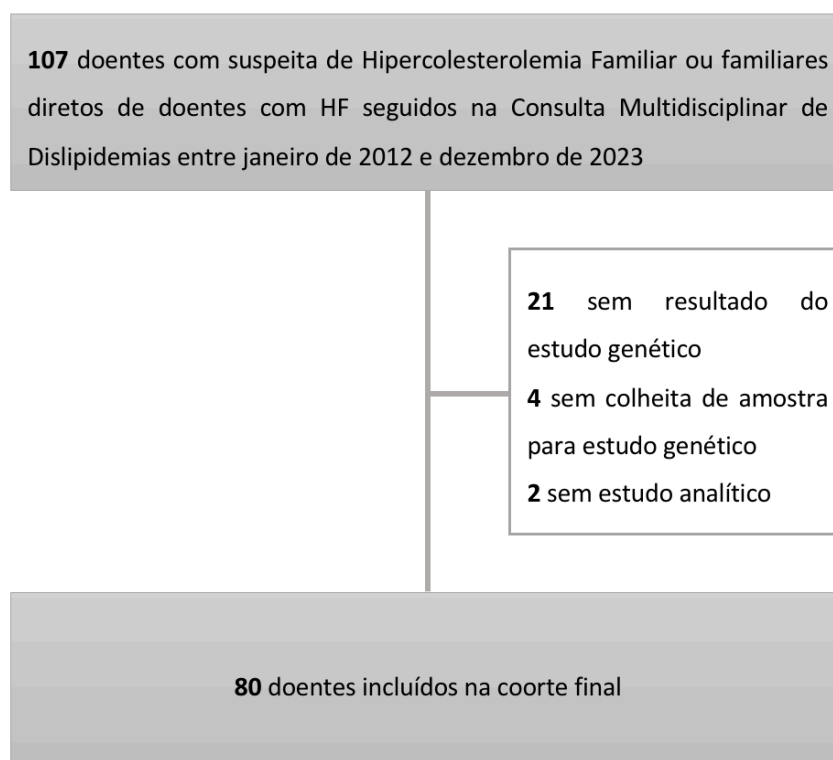


Figura 1 – Seleção da Amostra de Doentes Incluída no Estudo

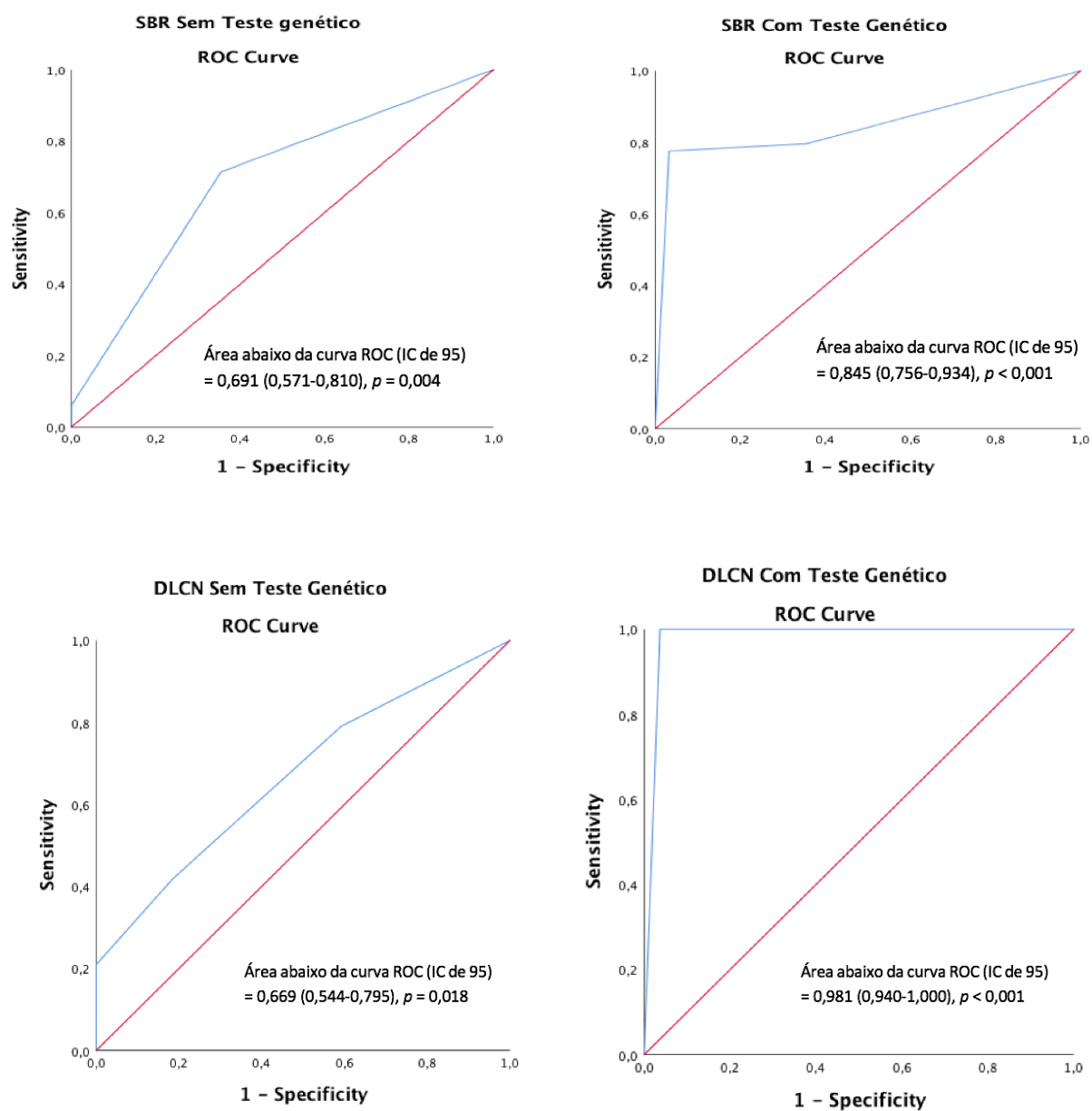


Figura 2 – Curvas ROC para os critérios de diagnóstico clínico (SBR e DLCN) antes e após a realização do Teste Genético.

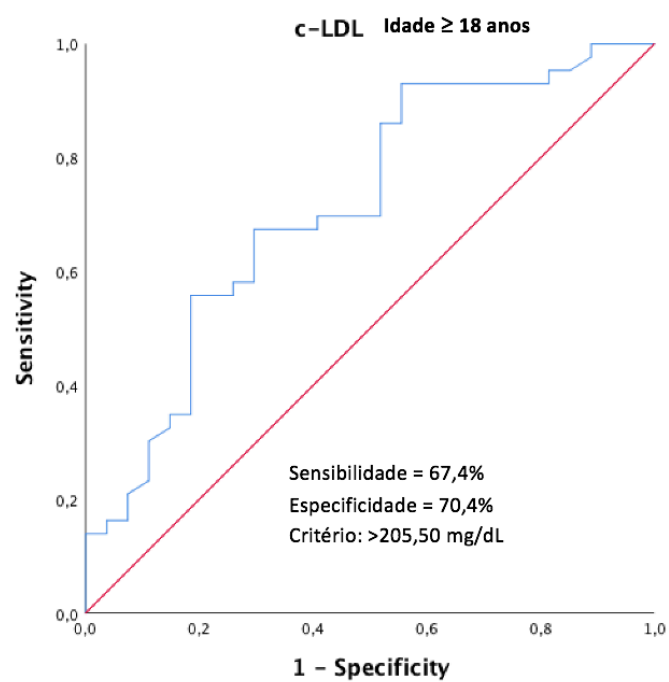


Figura 3 – Curva ROC para avaliação da capacidade preditiva de teste genético positivo do c-LDL.

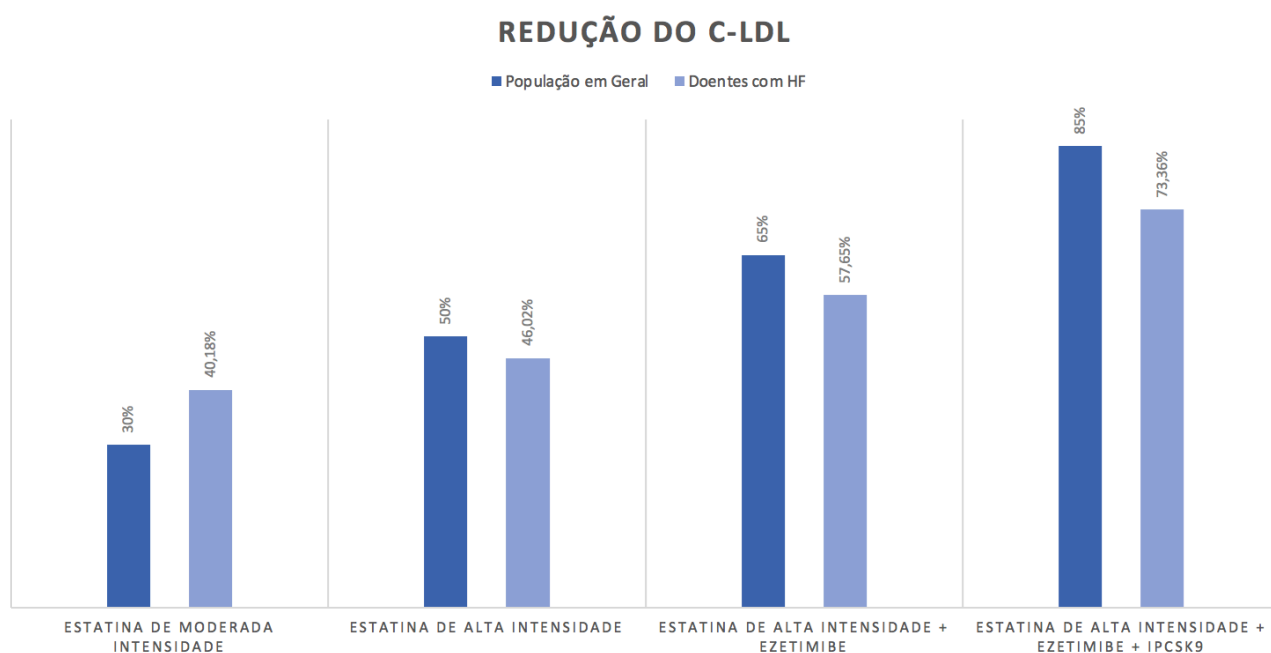


Figura 4 – Comparação da redução de c-LDL nos doentes com HF face ao definido para a população em geral, de acordo com a terapêutica aplicada. Valor esperado de acordo com as guidelines da ESC de 2019 do Tratamento das Dislipidemias.²⁴

Bibliografia

1. Migliara G, Baccolini V, Rosso A, et al. Familial Hypercholesterolemia: A Systematic Review of Guidelines on Genetic Testing and Patient Management. *Front Public Health*. 2017;5(252):1-8. doi:10.3389/fpubh.2017.00252
2. Bouhairie VE, Goldberg AC. Familial Hypercholesterolemia. *Cardiol Clin*. 2015;33(2):169-179. doi:10.1016/j.ccl.2015.01.001
3. Bourbon M, Rato Q. Portuguese Familial Hypercholesterolemia Study: presentation of the study and preliminary results. *Revista Portuguesa de Cardiologia*. 2006;25(11):999-1013.
4. Ontario Health (Quality). Genetic Testing for Familial Hypercholesterolemia: Health Technology Assessment. *Ont Health Technol Assess Ser*. 2022;22(3):1-155.
5. Turgeon RD, Barry AR, Pearson GJ. Familial hypercholesterolemia: Review of diagnosis, screening, and treatment. *Canadian family physician*. 2016;62(1):32-37.
6. Singh S, Bittner V. Familial Hypercholesterolemia—Epidemiology, Diagnosis, and Screening. *Curr Atheroscler Rep*. 2015;17(2):3-8. doi:10.1007/s11883-014-0482-5
7. Suryawanshi YN, Warbhe RA. Familial Hypercholesterolemia: A Literature Review of the Pathophysiology and Current and Novel Treatments. *Cureus*. 2023;15(11):1-10. doi:10.7759/cureus.49121
8. Rader DJ, Kathiresan S. Disorders of Lipoprotein Metabolism. In: Jameson JL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 20e. McGraw-Hill Education; 2018. accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1183992782
9. Sjouke B, Kusters DM, Kindt I, et al. Homozygous autosomal dominant hypercholesterolaemia in the Netherlands: prevalence, genotype–phenotype relationship, and clinical outcome. *Eur Heart J*. 2015;36(9):560-565. doi:10.1093/eurheartj/ehu058
10. Santos RD, Gidding SS, Hegele RA, et al. Defining severe familial hypercholesterolaemia and the implications for clinical management: a consensus statement from the International Atherosclerosis Society Severe Familial Hypercholesterolemia Panel. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016;4(10):850-861. doi:10.1016/S2213-8587(16)30041-9
11. Medeiros AM, Bourbon M. Genetic Testing in Familial Hypercholesterolemia: Is It for Everyone? *Curr Atheroscler Rep*. 2023;25(4):127-132. doi:10.1007/s11883-023-01091-5
12. Alonso R, Perez de Isla L, Muñoz-Grijalvo O, Diaz-Diaz JL, Mata P. Familial Hypercholesterolaemia Diagnosis and Management. *Eur Cardiol*. 2018;13(1):14-20. doi:10.15420/ecr.2018:10:2
13. McGowan MP, Hosseini Dehkordi SH, Moriarty PM, Duell PB. Diagnosis and Treatment of Heterozygous Familial Hypercholesterolemia. *J Am Heart Assoc*. 2019;8(24):1-16. doi:10.1161/JAHA.119.013225

14. Iyen B, Qureshi N, Weng S, et al. Sex differences in cardiovascular morbidity associated with familial hypercholesterolaemia: A retrospective cohort study of the UK Simon Broome register linked to national hospital records. *Atherosclerosis*. 2020;315:131-137. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2020.10.895
15. Zubieliene K, Valteryte G, Jonaitiene N, Žaliaduonyte D, Zabiela V. Familial Hypercholesterolemia and Its Current Diagnostics and Treatment Possibilities: A Literature Analysis. *Medicina (B Aires)*. 2022;58(11):1-12. doi:10.3390/medicina58111665
16. Koutsogianni AD, Adamidis PS, Barkas F, et al. Familial Hypercholesterolemia and Lipoprotein(a): A Gordian Knot in Cardiovascular Prevention. *Metabolites*. 2022;12(11):1065. doi:10.3390/metabo12111065
17. Lambert CT, Sandesara P, Isiadinso I, et al. Current Treatment of Familial Hypercholesterolaemia. *Eur Cardiol*. 2014;9(2):76-81. doi:10.15420/ecr.2014.9.2.76
18. Sturm AC, Knowles JW, Gidding SS, et al. Clinical Genetic Testing for Familial Hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(6):662-680. doi:10.1016/j.jacc.2018.05.044
19. Medeiros AM, Alves AC, Bourbon M. Mutational analysis of a cohort with clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia: considerations for genetic diagnosis improvement. *Genetics in Medicine*. 2016;18(4):316-324. doi:10.1038/gim.2015.71
20. Mancia G, Kreutz R, Brunström M, et al. 2023 ESH Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2023;41(12):1874-2071. doi:10.1097/HJH.0000000000003480
21. Pasquali R, Casanueva F, Haluzik M, et al. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline: Endocrine work-up in obesity. *Eur J Endocrinol*. 2020;182(1):G1-G32. doi:10.1530/EJE-19-0893
22. Civeira F, Ros E, Jarauta E, et al. Comparison of Genetic Versus Clinical Diagnosis in Familial Hypercholesterolemia. *Am J Cardiol*. 2008;102(9):1187-1193.e1. doi:10.1016/j.amjcard.2008.06.056
23. National Institute for Health and Care Excellence. Evidence review and recommendations: Diagnosis. In: National Institute for Health and Care Excellence, ed. *Familial Hypercholesterolaemia: Identification and Management: Evidence Reviews for Case-Finding, Diagnosis and Statin Monotherapy*. National Institute for Health and Care Excellence; 2017:46-54.
24. Mach F, Baigent C, Catapano AL, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J*. 2020;41(1):111-188. doi:10.1093/eurheartj/ehz455
25. Visseren FLJ, Mach F, Smulders YM, et al. 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J*. 2021;42(34):3227-3337. doi:10.1093/eurheartj/ehab484

26. Wiegman A, Gidding SS, Watts GF, et al. Familial hypercholesterolaemia in children and adolescents: gaining decades of life by optimizing detection and treatment. *Eur Heart J*. 2015;36:2425-2437. doi:10.1093/eurheartj/ehv157
27. Masana L, Zamora A, Plana N, et al. Incidence of Cardiovascular Disease in Patients with Familial Hypercholesterolemia Phenotype: Analysis of 5 Years Follow-Up of Real-World Data from More than 1.5 Million Patients. *J Clin Med*. 2019;8(1080):1-15. doi:10.3390/jcm8071080
28. Tokgozoglu L, Kayikcioglu M. Familial Hypercholesterolemia: Global Burden and Approaches. *Curr Cardiol Rep*. 2021;23(151):1-13. doi:10.1007/s11886-021-01565-5
29. Medeiros AM, Alves AC, Chora JR, Bourbon M. Estudo português de hipercolesterolemia familiar. Artigos Breves Nº3. *INSA Observações Boletim-Epidemiológico*. 2017;6(Supl 9):15-18.
30. Medeiros AM, Alves AC, Chora JR, Miranda B, Bourbon M. Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar (1999-2021): relação fenótipo-genótipo. Artigos Breves Nº2. *INSA Observações Boletim-Epidemiológico*. 2023;12(33):13-20.
31. Henderson R, O’Kane M, McGilligan V, Watterson S. The genetics and screening of familial hypercholesterolaemia. *J Biomed Sci*. 2016;23(39):1-12. doi:10.1186/s12929-016-0256-1
32. Brandts J, Ray KK. Familial Hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*. 2021;78(18):1831-1843. doi:10.1016/j.jacc.2021.09.004
33. Lui DTW, Lee ACH, Tan KCB. Management of Familial Hypercholesterolemia: Current Status and Future Perspectives. *J Endocr Soc*. 2021;5(1):1-14. doi:10.1210/jendso/bvaa122
34. Baum SJ, Brown AS. Familial Hypercholesterolemia: Although Identification Advances, Appreciation and Treatment Lag. *Rev Cardiovasc Med*. 2018;19(S1):25-30. doi:10.3909/ricm19S1S0001
35. Warden BA, Duell PB. Evinacumab for treatment of familial hypercholesterolemia. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2021;19(8):739-751. doi:10.1080/14779072.2021.1955349
36. Schreuder MM, Hamkour S, Siegers KE, et al. LDL cholesterol targets rarely achieved in familial hypercholesterolemia patients: A sex and gender-specific analysis. *Atherosclerosis*. 2023;384(117117):1-7. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2023.03.022
37. Vallejo-Vaz AJ, Stevens CAT, Lyons ARM, et al. Global perspective of familial hypercholesterolaemia: a cross-sectional study from the EAS Familial Hypercholesterolaemia Studies Collaboration (FHSC). *The Lancet*. 2021;398(10312):1713-1725. doi:10.1016/S0140-6736(21)01122-3
38. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: Consensus Statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J*. 2013;34(45):3478-3490. doi:10.1093/eurheartj/ehv273

39. Beheshti SO, Madsen CM, Varbo A, Nordestgaard BG. Worldwide Prevalence of Familial Hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2020;75(20):2553-2566. doi:10.1016/j.jacc.2020.03.057
40. Cuchel M, Raal FJ, Hegele RA, et al. 2023 Update on European Atherosclerosis Society Consensus Statement on Homozygous Familial Hypercholesterolaemia: new treatments and clinical guidance. *Eur Heart J.* 2023;44(25):2277-2291. doi:10.1093/eurheartj/ehad197
41. Ahmad ZS, Andersen RL, Andersen LH, et al. US physician practices for diagnosing familial hypercholesterolemia: data from the CASCADE-FH registry. *J Clin Lipidol.* 2016;10(5):1223-1229. doi:10.1016/j.jacl.2016.07.011
42. Perez de Isla L, Alonso R, Watts GF, et al. Attainment of LDL-Cholesterol Treatment Goals in Patients With Familial Hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2016;67(11):1278-1285. doi:10.1016/j.jacc.2016.01.008
43. Serra-Planas E. Referral rate, profile and degree of control of patients with familial hypercholesterolemia: data from a single lipid unit from a Mediterranean area. *Lipids Health Dis.* 2023;22(1):62. doi:10.1186/s12944-023-01815-1
44. Pérez de Isla L, Alonso R, Mata N, et al. Predicting Cardiovascular Events in Familial Hypercholesterolemia. *Circulation.* 2017;135(22):2133-2144. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024541
45. Gaio V, Rodrigues AP, Kislaya I, Barreto M, Namorado S, Dias CM. Estimation of the 10-Year Risk of Fatal Cardiovascular Disease in the Portuguese Population: Results from the First Portuguese Health Examination Survey (INSEF 2015). *Acta Med Port.* 2020;33(11):726-732. doi:10.20344/amp.13009
46. Herman C. What Makes a Screening Exam “good”? *AMA J Ethics.* 2006;8(1):34-37. doi:10.1001/virtualmentor.2006.8.1.cprl1-0601
47. Damgaard D, Larsen ML, Nissen PH, et al. The relationship of molecular genetic to clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia in a Danish population. *Atherosclerosis.* 2005;180(1):155-160. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.12.001
48. Haralambos K, Whatley SD, Edwards R, et al. Clinical experience of scoring criteria for Familial Hypercholesterolaemia (FH) genetic testing in Wales. *Atherosclerosis.* 2015;240(1):190-196. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.03.003
49. Leren TP, Bogsrud MP. The importance of cascade genetic screening for diagnosing autosomal dominant hypercholesterolemia: Results from twenty years of a national screening program in Norway. *J Clin Lipidol.* 2021;15(5):674-681. doi:10.1016/j.jacl.2021.08.007
50. Louter L, Defesche J, Roeters van Lennep J. Cascade screening for familial hypercholesterolemia: Practical consequences. *Atheroscler Suppl.* 2017;30:77-85. doi:10.1016/j.atherosclerosissup.2017.05.019
51. Oliva J, López-Bastida J, Moreno SG, Mata P, Alonso R. Cost-Effectiveness Analysis of a Genetic Screening Program in the Close Relatives of Spanish Patients With Familial

- Hypercholesterolemia. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*. 2009;62(1):57-65. doi:10.1016/S1885-5857(09)71514-2
52. Fontes-Carvalho R, Marques Silva P, Rodrigues E, et al. Practical guide for the use of PCSK9 inhibitors in Portugal. *Revista Portuguesa de Cardiologia (English Edition)*. 2019;38(6):391-405. doi:10.1016/j.repce.2019.07.004
 53. Tada H, Nomura A, Ogura M, et al. Diagnosis and Management of Sitosterolemia 2021. *J Atheroscler Thromb*. 2021;28(8):791-801. doi:10.5551/jat.RV17052
 54. Benito-Vicente A, Alves AC, Etxebarria A, Medeiros AM, Martin C, Bourbon M. The importance of an integrated analysis of clinical, molecular, and functional data for the genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Genetics in Medicine*. 2015;17(12):980-988. doi:10.1038/gim.2015.14
 55. Mickiewicz A, Chmara M, Futema M, et al. Efficacy of clinical diagnostic criteria for familial hypercholesterolemia genetic testing in Poland. *Atherosclerosis*. 2016;249:52-58. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.025
 56. Watts GF, Gidding SS, Hegele RA, et al. International Atherosclerosis Society guidance for implementing best practice in the care of familial hypercholesterolaemia. *Nat Rev Cardiol*. 2023;20(12):845-869. doi:10.1038/s41569-023-00892-0
 57. Landmesser U, Chapman MJ, Stock JK, et al. 2017 Update of ESC/EAS Task Force on practical clinical guidance for proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibition in patients with atherosclerotic cardiovascular disease or in familial hypercholesterolaemia. *Eur Heart J*. 2018;39(14):1131-1143. doi:10.1093/eurheartj/ehx549
 58. Raal FJ, Hovingh GK, Catapano AL. Familial hypercholesterolemia treatments: Guidelines and new therapies. *Atherosclerosis*. 2018;277:483-492. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2018.06.859
 59. Mirzai S, Chevli PA, Rikhi R, Shapiro MD. Familial Hypercholesterolemia: From Clinical Suspicion to Novel Treatments. *Rev Cardiovasc Med*. 2023;24(11):311. doi:10.31083/j.rcm2411311
 60. Alonso R, Muñoz-Grijalvo O, Díaz-Díaz JL, et al. Efficacy of PCSK9 inhibitors in the treatment of heterozygous familial hypercholesterolemia: A clinical practice experience. *J Clin Lipidol*. 2021;15(4):584-592. doi:10.1016/j.jacl.2021.04.011
 61. Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Genetic Causes of Monogenic Heterozygous Familial Hypercholesterolemia: A HuGE Prevalence Review. *Am J Epidemiol*. 2004;160(5):407-420. doi:10.1093/aje/kwh236

Exma. Sra. Maria João Nascimento
Estudante do ICBAS

ASSUNTO: Trabalho Académico - MIM - “Hipercolesterolemia Familiar - O Impacto do Teste Genético” - N/ REF.ª 2023.266(228-DEFI/218-CE)

O Conselho de Administração do Santo António, na reunião de 10 de janeiro de 2024, emitiu a seguinte Deliberação: “Autorizado” para a realização do estudo acima mencionado, a realizar no Serviço de Endocrinologia desta Instituição e tendo como Investigador Principal Maria João Nascimento, estudante do ICBAS.

O estudo foi previamente analisado pela Comissão de Ética do Santo António |ICBAS, pelo Gabinete de Projeto de Investigação do CAC, pela Direção do Centro Académico Clínico ICBAS|CHUdSA e pelo Presidente do Conselho de Administração, tendo obtido parecer favorável.

Cumprimentos,

Assinado por: **Cláudia Alexandra Oliveira Santos**
Num. de Identificação: 11089889
Data: 2024.01.11 10:12:15+00'00'



