

Isabella Ramos Lima

**Papel de um escore de risco poligênico para
hipercolesterolemia em uma coorte brasileira de
hipercolesterolemia familiar**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos
de Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Dr. Alexandre da Costa Pereira

São Paulo

2022

Isabella Ramos Lima

**Papel de um escore de risco poligênico para
hipercolesterolemia em uma coorte brasileira de
hipercolesterolemia familiar**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos
de Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Dr. Alexandre da Costa Pereira

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lima, Isabella Ramos

Papel de um escore de risco poligênico para
hipercolesterolemia em uma coorte brasileira de
hipercolesterolemia familiar / Isabella Ramos Lima.
-- São Paulo, 2022.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientador: Alexandre da Costa Pereira.

Descritores: 1.Herança poligênica
2.Hipercolesterolemia 3.LDL-colesterol
4.Aterosclerose 5.Polimorfismo de nucleotídeo único
6.Fatores de risco de doenças cardíacas

USP/FM/DBD-259/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à memória do meu pai Isaltino.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr Alexandre da Costa Pereira, pelo acolhimento, pela confiança depositada e principalmente pela paciência em me ensinar sobre estatística!

À minha mãe Alessandra, que nunca mediu esforços para proporcionar a melhor educação a mim e a minha irmã, por todo o incentivo e por ser minha maior referência de vida.

À minha irmã Iris, por sempre me encorajar e celebrar minhas conquistas junto comigo (mesmo que à distância).

Às mulheres da família Ramos, em especial minha avó Zeli, por serem exemplo de batalhas e de conquistas.

Ao Théo, pela ajuda e apoio em todos os momentos, por compartilhar as inseguranças, ansiedades e a vida comigo. Espero poder dividir tantas outras etapas com você!

Aos meus amigos de infância da Escola Cooperativa, pelo incentivo e por sempre acreditarem que eu seria capaz. Vocês são essenciais na minha vida.

À Cinthia Elim, pela parceria e amizade, por tantas idas ao espetinho da Teodoro pós-expediente para conversar sobre a vida. Esses momentos foram cruciais nessa jornada!

Ao Maurício (Japa) pelo acolhimento quando cheguei no LGCM, pelos cafés e pelos ensinamentos de bancada e análise.

A todos os funcionários que já passaram pelo Hipercol, esse grupo tão especial que fiz parte, e aos médicos do ambulatório de Lipídeos do InCor, pela dedicação no atendimento aos pacientes que fizeram parte do programa.

Aos funcionários e alunos do laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor pelo apoio técnico e pessoal, pelas conversas e pela convivência. Agradeço ainda ao professor Dr José Eduardo Krieger por dar todo o suporte ao programa Hipercol Brasil e pela disponibilidade de toda a infraestrutura do LGCM para que este projeto pudesse ser realizado.

Aos pacientes do Hipercol Brasil do ELSA. Agradeço por acreditarem na ciência brasileira ao aceitar fazer parte destes projetos de pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) à Fundação Zerbini pelo apoio financeiro para a execução deste projeto.

Este trabalho também é de todos vocês!

SUMÁRIO

Lista de Siglas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 A Hipercolesterolemia familiar	18
1.1.1 Aspectos genéticos	19
1.1.2 Manifestações clínicas.....	21
1.1.3 Tratamento	22
1.1.4 Diagnóstico clínico	23
1.1.5 Diagnóstico genético	24
1.1.6 Diagnóstico clínico vs. Diagnóstico genético	25
1.2 Hipercolesterolemia poligênica	26
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Aspectos éticos	32
3.2 Seleção dos participantes.....	32
3.2.1 Hipercol Brasil.....	32
3.2.2 ELSA-Brasil.....	32
3.3 Grupo HF	33
3.3.1 Sequenciamento genético	34
3.3.1.1.1 Ion Torrent PGM.....	35
3.3.1.1.2 SureSelect QXT	35
3.3.2 MLPA (<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>).....	35
3.3.3 Análise de variantes genéticas.....	36
3.3.4 Genotipagem TaqMan	37
3.4 Análise estatística.....	38
3.5 Cálculo do escore poligênico	38
3.6 Frequência alélica dos escores poligênicos.....	41
3.7 Associação entre os escores poligênicos e LDL-C	41

3.8	Associação entre escore poligênico e raça	42
3.9	Avaliação da resposta ao tratamento farmacológico dos indivíduos dos grupos HF.....	42
3.10	Avaliação de doença cardiovascular e escore de cálcio.....	43
4.	RESULTADOS	45
4.1	Casuística.....	45
4.2	Associação entre os escores poligênicos e LDL-C	47
4.3	Avaliação dos escores poligênicos entre os grupos do estudo	48
4.4	Análise dos valores preditos de LDL-C pelos escores poligênicos.....	52
4.5	Análise da frequência alélica dos escores poligênicos.....	54
4.6	Análise dos escores poligênicos entre raças.....	55
4.7	Análise comparativa entre β -coeficientes GLGC e ELSA-Brasil	57
4.8	Resposta ao tratamento farmacológico dos indivíduos dos grupos HF.	58
4.9	Associação dos PRSs com aterosclerose pré-clínica e doença cardiovascular.....	59
5.	DISCUSSÃO	63
5.1	Características clínicas da casuística	63
5.2	Associação dos escores de risco poligênico com LDL-C	64
5.3	Associação dos escores de risco poligênico com raça	66
5.4	Distribuição dos escores poligênicos entre os grupos.....	67
5.5	Resposta ao tratamento farmacológico dos indivíduos dos grupos HF.	68
5.6	Associação dos PRSs com aterosclerose pré-clínica e doença cardiovascular.....	69
5.7	Aplicabilidade do Escore principal vs. Escore reduzido.....	70
5.8	Vantagens e Limitações	71
6.	CONCLUSÕES.....	73
7.	REFERÊNCIAS	74
8.	ANEXOS.....	81

LISTA DE SIGLAS

ABraOM	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
APO-B	Apolipoproteína B
CAC	escore de cálcio coronariano
CT	Colesterol Total
DAC	Doença Arterial Coronariana
DCV	Doença Cardiovascular
DLCN	<i>Dutch Lipid Clinic Network</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
GLGC	<i>Global Lipid Genetic Consortium</i>
GnomAD	<i>Genome Aggregation Database</i>
GWAS	<i>Genome-Wide Association Study</i>
HDL-c	Colesterol HDL
HF	Hipercolesterolemia Familiar
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IMC	Índice de Massa Corporal
LDL-C	Colesterol LDL
LDL-r	Receptor de LDL
LGCM	Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular
MAF	<i>Minor Allele Frequency</i>
MedPed	<i>Make Early Diagnosis Prevent Early Death</i>

MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
OR	<i>Odds-Ratio</i> , ou razão de chances
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PRS	<i>Polygenic Risk Score</i>
SNV	<i>Single Nucleotide Variant</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: SNVs selecionados para compor o PRS.....	28
Tabela 2: Variantes comuns que compõe os escores poligênicos associados à hipercolesterolemia familiar.....	39
Tabela 3: Características de todos os indivíduos incluídos no estudo.....	45
Tabela 4: Resultado das comparações múltiplas utilizando o teste de Dunn. .	52
Tabela 5: MAFs dos SNVs presentes no PRS em diferentes populações.....	55
Tabela 6: Análise comparativa dos escores entre as raças dos indivíduos.....	56
Tabela 7: Comparativo dos β -coeficientes (Original GLGC e ELSA-Brasil).....	57
Tabela 8: Razão de chances de cada quartil do escore de 12 SNVs de escore de cálcio > 100 unidades nos indivíduos do grupo ELSA-Brasil após ajuste para idade e sexo	61
Tabela 9: Razão de chances de cada quartil do escore de 6 SNVs de escore de cálcio > 100 unidades nos indivíduos do grupo ELSA-Brasil após ajuste para idade e sexo	61
Tabela 10: Razão de chances de cada quartil do escore de 12 SNVs de manifestação de doença cardiovascular nos indivíduos dos grupos HF após ajuste para idade, sexo e grupo	62
Tabela 11: Razão de chances de cada quartil do escore de 6 SNVs de manifestação de doença cardiovascular nos indivíduos dos grupos HF após ajuste para idade, sexo e grupo	62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estimativa da prevalência mundial da HF na população geral. Modificada de Beheshti (2020)⁷. 19
- Figura 2:** Fisiopatologia da HF. Modificado de Nordestgaard et. al. (2013)²¹.. 22
- Figura 3:** Sobreposição entre o diagnóstico clínico e molecular de HF. Há uma proporção na qual é encontrada alteração genética, mas o indivíduo não tem diagnóstico clínico. Por outro lado, em uma parcela dos casos, apesar do indivíduo ter diagnóstico clínico, nenhuma alteração genética causal é identificada. Modificado de Nordestgaard et. al (2013)²¹..... 25
- Figura 4:** Fundamento do PRS. As variantes genéticas procedentes da técnica de GWAS usadas nos PRSs são comuns na maioria das populações. Modificado de Illumina (2019)³⁶..... 27
- Figura 5:** Fluxograma das metodologias realizadas nas amostras do grupo Hipercol Brasil. As amostras foram classificadas de acordo com a ausência ou presença de alteração genética associada à Hipercolesterolemia Familiar. 34
- Figura 6:** Cálculo do PRS. Faz-se uma soma ponderada para cada amostra, onde os pesos são os β -coeficientes de cada SNV. 40
- Figura 7:** Representação gráfica do teste de correlação de Spearman. (A) Correlação do LDL-C com o escore principal. (B) Correlação do LDL-C com o escore reduzido..... 47
- Figura 8:** Testes de regressão linear entre LDL-C e escores poligênicos. (A) Regressão do LDL-C com o escore principal. (B) Regressão do LDL-C com o escore reduzido..... 48
- Figura 9:** Distribuição do escore de 12 SNVs entre os grupos. (A) ELSA-Brasil vs. indivíduos com diagnóstico clínico de HF, porém sem alteração genética

identificada (HF/M-). (B) ELSA-Brasil vs. indivíduos com diagnóstico clínico e genético de HF (HF/M+). (C) HF/M+ vs. HF/M-..... 49

Figura 10: Distribuição do escore de 6 SNVs entre os grupos. (A) ELSA-Brasil vs. indivíduos com diagnóstico clínico de HF, porém sem alteração genética identificada (HF/M-). (B) ELSA-Brasil vs. indivíduos com diagnóstico clínico e genético de HF (HF/M+). (C) HF/M+ vs. HF/M-..... 50

Figura 11: Resultado da comparação das médias dos escores entre os grupos por Kruskal Wallis. Tanto no escore principal (painel A) quanto no reduzido (painel B), o grupo FH/M- teve a maior média, seguido do grupo FH/M+. 51

Figura 12: Distribuição dos valores de LDL-C entre os diferentes decis dos escores do grupo ELSA-Brasil. (A) LDL-C real observados distribuídos entre os decis do escore principal. (B) LDL-C preditos pelo modelo linear distribuídos entre os decis do escore principal. (C) LDL-C real observados distribuídos entre os decis do escore reduzido. (D) LDL-C preditos distribuídos entre os decis do escore reduzido..... 53

Figura 13: Distribuição dos valores de LDL-C entre os diferentes decis dos escores dos grupos dislipidêmicos. (A) LDL-C real observados distribuídos entre os decis do escore principal. (B) LDL-C preditos pelo modelo linear distribuídos entre os decis do escore principal. (C) LDL-C real observados distribuídos entre os decis do escore reduzido. (D) LDL-C preditos distribuídos entre os decis do escore reduzido..... 54

Figura 14: Análise raça-específica da distribuição dos escores entre os indivíduos brancos e não-brancos dos grupos ELSA-Brasil e HF. (A) Escore de 12 SNVs (B) Escore de 6 SNVs. 56

Figura 15: Percentual de redução de LDL-C após terapia hipolipemiante com estatinas e/ou ezetimibe, de acordo com os tercis de cada escore. (A) 12 SNVs PRS (B) 6 SNVs PRS..... 59

Figura 16: Porcentagem de indivíduos de cada grupo de acordo com os níveis de escore de cálcio 60

RESUMO

Lima IR. *Papel de um escore de risco poligênico para hipercolesterolemia em uma coorte brasileira de hipercolesterolemia familiar* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença genética autossômica dominante, caracterizada por níveis elevados de colesterol de baixa densidade (LDL-C) e consequente aumento do risco de doenças cardiovasculares (DCV) prematuras, como acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio. Estima-se que na população em geral, a forma heterozigota de HF afete 1 em cada 300 indivíduos. Atualmente, o diagnóstico da HF é feito por meio de exames e sinais clínicos e, em menor frequência, exames genéticos. Entretanto, apenas cerca de 40% dos indivíduos com diagnóstico clínico de HF submetidos ao teste genético possuem variantes causais identificadas. Esta discrepância entre diagnóstico clínico e genético tem levado pesquisadores a buscarem novas causas para esta doença como, por exemplo, a herança de variantes comuns com efeitos pequenos que, em conjunto, aumentariam os níveis de LDL-C. Essas variantes são usadas para prever o risco de desenvolver uma doença com base na criação de escores de risco poligênico (PRS). Este trabalho tem como objetivo avaliar e validar o papel de um PRS associado à hipercolesterolemia em uma coorte brasileira de HF e suas implicações clínicas. Um PRS de 12 e 6 variantes de nucleotídeo único (SNVs) previamente derivados por outro grupo foram aplicados e analisados em uma coorte de HF (n = 684) e em indivíduos saudáveis do estudo ELSA-Brasil (n = 1605), como grupo controle. A coorte HF foi dividida em dois grupos, de acordo com a presença (FH/M+, n = 193) ou ausência (FH/M-, n = 491) de uma variante patogênica identificada. O escore de cálcio coronariano (CAC escore) também foi avaliado em uma fração desses três grupos. Ambos os PRS foram independentemente associados ao LDL-C nos indivíduos do grupo controle ($p < 0,001$). Nesses indivíduos, a razão de chances de ter escore de cálcio > 100 foi de 1,7 (IC 95%: 1,01 – 2,88, $p = 0,04$) quando comparamos o 4º quartil dos 12 SNVs PRS ao 1º quartil, após ajuste para idade e sexo. Indivíduos do grupo HF/M- tiveram um escore médio mais alto tanto no 12 SNVs PRS (38,25) quanto no 6 SNVs PRS (27,82) quando comparados aos outros grupos ($p < 0,001$). Ambos os escores também foram significativamente maiores no grupo HF/M+ (36,48 e 26,26, respectivamente) quando comparados ao grupo controle ($p < 0,001$). Em indivíduos com HF, a presença de um valor de escore poligênico mais alto não parece estratificar ainda mais os níveis de LDL-C ou o risco de DCV. Diferenças significativas na resposta ao tratamento em função do PRS não foram observadas. Nossos dados evidenciaram que um escore

poligênico mais alto está associado a níveis significativamente mais altos de LDL-C e está independentemente associado a um escore de cálcio mais alto na população geral brasileira. Uma causa poligênica pode explicar uma fração substancial de indivíduos com HF com mutação negativa, mas não parece ser um modulador significativo do fenótipo clínico entre indivíduos com HF, independentemente da presença ou ausência de variante patogênica associada.

Descritores: Herança poligênica; Hipercolesterolemia; LDL-colesterol; Aterosclerose; Polimorfismo de nucleotídeo único; Fatores de risco de doenças cardíacas.

ABSTRACT

Lima IR. *Role of a polygenic risk score for hypercholesterolemia in a Brazilian cohort of familial hypercholesterolemia* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant genetic disorder, characterized by high levels of low-density cholesterol (LDL-C) leading to premature coronary heart diseases such as stroke and myocardial infarction. It is estimated that heterozygous FH affects about 1 in 300 individuals worldwide, but this prevalence may be higher in certain populations. Currently, the diagnosis of FH is made through exams and clinical signs and, to a lesser extent, genetic tests. However, only about 40% of individuals with a clinical diagnosis of FH have a causative genetic variant identified. The relatively low yield rate of molecular testing has led researchers to find new causes for this disease, for example, the inheritance of common variants with small effect sizes that together would increase LDL-C levels. These variants are being used to predict the risk of developing a disease based on the creation of polygenic risk scores (PRS). This work aims to evaluate and validate the role of a PRS associated with hypercholesterolemia in a Brazilian FH cohort and its clinical implications. We analyzed a previously derived PRS of 12 or 6 single nucleotide variants (SNVs) in a FH cohort ($n = 684$) and health individuals from the ELSA-Brasil study ($n = 1605$), as a control group. The FH cohort was divided into two groups, according to the presence (FH/M+, $n = 193$) or absence (FH/M-, $n = 491$) of a pathogenic variant. Coronary artery calcium (CAC) score was also evaluated in a fraction of these three groups. Both PRS was independently associated with LDL-C in individuals from the control group ($p < 0.001$). In these individuals, the odds ratio for having a CAC score > 100 was 1.7 (95% CI: 1.01 – 2.88, $p = 0.04$) in the 4th quartile of the 12 SNVs PRS when compared to the 1st quartile, after adjustment for age, and sex. Subjects in the HF/M- group had the highest mean score in both the 12 SNVs PRS (38.25 [SD 7.32]) and the 6 SNVs PRS (27.82 [SD 6.87]) when compared to the other groups ($p < 0.001$). Both scores were also significantly higher in the HF/M+ group (36.48 [SD 6.97] and 26.26 [SD 6.66], respectively) when compared to the control group ($p < 0.001$). Within HF individuals, the presence of a higher PRS score does not appear to further stratify LDL-C levels or CAD risk. Finally, we did not observe significant differences in treatment response as a function of the derived PRS. Our data shown that having a higher PRS is associated with significantly higher levels of LDL-C in the general Brazilian population, and it is independently associated with higher CAC in the general population. A polygenic cause can explain a substantial fraction of mutation-negative FH individuals but does not

appear to be a significant modulator of the clinical phenotype among FH individuals, regardless of mutation status.

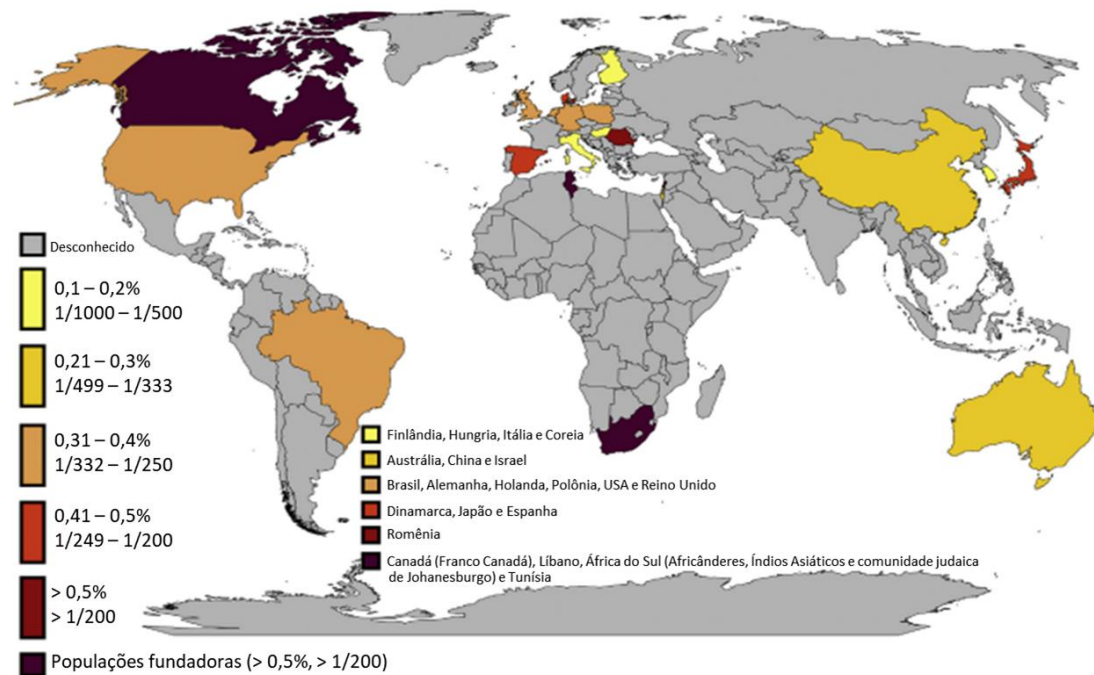
Descriptors: Polygenic inheritance; Hypercholesterolemia; LDL Cholesterol; Atherosclerosis; Single nucleotide polymorphism; Heart disease risk factors.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Hipercolesterolemia familiar

A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença genética de herança autossômica dominante, caracterizada pela elevação do colesterol de baixa densidade (LDL-C) por defeito no seu receptor, aumentando o risco de doenças cardiovasculares (DCV) precoces, além de acúmulo de colesterol ectópico e surgimento de sinais clínicos, como xantomas e xantelasmas¹.

Estima-se que a HF afete 1 em cada 300 indivíduos em sua forma heterozigótica, e 1 em 300.000 na forma homozigótica, podendo ser ainda mais frequente em algumas populações, como por exemplo as Dinamarquesa e Libanesa (Figura 1)^{2,3}. Um estudo conduzido em 2018 por Harada e colaboradores⁴ sugeriu que no Brasil, 1 em cada 263 indivíduos poderia ter diagnóstico clínico de HF. A forma heterozigótica é a mais comum, e geralmente pacientes com esta forma da doença só são diagnosticados após evento cardiovascular. Já a condição homozigótica é a mais grave, e leva a concentrações de LDL-C acima de 350 mg/dL. Pacientes com esta forma da doença têm menos de 25% da atividade em receptores de LDL^{5,6}.



Se mais de um estudo de um país reportou uma prevalência de HF, foi calculada a estimativa de prevalência combinada usando um modelo de efeitos aleatórios.

Figura 1: Estimativa da prevalência mundial da HF na população geral. Modificada de Beheshti (2020)⁷.

1.1.1 Aspectos genéticos

A HF se manifesta principalmente por defeitos genéticos no gene *LDLR*, localizado no cromossomo 19, que codifica o receptor de colesterol LDL-C (LDL-R) presente na superfície das células. Este receptor é responsável por retirar a partícula de LDL-C da corrente sanguínea e internalizá-la nas células para ser metabolizada⁸. Na superfície da partícula de LDL-C localiza-se a apolipoproteína B (APO-B), que funciona como um ligante para que o LDL-C seja reconhecido corretamente pelo receptor. Além disso, esta lipoproteína codificada pelo gene *APOB*, é responsável por manter a integridade do LDL-C. O *APOB* está localizado no cromossomo 2, e possui 29 exons codificantes⁹. Alterações genéticas patogênicas no *LDLR* resultam na produção irregular da

proteína do receptor, em redução de sua atividade, ou até em diminuição de sua expressão na superfície celular.

Além destes genes, destaca-se o *PCSK9*, localizado no cromossomo 1, responsável por codificar a pró-proteína convertase subutilisina/kexina tipo 9, que participa da reciclagem e degradação do LDL-R. Alterações neste gene podem levar ao aumento ou diminuição da função da pró-proteína, e portanto, no caso de alteração patogênica que ocasione o ganho da função deste gene, há uma degradação exacerbada do LDL-R, elevando os níveis de LDL-C no plasma^{9,10}.

Atualmente, cerca de 93% das variantes identificadas foram encontradas no gene *LDLR*, existindo mais de 2000 variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas deste gene descritas na base de dados ClinVar. Outras 5% das variantes foram identificadas no gene *APOB* e por volta de 2% das variantes estão no gene *PCSK9*¹¹.

Além dos três genes convencionais citados, outros genes envolvidos no metabolismo de lipídios também foram relacionados à HF. O gene *LDLRAP1*, envolvido no processo de internalização da partícula de LDL-C, está associado à hipercolesterolemia autossômica recessiva, mais rara¹¹. A Apolipoproteína E (ApoE), codificada pelo gene *APOE*, regula o metabolismo de colesterol, triglicerídeos e fosfolipídios no sangue e cérebro por meio de interações com o LDL-R, desempenhando um papel fundamental na homeostase lipídica e neuronal. Este gene possui três alelos comuns principais ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$) com diferentes efeitos, sendo o alelo $\epsilon 4$ um marcador de risco para doença de Alzheimer e DCV^{12,13}. Ademais, em um primeiro momento, o gene *STAP1*

havia sido reportado como um gene candidato associado à hipercolesterolemia por meio de análise de *linkage* e segregação familiar de variantes¹⁴. Entretanto, estudos recentes indicam que o *STAP1* não faz parte do grupo de genes que causam HF^{15,16}.

Outros genes associados a doenças que também causam aumento de colesterol e que podem ser confundidas com HF também passaram a fazer parte do diagnóstico genético diferencial. Destacam-se os genes *ABCG5* e *ABCG8* associados à sitosterolemia, e o gene *LIPA*, associado à doença de depósito de ésteres de colesterol. Estas doenças também provocam o acúmulo de diferentes tipos de colesterol na corrente sanguínea, possuindo fenótipo semelhante à HF¹¹.

1.1.2 Manifestações clínicas

O desenvolvimento da HF e sua manifestação clínica são causados pelo acúmulo de LDL-C na corrente sanguínea, que pode ter como consequência sua retenção nas paredes arteriais, aumentando o risco de doença arterial coronariana. A deposição de colesterol na parede arterial progride gradualmente, ocupando parte do lúmen arterial, levando à formação de placas de ateroma e à aterosclerose, que pode resultar em restrição do fluxo sanguíneo, causando isquemia^{17,18} (Figura 2).

Além das manifestações clínicas citadas, um alto acúmulo de placas ateroscleróticas também é um marcador de risco para doença cardiovascular subclínica. O escore de cálcio coronário (CAC) possui forte correlação com a presença, extensão e gravidade de aterosclerose coronária, sendo utilizado

como uma medida indireta de carga aterosclerótica até mesmo em indivíduos assintomáticos^{19,20}.

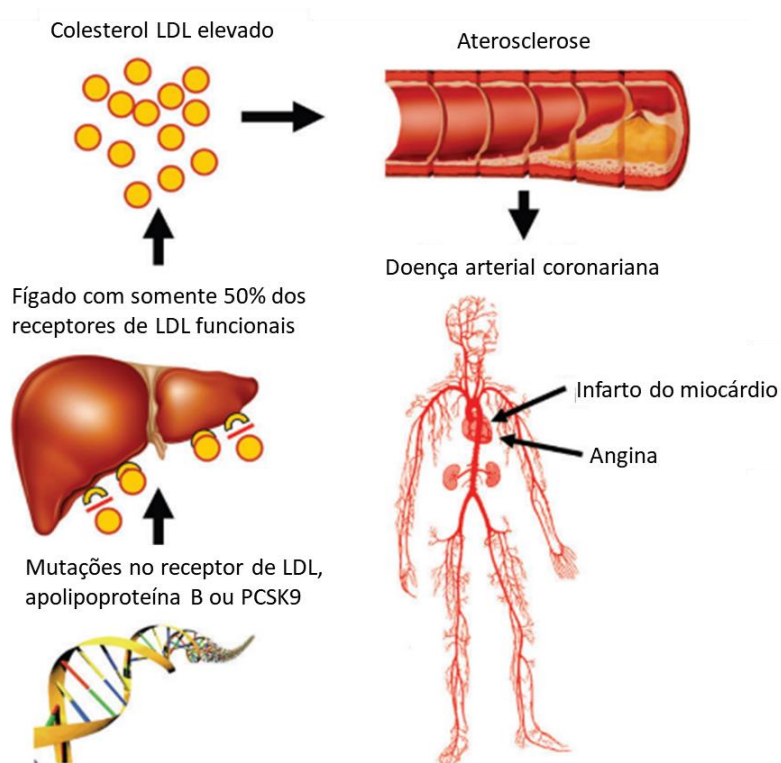


Figura 2: Fisiopatologia da HF. Modificado de Nordestgaard et. al. (2013)²¹

1.1.3 Tratamento

O tratamento da HF é principalmente farmacológico e dietético. Os fármacos mais indicados para os indivíduos com HF são as estatinas de alta potência (atorvastatina e rosuvastatina, por exemplo), que reduzem significativamente os níveis de LDL-C da corrente sanguínea, reduzindo também o risco de doença cardiovascular aterosclerótica²². Em pacientes mais críticos, como os portadores de HF homozigótica, a plasmaférese e a LDL-aférese são alternativas de tratamento, no qual o LDL-C pode ser removido do plasma sanguíneo do indivíduo¹⁸. Os inibidores de PCSK9, fármacos que

inibem a degradação dos receptores de LDL, também são uma excelente alternativa, uma vez que a utilização deste tipo de terapia com anticorpos monoclonais pode reduzir os níveis de LDL-C em cerca de 60%, tendo indicação de uso principalmente em pacientes com HF homozigótica²³. Além disso, é essencial que ocorram mudanças nos hábitos de vida do paciente, diminuindo a influência de fatores externos no agravamento da doença, como o tabagismo e o sedentarismo²⁴.

Estima-se que, se não tratados, o risco cumulativo de um infarto agudo do miocárdio (IAM) em pacientes com HF até os 50 anos de idade é de 50% em homens e 12% em mulheres. Aos 60 anos, o risco de ter algum evento cardiovascular sobe para 85% para os homens e 56% para mulheres²⁵.

1.1.4 Diagnóstico clínico

Geralmente, o diagnóstico clínico da HF é feito levando-se em consideração os valores de colesterol total (CT) e LDL-C, presença de sinais de acúmulo de colesterol (xantomas, xantelasmas e arco corneano), histórico de DCV, histórico familiar e escore de cálcio²⁶. Existem três principais ferramentas padronizadas para o diagnóstico clínico da HF: *US Make Early Diagnosis Prevent Early Death (MedPed)*, *Simon Broome Register* e o *Dutch Lipid Clinic Network (DLCN)*, todas baseadas em características clínicas individuais e familiares²⁷.

O critério de MedPed usa pontos de corte para os níveis de CT e LDL-C específicos para a idade de um indivíduo e histórico familiar. Entretanto, não

são consideradas ocorrências de doença cardiovascular, nem os sinais clínicos como xantoma, xantelasma e arco corneano²⁸.

Já o critério de *Simon Broome* engloba os níveis de colesterol (CT > 290 mg/dL ou LDL-C > 190 mg/dL em adultos), características clínicas (xantomas de tendão), diagnóstico molecular e histórico familiar de DCV. A partir da somatória destas características, o indivíduo é classificado como definitivo ou provável HF²⁷.

O DLCN é semelhante ao *Simon Broome*. Neste critério, são atribuídos pontos para histórico familiar e histórico clínico individual (DCV precoce, adultos com LDL-C > 190 mg/dL ou crianças > 160 mg/dL e presença de xantomas e/ou arco corneano) e teste genético (alterações patogênicas nos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*). Ao final, o paciente é classificado com diagnóstico definitivo, provável e possível de HF²⁹.

1.1.5 Diagnóstico genético

Em geral, o diagnóstico molecular é feito por meio de sequenciamento de pelo menos os três principais genes (*LDLR*, *APOB* e *PCSK9*) para identificação de alterações genéticas que poderiam estar relacionadas à HF. O teste genético fornece uma resposta definitiva para o diagnóstico de HF, tendo grande benefício tanto para o paciente testado quanto para seus familiares. Sugere-se que, quando constatada alteração genética associada à HF, o rastreamento em cascata dos familiares seja realizado. Na HF heterozigótica, a probabilidade de detecção da alteração em parentes de primeiro grau é de 50% e 25% em parentes de segundo grau³⁰.

Além de ser a forma mais custo-efetiva, este rastreamento desempenha um importante papel, pois se estima que existam mais de 10 milhões de pessoas portadoras da HF, e menos de 10% destes tem diagnóstico clínico ou molecular. Estudos ainda demonstram que em muitos países, incluindo o Brasil, menos de 1% dos indivíduos foram diagnosticados^{21,31}.

1.1.6 Diagnóstico clínico vs. Diagnóstico genético

Apesar de o número de pacientes diagnosticados com HF ter aumentado nos últimos anos, alterações genéticas não são detectadas em cerca de 50 a 60% dos indivíduos clinicamente diagnosticados^{32,33} (Figura 3). Este fato tem levado pesquisadores a buscar por genes adicionais que poderiam causar HF. Entretanto, uma proporção destes casos podem possivelmente ter causa poligênica, ao invés de uma causa monogênica ainda desconhecida²¹.

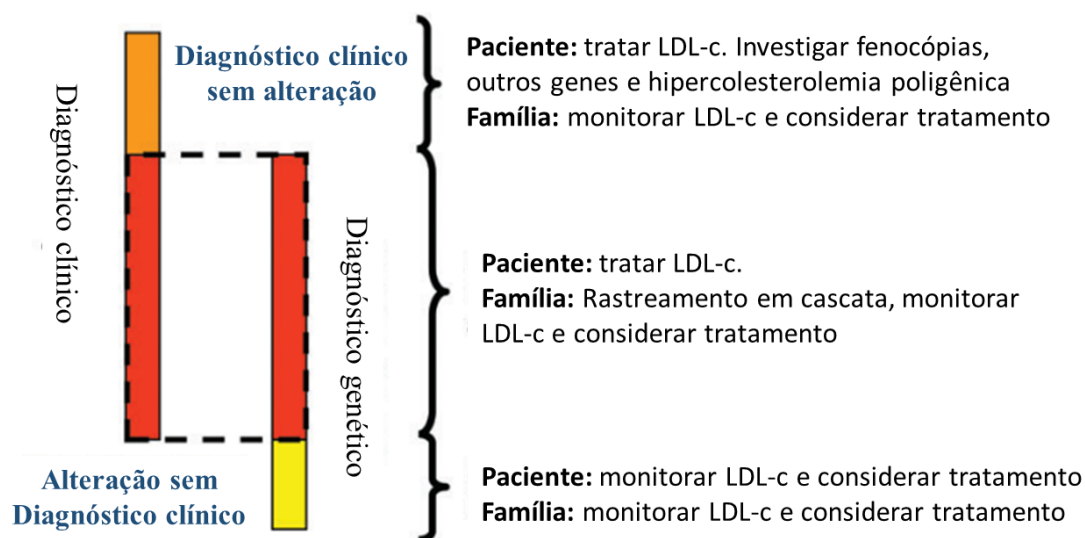


Figura 3: Sobreposição entre o diagnóstico clínico e molecular de HF. Há uma proporção na qual é encontrada alteração genética, mas o indivíduo não tem diagnóstico clínico. Por outro lado, em uma parcela dos casos, apesar do indivíduo ter

diagnóstico clínico, nenhuma alteração genética causal é identificada. Modificado de Nordestgaard et. al (2013)²¹

1.2 Hipercolesterolemia poligênica

Nos últimos anos, os estudos de associação genômica ampla (do inglês, *genome-wide association studies* ou GWAS) tornaram possível o conhecimento e o entendimento de várias regiões do genoma humano que estão associadas a diversas características complexas. A partir da análise dos genomas de milhares de indivíduos, esta técnica associa variações genéticas comuns (ou marcadores genéticos) específicos à fenótipos ou doenças específicas³⁴.

Os marcadores genéticos identificados com base na análise do GWAS podem ser usados para prever o risco de desenvolvimento de uma doença a partir da criação de escores de risco poligênico (do inglês *Polygenic Risk Score* – PRS). O PRS é uma somatória que determina o efeito cumulativo de variantes genéticas de um indivíduo em um determinado fenótipo³⁵, conforme Figura 4.

APLICAÇÕES CLÍNICAS DO PRS

Um escore de risco poligênico (PRS) é calculado a partir de várias pequenas variações genéticas.

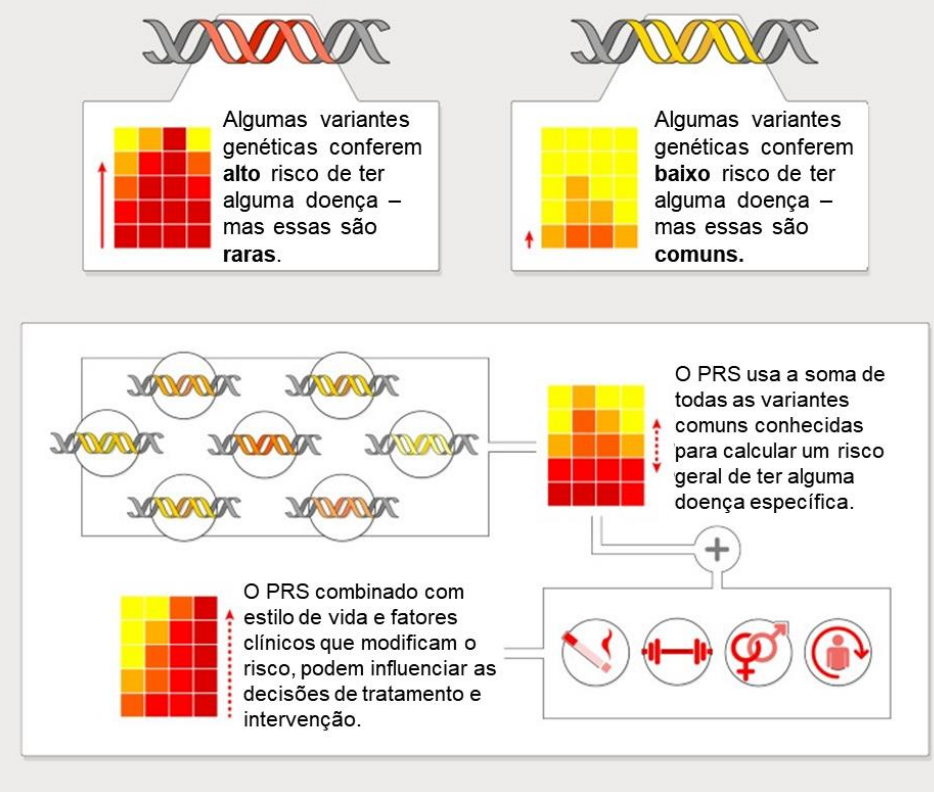


Figura 4: Fundamento do PRS. As variantes genéticas procedentes da técnica de GWAS usadas nos PRSs são comuns na maioria das populações. Modificado de Illumina (2019)³⁶

Em 2010, o grupo *Global Lipid Genetic Consortium (GLGC)*³⁷ realizou uma meta-análise de diversos GWAS em mais de 100.000 indivíduos, e identificou uma série de *loci* envolvidos na determinação da concentração de lipídios que poderiam estar envolvidos no aumento dos níveis de LDL-C e outras frações lipídicas. Esta identificação tornou possível o reconhecimento de variantes de base única (do inglês, *Single Nucleotide Variant* ou SNVs) comuns que também estão relacionados com elevação do LDL-C.

Este estudo permitiu a suposição de que indivíduos dislipidêmicos pudessem ter um componente poligênico em seu fenótipo. Supõe-se que na hipercolesterolemia poligênica, os pacientes que não possuem variante patogênica identificada, mas que possuem diagnóstico clínico de HF apresentem uma combinação específica de SNVs, cada um causando um efeito brando, mas que em conjunto elevam o LDL-C, excedendo o limiar diagnóstico de 190 mg/dL³⁸.

Para testar esta hipótese, em 2013 um grupo de cientistas britânicos³⁸ desenvolveu um PRS associado à hipercolesterolemia utilizando os SNVs evidenciados no estudo de GWAS do GLGC. Foi selecionado apenas o principal SNV de cada *locus*, e se algum estivesse relacionado a mais de uma fração lipídica, foi incluído apenas se o LDL-C fosse o traço mais fortemente associado para o SNV. Ao final da seleção, foram incluídos 12 SNVs no escore (Tabela 1). Para o cálculo, fez-se uma soma ponderada do número de alelos de risco encontrados em cada indivíduo, utilizando os β -coeficientes de cada SNV como peso para a soma.

Tabela 1: SNVs selecionados para compor o PRS.

SNV (rsID)	Gene	SNV (rsID)	Gene
rs2479409	<i>PCSK9</i>	rs3757354	<i>MYLIP</i>
rs629301	<i>CELSR2</i>	rs11220462	<i>ST3GAL4</i>
rs1367117	<i>APOB</i>	rs8017377	<i>NYNRIN</i>
rs4299376	<i>ABCG8</i>	rs6511720	<i>LDLR</i>
rs1564348	<i>SLC22A1</i>	rs429358	<i>APOE</i>
rs1800562	<i>HFE</i>	rs7412	<i>APOE</i>

O escore criado foi então aplicado em pacientes com diagnóstico clínico de HF, com e sem alteração genética identificada, e em indivíduos saudáveis de um grupo controle britânico. Foi observado que a média do PRS para o grupo controle foi a mais baixa dentre todos os grupos, enquanto o grupo com HF com diagnóstico genético teve uma média intermediária e o grupo que tinha apenas o diagnóstico clínico teve a maior média. Essa observação sugere que uma proporção do grupo com diagnóstico genético negativo pode ter o LDL-C elevado explicado pela herança de SNVs que afetam as concentrações deste colesterol. O fato de o grupo com alteração genética identificada ter ficado na posição intermediária pode indicar ainda que os altos valores de LDL-C podem ter um componente poligênico adicional³⁸.

Em um estudo complementar, Futema e colegas (2015)³⁹ demonstraram que o número de SNVs selecionados para o cálculo do PRS poderia ser diminuído de 12 para 6, sem alterar o entendimento de que a média do escore poligênico é maior para o grupo com HF que não possui variante patogênica identificada, seguido do grupo que possui variante causal conhecida. Esta é uma observação significativa, pois um escore de 6 SNVs que tem a mesma eficiência e aplicabilidade ao anterior é mais vantajoso financeiramente.

Deste modo, pacientes com fenótipo de HF, mas sem variantes patogênicas identificadas, poderiam ser investigados para hipercolesterolemia poligênica. Contudo, isto não afeta o tratamento desses pacientes, mas influencia na decisão de realizar testes em cascata em seus familiares, uma vez que esta poderia não ser tão eficaz⁴⁰.

Atualmente, a replicação desse escore poligênico já foi realizada em pelo menos 6 países europeus, em Israel e na Coréia e, em todos os estudos o escore foi significativamente correlacionado com os valores de LDL-C elevados. No entanto, a grande maioria das análises foi realizada em indivíduos europeus ou asiáticos. Até o momento, nenhum estudo mostrou a aplicabilidade de um PRS para hipercolesterolemia em populações latino-americanas^{39,41-43}.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar o cálculo de escores de risco poligênico de 12 e 6 SNVs associados ao aumento de LDL-C em uma coorte brasileira de hipercolesterolemia familiar, visando à investigação da hipercolesterolemia poligênica.

2.2 Objetivos específicos

- Validar os escores de risco poligênico previamente reportados na literatura científica em pacientes com diagnóstico clínico de HF, comparando-os com um grupo de indivíduos representativos da população brasileira.
- Investigar a influência dos escores de risco poligênico em pacientes com diagnóstico genético para HF.
- Investigar a influência dos escores na implicação clínica dos indivíduos com HF.
- Investigar e comparar a aplicabilidade dos escores para hipercolesterolemia poligênica com 12 ou 6 SNVs.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Este projeto foi submetido à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da FMUSP (CAPPesq), e aprovado dentro das normas do comitê (CAAE: 00594212.0.1001.0068).

3.2 Seleção dos participantes

3.2.1 Hipercol Brasil

Foram selecionados 684 indivíduos adultos não relacionados, participantes do Hipercol Brasil – maior programa de rastreamento genético em cascata para Hipercolesterolemia Familiar da América Latina, conduzido no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LGCM) do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas (InCor- HCFMUSP)³². Todos os participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e foram submetidos à anamnese clínica.

Foram adotados os critérios de inclusão e exclusão do programa. O principal fator de inclusão foi apresentar exame de LDL-C com valor ≥ 210 mg/dL independentemente de tratamento farmacológico. Foram excluídos os pacientes com triglicérides ≥ 400 mg/dL, insuficiência hepática, nefropatia, hipotireoidismo não controlado e sorologia positiva para HIV.

3.2.2 ELSA-Brasil

Como grupo comparativo, foram selecionados 1605 indivíduos do estudo ELSA-Brasil (Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto), coorte multicêntrica composta por indivíduos de seis instituições públicas de pesquisa de regiões do Brasil com idade entre 35 e 74 anos, que tem como objetivo investigar os fatores de risco para doenças crônicas, como as cardiovasculares e diabetes⁴⁴. Todos os integrantes da coorte ELSA-Brasil assinaram o TCLE, e foram submetidos a exames laboratoriais, genotipagens e entrevistas para avaliação de estilo de vida. Para a análise do presente estudo, foram selecionados participantes apenas da cidade de São Paulo, mesma cidade em que o Hipercol Brasil está situado. Os indivíduos foram genotipados através do Axiom™ Precision Medicine Research Array (Thermo Fisher) usando o sistema GeneTitan MultiChannel, seguindo as instruções do fabricante.

3.3 Grupo HF

Os 684 indivíduos hipercolesterolêmicos que compõe a casuística do presente estudo foram divididos de acordo com a presença ou ausência de alteração genética associada à HF. O grupo que não teve variante patogênica ou provavelmente patogênica identificada (n=491) foi classificado como HF/M- (ou seja, possui diagnóstico clínico de HF, mas não tem diagnóstico genético confirmado). Por outro lado, os indivíduos que tiveram alteração genética identificada (n=193) foram classificados como HF/M+ (diagnóstico clínico e genético confirmados para HF).

3.3.1 Sequenciamento genético

Para detecção de variantes genéticas associadas à HF e o consequente diagnóstico genético, foi realizado Sequenciamento de Nova Geração (*Next-Generation Sequencing* ou NGS), técnica que permite a análise de regiões codificantes dos genes de interesse. Este sequenciamento se deu de duas maneiras distintas: as primeiras 440 amostras foram sequenciadas utilizando a plataforma Ion Torrent PGM (Thermo Fisher), e 244 amostras utilizando a tecnologia SureSelect QXT (Agilent Technologies) na plataforma Illumina (Figura 5). Esta substituição de metodologia e painel genético se deu por questões econômicas e técnicas.

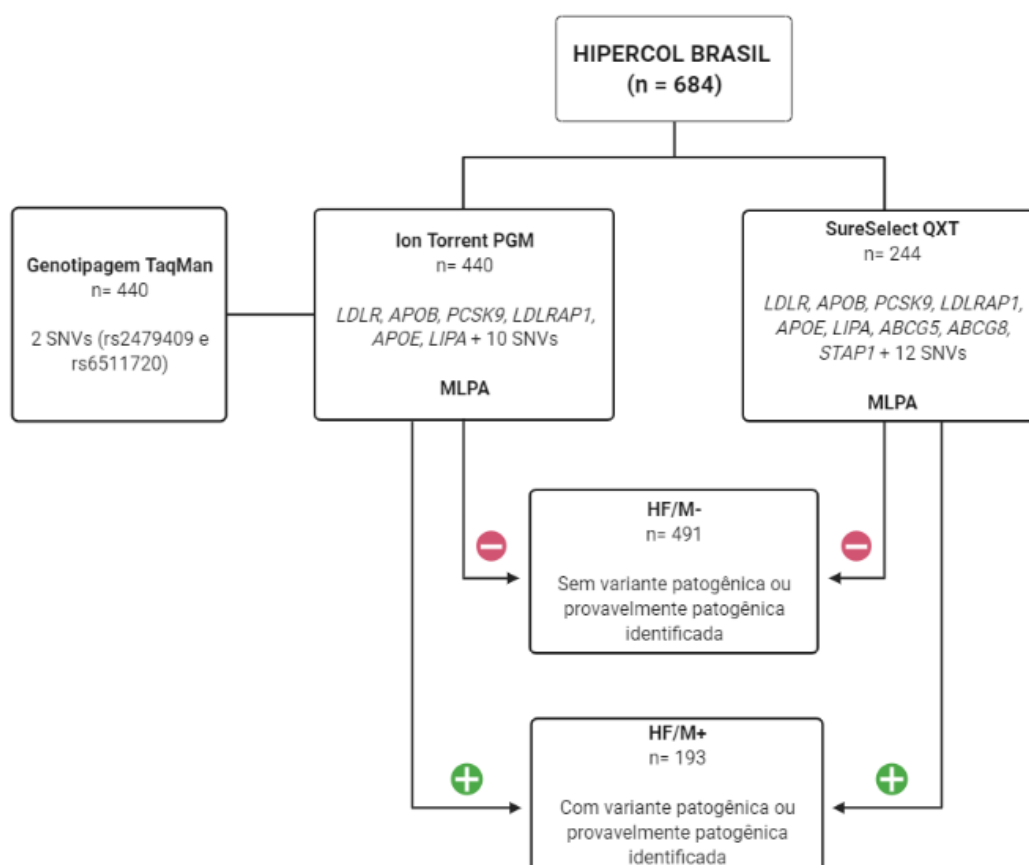


Figura 5: Fluxograma das metodologias realizadas nas amostras do grupo Hipercol Brasil. As amostras foram classificadas de acordo com a ausência ou presença de alteração genética associada à Hipercolesterolemia Familiar.

3.3.1.1.1 Ion Torrent PGM

A plataforma Ion Torrent PGM (Thermo Fisher) tem como princípio sequenciamento genético por semi-condutores, com detecção da alteração de pH. O painel customizado *Ampliseq* foi desenhado no software *ION Ampliseq Designer* (<https://www.ampliseq.com/>) e continha 6 genes de interesse (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *APOE* e *LIPA*) além de 10 variantes comuns que compõe parte dos escores deste estudo (rs629301, rs1367117, rs4299376, rs1564348, rs1800562, rs3757354, rs11220462, rs8017377, rs429358 e rs7412). O procedimento do sequenciamento foi realizado seguindo as informações do fabricante.

3.3.1.1.2 SureSelect QXT

Com o objetivo de aprimorar e atualizar o diagnóstico genético, o painel anteriormente utilizado foi substituído pela tecnologia *SureSelect QXT* (*Agilent Technologies*), com sequenciamento baseado em síntese. O painel com sonda de captura customizada foi desenhado no software *SureDesign* (www.agilent.com/genomics/suredesign) e continha 9 genes de interesse (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *LIPA*, *APOE*, *ABCG5*, *ABCG8* e *STAP1*) além das 12 variantes comuns do escore poligênico principal deste estudo. O sequenciamento também se deu seguindo as instruções do fabricante.

3.3.2 MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

Após o sequenciamento genético, nas amostras em que nenhuma alteração genética patogênica e/ou provavelmente patogênica foi encontrada, foi realizada a técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) para detecção de grandes duplicações e deleções no gene *LDLR*, não passíveis de detecção por sequenciamento de nova geração.

Nesta metodologia, um conjunto de sondas fluorescentes localizadas em regiões específicas do gene, é hibridizado com a amostra de cada indivíduo e este material é amplificado por meio de PCR. Em seguida, esta reação é preparada para ser colocada em um sequenciador capilar, que realiza a separação de fragmentos por tamanho e que capta a fluorescência emitida por eles. Na análise realizada no software *Coffalyzer (MRC-Holland)*, a intensidade de fluorescência destes fragmentos das amostras dos pacientes é comparada a três amostras controle (negativas). Desta maneira, é possível identificar a variação no número de cópias, em nível de exon, do gene de interesse.

3.3.3 Análise de variantes genéticas

As sequências geradas tanto pelo sequenciamento Ion Torrent PGM quanto pelo Illumina, incluindo os SNVs do escore poligênico, foram analisadas no software de bioinformática CLC Genomics Workbench 9.0. As sequências foram alinhadas contra o genoma humano (versão hg19), seguida de detecção e anotação de variantes genéticas para distinção de variantes comuns e raras. A cobertura para detecção das alterações genéticas foi estabelecida em no mínimo 10x, com frequência do alelo variante em pelo menos 10% das leituras.

As variantes genéticas raras encontradas foram inicialmente buscadas em bases de dados populacionais (ABraOM, GnomAD e ExAC), para averiguar a presença destas em populações saudáveis. Depois, a predição de impacto destas variantes foi avaliada por meio dos algoritmos *in silico* SIFT, PolyPhen-2 e PROVEAN, disponíveis na web. Em seguida, as variantes foram pesquisadas na literatura científica, utilizando as bases de dados Human Genome Mutation Database (HGMD®), ClinVar e JoJo Genetics.

Ao final, todas as variantes foram classificadas de acordo com os critérios e recomendações do *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG)⁴⁵. Nesta diretriz, as alterações genéticas recebem diferentes pontuações de acordo sua frequência na população geral, tipo de alteração, predição de impacto, estudos funcionais, *reports* na literatura médica, entre outros. Faz-se uma somatória destes pontos, e as variantes são então classificadas como patogênicas, provavelmente patogênicas, significado incerto, provavelmente benigna e benigna. Para este estudo foram consideradas apenas as variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas.

3.3.4 Genotipagem TaqMan

Dos 12 SNVs que compõe o escore poligênico principal, 10 foram previamente genotipados em 440 amostras por meio do sequenciamento Ion Torrent PGM. Desta maneira, foi necessário genotipar os SNVs rs2479409 e rs6511720 que não estavam no painel customizado. Para discriminação alélica destes SNVs nestas amostras, foi utilizado o ensaio *TaqMan Genotyping*. Em

linhas gerais, esta metodologia contém um par de *primers* específico para o SNV de interesse e duas sondas para identificação dos alelos. Estas sondas possuem um corante na extremidade 5' da fita de DNA que emite fluorescências distintas de acordo com o nucleotídeo pesquisado, permitindo assim a discriminação de cada alelo de interesse⁴⁶.

3.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o *software* R versão 3.61. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi realizado para avaliar a normalidade da distribuição dos dados. Uma análise descritiva inicial foi feita nos três grupos (ELSA-Brasil, HF/M- e HF/M+). Variáveis categóricas foram descritas como frequências e comparadas com o teste Qui-quadrado. Para variáveis quantitativas com distribuição não paramétrica, a mediana, o primeiro e o terceiro quartis foram estimados e a comparação foi feita com o teste U de Mann-Whitney.

A significância estatística foi considerada com um valor de $p < 0,05$.

3.5 Cálculo do escore poligênico

Os escores de risco poligênico de 12 e 6 SNVs foram calculados em cada amostra dos grupos HF (HF/M+, HF/M-) e ELSA-Brasil. Foi efetuada uma soma ponderada dos alelos de risco de cada SNV, onde os pesos utilizados são seus respectivos β -coeficientes (ou tamanho de efeito), descritos na Tabela 2. A figura 6 ilustra um exemplo de cálculo do PRS de uma amostra.

Tabela 2: Variantes comuns que compõem os escores poligênicos associados à hipercolesterolemia familiar.

SNV (rsID)	Cromossomo	Gene	Alelo de risco	β -coeficiente	6 SNVs PRS
rs2479409	1	<i>PCSK9</i>	G	2.01	
rs629301	1	<i>CELRS2</i>	T	5.65	Sim
rs1367117	2	<i>APOB</i>	A	4.05	Sim
rs4299376	2	<i>ABCG8</i>	G	2.75	Sim
rs1564348	6	<i>SLC22A1</i>	T	0.56	
rs1800562	6	<i>HFE</i>	G	2.22	
rs3757354	6	<i>MYLIP</i>	C	1.43	
rs11220462	11	<i>ST3GAL4</i>	A	1.95	
rs8017377	14	<i>NYNRIN</i>	A	1.14	
rs6511720	19	<i>LDLR</i>	G	6.99	Sim
rs429358	19	<i>APOE</i>		*	Sim
rs7412	19	<i>APOE</i>		*	Sim
$\epsilon 2\epsilon 2$	19	<i>APOE</i>		-34.75	
$\epsilon 2\epsilon 3$	19	<i>APOE</i>		-15.45	
$\epsilon 2\epsilon 4$	19	<i>APOE</i>		-7.72	
$\epsilon 3\epsilon 3$	19	<i>APOE</i>		0	
$\epsilon 3\epsilon 4$	19	<i>APOE</i>		3.86	
$\epsilon 4\epsilon 4$	19	<i>APOE</i>		7.72	

Cada SNV possui seu β -coeficiente, que foi usado como peso para soma ponderada.

*Os β -coeficientes do *APOE* foram baseados nos efeitos de cada haplótipo

(combinação das isoformas dos SNVs rs429358 e rs7412)

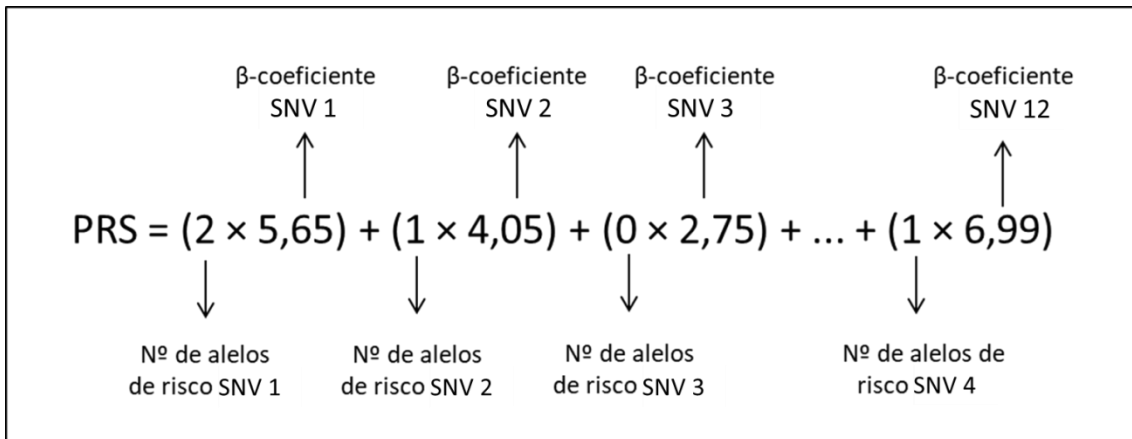


Figura 6: Cálculo do PRS. Faz-se uma soma ponderada para cada amostra, onde os pesos são os β -coeficientes de cada SNV.

Após o cálculo do PRS principal (12 SNVs) e do reduzido (6 SNVs), foram apuradas as médias de cada grupo. Como estas não possuíam distribuição normal, a comparação dos grupos foi feita utilizando o teste Kruskal Wallis, com análise *post-hoc* utilizando o teste de Dunn.

Embora os β -coeficientes utilizados para este trabalho tenham sido os originalmente descritos, nós também determinamos quais seriam os valores de β -coeficientes da população brasileira, utilizando os indivíduos do ELSA-Brasil. Da mesma maneira que a análise de GWAS realizada pelo GLGC, uma regressão linear foi construída utilizando a variável dependente LDL-C e as variáveis idade, idade² e sexo como independentes. Os resíduos deste modelo linear foram então utilizados como variável dependente para uma nova regressão, desta vez com cada SNV como variável dependente, sendo possível obter os β -coeficientes de cada variante. Esta análise foi feita apenas para fins comparativos, uma vez que o número de indivíduos utilizados é muito inferior ao utilizado no GWAS realizado pelo GLGC.

3.6 Frequência alélica dos escores poligênicos

Para verificar a frequência alélica dos SNVs presentes nos escores nos três grupos deste estudo, a frequência alélica foi calculada dividindo o número do alelo de menor frequência pelo número de alelos totais.

Para comparação, as frequências também foram verificadas nas bases de dados ABraOM (Arquivo Brasileiro Online de Mutações) e GnomAD (Genome Aggregation Database). O ABraOM é um repositório que contém variantes genômicas obtidas de sequenciamento de genoma completo de indivíduos idosos de São Paulo. O conjunto de dados utilizado para análise da frequência alélica foi o SABE-WGS-1171⁴⁷, depositado em setembro de 2020, que compreende variantes de 1.171 indivíduos não relacionados. O GnomAD é uma base de dados desenvolvida por uma coalização internacional de investigadores, com o objetivo de agregar dados de sequenciamento de exoma e genoma de uma ampla variedade de projetos de sequenciamento em larga escala. Para a análise, foi utilizada a versão v2.1.1, que compreende 125.748 exomas e 15.708 genomas, totalizando 141.456 indivíduos⁴⁸, de diferentes raças e etnias, como Europeias, Asiáticas, Latino americanas, Africanos, Judeus Ashkenazi e outras.

3.7 Associação entre os escores poligênicos e LDL-C

Testes de regressão linear simples e correlação de Spearman foram usados para avaliar a associação e correlação entre os níveis de LDL-C observados de ambos os PRSs nos indivíduos de cada grupo do estudo.

Para a análise de distribuição de LDL-C entre os PRSs, ambos os escores foram divididos em tercís. Os valores de LDL-C utilizados para esta análise foram basais (sem tratamento farmacológico), e no caso de disponibilidade somente de valores em tratamento com estatinas e/ou ezetimiba, ajustamos a concentração de LDL-C multiplicando cada valor pelo coeficiente de correção 1,43, conforme descrito anteriormente⁴⁹.

Um modelo linear ajustado para as variáveis sexo, idade, IMC e média do escore foi usado para prever os valores de LDL-C nos três grupos, para comparação com os valores de LDL-C reais observados.

3.8 Associação entre escore poligênico e raça

Para verificar se os escores se comportam da mesma maneira em diferentes raças, uma análise foi realizada nos grupos ELSA-Brasil, HF/M- e HF/M+ divididos entre brancos e não-brancos. As médias de cada grupo foram comparadas utilizando o teste Mann-Whitney.

3.9 Avaliação da resposta ao tratamento farmacológico dos indivíduos dos grupos HF

Com o objetivo de investigar a resposta ao tratamento farmacológico de acordo com os PRSs, analisamos a redução do LDL-C em indivíduos do grupo HF calculando a diferença entre o valor do LDL-C basal (sem tratamento) e o valor após o tratamento farmacológico com estatinas e/ou ezetimiba, dividido pelo valor de LDL-C basal, expressa em porcentagem.

Os valores de LDL-C basais e após tratamento de cada indivíduo foram coletados do questionário preenchido na primeira visita ao HipercolBrasil, do questionário de seguimento telefônico após pelo menos um ano da entrega do laudo genético e, quando disponível, do prontuário médico eletrônico.

Para comparação, os indivíduos dos grupos HF/M+ e HF/M- foram divididos em tercís de acordo com a média de cada PRS.

3.10 Avaliação de doença cardiovascular e escore de cálcio

Infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e isquêmico e revascularização do miocárdio foram definidos como doença cardiovascular prévia. As informações acerca destes eventos nos grupos HF também foram coletadas do questionário preenchido na primeira visita ao HipercolBrasil, do questionário de seguimento telefônico após entrega do laudo genético e do prontuário eletrônico, se disponível. Para comparar os níveis de LDL-C e a ocorrência de DCV com o valor de PRSs em cada grupo, os escores foram divididos em quartis.

O escore de cálcio, usado como marcador da aterosclerose pré-clínica, é medido de acordo com o método de Agatston⁵⁰. Resumidamente, o escore total

do CAC foi obtido pela soma dos produtos de densidade da área da lesão individual de todas as artérias coronárias epicárdicas. Esse método é confiável e reprodutível, com baixa variabilidade entre varreduras.

Os valores de escore de cálcio dos indivíduos do ELSA-Brasil foram consultados de bases de dados disponibilizadas, e dos indivíduos dos grupos HF, de prontuário médico eletrônico. Para estratificação de risco, o escore CAC foi dividido em quatro categorias diferentes: 0, 1 - 99, 100 - 400 e > 400 unidades.

Uma vez que as distribuições do escore de cálcio foram não-paramétricas e assimétricas à direita, realizamos uma regressão logística binária no grupo controle para determinar qual quartil de ambos os PRSs tinha maior risco de desenvolver DCV, usando 100 unidades como ponto de corte. A comparação do escore de cálcio entre os quartis dos PRSs não foi realizada nos grupos HF pois o número de indivíduos com CAC >100 unidades em cada quartil era reduzido.

4. RESULTADOS

4.1 Casuística

A Tabela 3 mostra as características clínicas dos participantes do grupo HF e do grupo ELSA-Brasil. Foram analisados 640 indivíduos com diagnóstico clínico de HF, divididos em dois grupos de acordo com o resultado do diagnóstico genético, e 1605 indivíduos representativos da população brasileira. Pacientes do grupo HF/M- apresentaram maior proporção de mulheres e indivíduos mais velhos quando comparados aos outros dois grupos ($p < 0,001$). Diferenças significativas também foram observadas no índice de massa corporal ($p = 0,01$) e em todos os valores laboratoriais medidos entre os grupos ($p < 0,001$). Valores de LDL-C sem tratamento hipolipemiante (basais) estavam disponíveis em 466 indivíduos dos grupos HF. Entre estes indivíduos, o grupo HF/M+ apresentou maior frequência de tratamento farmacológico na admissão quando comparados aos indivíduos do grupo HF/M- ($p = 0,004$). Houve maior frequência de IAM prévio no grupo HF/M+ ($p = 0,01$), mas não foram observadas diferenças estatísticas em relação a acidente vascular cerebral e revascularização do miocárdio.

Tabela 3: Características de todos os indivíduos incluídos no estudo.

Variáveis	ELSA-Brasil (n = 1605)	FH/M- (n = 491)	FH/M+ (n = 193)	p-valor
Idade (anos)	50 (45-57)	56 (46-63)	47 (36-58)	<0,001
Sexo Feminino, n (%)	868 (54,08)	336 (68,4)	116 (60,10)	<0,001
Raça autodeclarada				
Brancos, n (%)	959 (59,75)	274 (55,80)	115 (59,58)	0,045
Pardos, n (%)	386 (24,05)	87 (17,72)	37 (19,17)	

Pretos, n (%)	211 (13,15)	39 (7,94)	10 (5,82)	
Indígenas, n (%)	19 (1,18)	7 (1,43)	2 (1,04)	
Asiáticos, n (%)	13 (0,81)	2 (0,41)	2 (1,04)	
Não declarados, n (%)	17 (1,06)	82 (16,70)	27 (13,99)	
Histórico Médico				
IAM, n (%)	-	75 (15,27)	46 (23,83)	0,011
AVC, n (%)	-	21 (4,28)	9 (4,66)	0,988
Revascularização miocárdica, n (%)	-	25 (5,09)	17 (8,80)	0,099
Hipertensão, n (%)	515 (32,09)	216 (43,99)	55 (28,50)	<0,001
Hábito de fumo				
Fumante, n (%)	259 (16,13)	65 (13,23)	24 (12,44)	
Ex-fumante, n (%)	489 (30,47)	143 (29,12)	37 (19,17)	0,002
Nunca fumou, n (%)	857 (53,40)	276 (56,21)	130 (67,36)	
Valores laboratoriais				
Colesterol total (mg/dL)	208 (185 - 236)	323,5 (305-346)	341,5 (318-394)	<0,001
Triglicérides (mg/dL)	116 (80 - 164)	156 (114-210)	137,5 (100,5-178,2)	<0,001
HDL-C (mg/dL)	53 (46 - 63)	50 (42-59,25)	47 (39-55)	0,01
LDL-C sem hipolipemiante (mg/dL)	127 (106 - 150)	239 (223-258)	277 (244-325)	<0,001
LDL-C com hipolipemiante (mg/dL)		116,5 (94 - 142)	142 (111 - 177)	<0,001
Terapias na admissão*				
Hipolipemiantes	-	343 (71,45)	158 (82,29)	0,004
Antiplaquetários	-	128 (26,07)	60 (31,09)	0,232
Antihipertensivos	-	128 (26,07)	56 (29,01)	0,065
Exame físico				
IMC	26,7 (24,0 - 29,7)	27,3 (24,3 - 30,8)	26,7 (23,8 - 30,7)	0,015
Xantoma, n (%)	-	10 (2,04)	23 (11,92)	<0,001
Xantelasma, n (%)	-	40 (8,15)	23 (11,92)	0,261
Arco corneano, n (%)	-	5 (1,02)	5 (2,59)	0,414
Dutch Lipid Clinic Network Score (DLCNS)				
HF definitivo, n (%)	-	44 (8,96)	66 (34,20)	
HF provável, n (%)	-	162 (32,99)	75 (38,86)	<0,001
HF possível, n (%)	-	255 (51,94)	39 (20,21)	

Sem informação, n (%)

-

30 (6,11)

13 (6,73)

Abreviações: IMC – índice de massa corporal (kg/m^2); HF – Hipercolesterolemia familiar.

Variáveis contínuas com distribuição não paramétrica foram expressas como mediana e quartis 1 e 3 (Idade, Colesterol Total, Triglicérides, HDL-C, LDL-C e IMC). O teste U de Mann-Whitney foi usado para comparar as medianas entre dois grupos e o teste de Kruskal Wallis foi usado para comparação de três grupos.

Variáveis categóricas foram expressas como número absoluto e porcentagem (Sexo, Raça autodeclarada, Histórico médico, Terapias na admissão, Hábito de fumo, Xantoma, Xantelasma, Arco Corneano e DLCNS).

*Para terapia hipolipemiante, foram consideradas estatinas e ezetimiba. AAS (ácido acetilsalicílico) e clopidogrel foram considerados antiplaquetários. Inibidores da ECA, bloqueadores dos receptores da angiotensina, diuréticos e alfabloqueadores foram considerados anti-hipertensivos.

4.2 Associação entre os escores poligênicos e LDL-C

A Figura 7 mostra a correlação da variável LDL-C com os escores de 12 (painel A) e 6 SNVs (painel B). Tanto o escore principal quanto o reduzido mostraram correlação positiva com o LDL-C, com coeficiente rho 0,19 ($p < 0,001$).

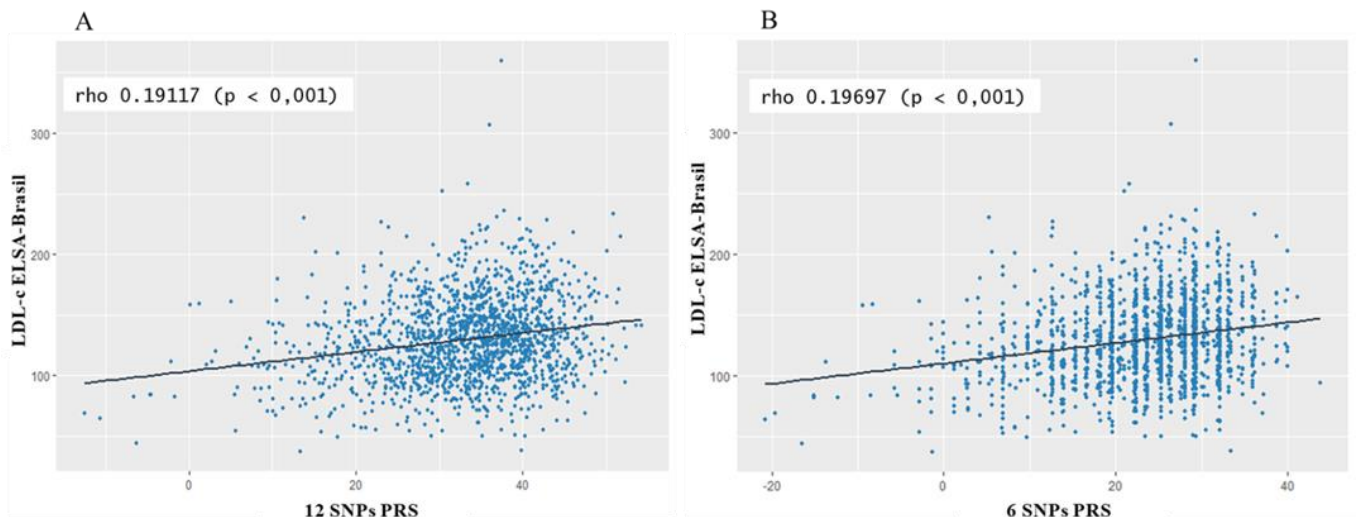


Figura 7: Representação gráfica do teste de correlação de Spearman. (A) Correlação do LDL-C com o escore principal. (B) Correlação do LDL-C com o escore reduzido.

Como resultado da regressão linear simples realizada no grupo ELSA-Brasil, ambos os escores mostraram associação significativa com os níveis de LDL-C. O escore principal teve o valor de coeficiente de determinação $R^2 = 0,044$ ($p < 2.2 \times 10^{-16}$) e o reduzido teve $R^2 = 0,046$ ($p < 2.2 \times 10^{-16}$), conforme ilustrado na Figura 8.

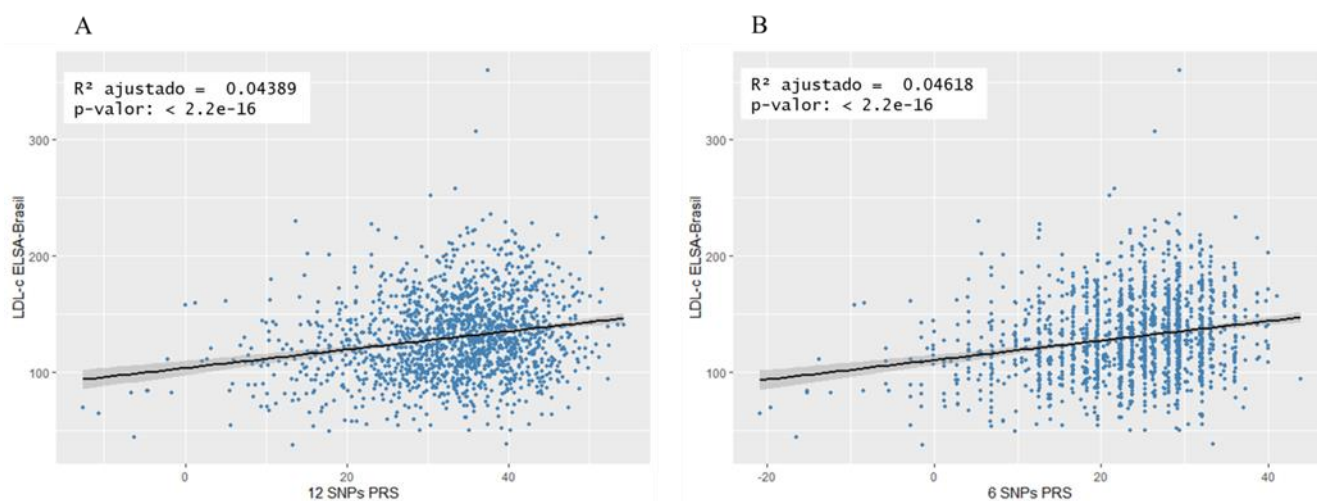
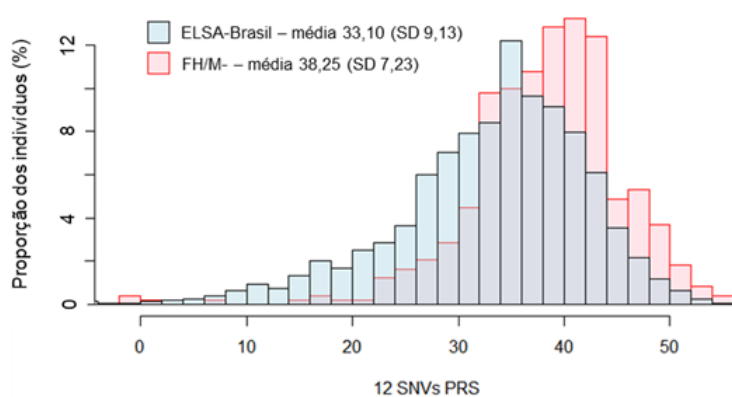


Figura 8: Testes de regressão linear entre LDL-C e escores poligênicos. (A) Regressão do LDL-C com o escore principal. (B) Regressão do LDL-C com o escore reduzido.

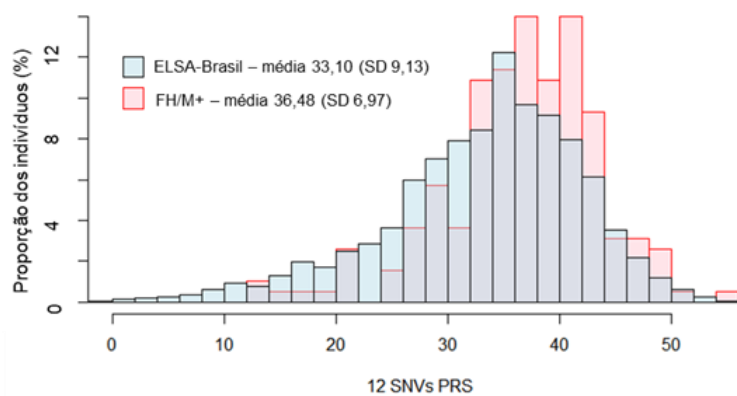
4.3 Avaliação dos escores poligênicos entre os grupos do estudo

Após o cálculo dos escores nos indivíduos dos três grupos, foi possível observar que o grupo ELSA-Brasil teve a menor média tanto no escore de 12 quanto no de 6 SNVs (33,10 e 23,03, respectivamente), seguido do grupo HF/M+ (36,48 e 26,26). Os indivíduos do HF/M- tiveram a maior média tanto no escore principal quanto no reduzido (38,25 e 27,82). As Figuras 9 e 10 representam a distribuição dos escores entre os grupos.

A. ELSA-Brasil vs. FH/M-



B. ELSA-Brasil vs. FH/M+



C. FH/M+ vs. FH/M-

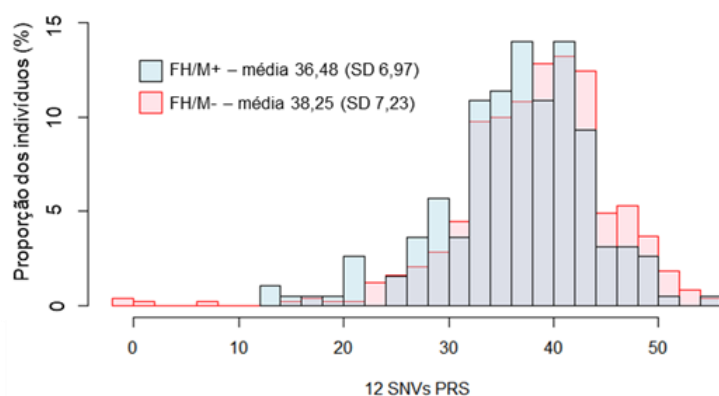
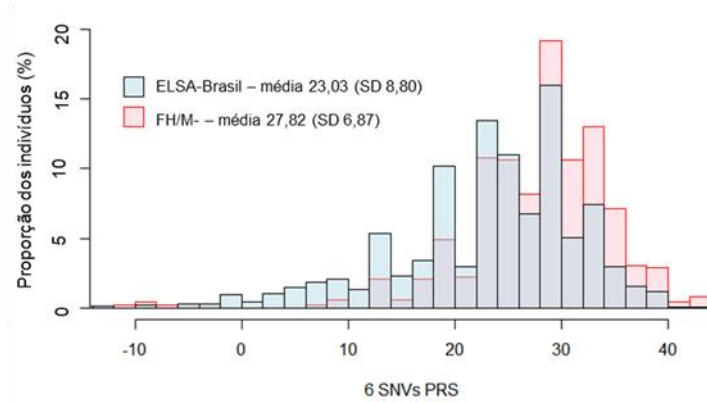
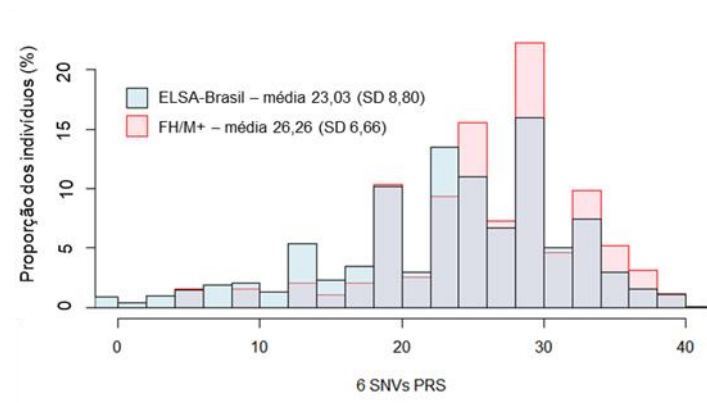


Figura 9: Distribuição do escore de 12 SNVs entre os grupos. (A) ELSA-Brasil vs. indivíduos com diagnóstico clínico de HF, porém sem alteração genética identificada (FH/M-). (B) ELSA-Brasil vs. indivíduos com diagnóstico clínico e genético de HF (FH/M+). (C) FH/M+ vs. FH/M-

A. ELSA-Brasil vs. FH/M-



B. ELSA-Brasil vs. FH/M+



C. FH/M+ vs. FH/M-

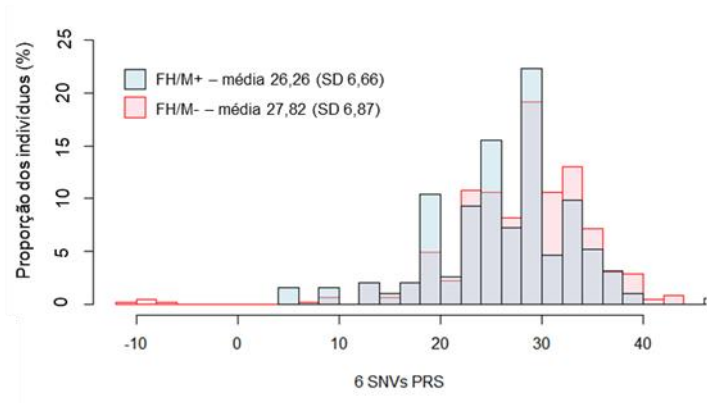


Figura 10: Distribuição do escore de 6 SNVs entre os grupos. (A) ELSA-Brasil vs. indivíduos com diagnóstico clínico de HF, porém sem alteração genética identificada (FH/M-). (B) ELSA-Brasil vs. indivíduos com diagnóstico clínico e genético de HF (FH/M+). (C) FH/M+ vs. FH/M-.

A comparação da média dos escores dos três grupos realizada por meio do teste Kruskal Wallis mostrou diferença estatística ($p < 2,2 \times 10^{-16}$), conforme a Figura 11.

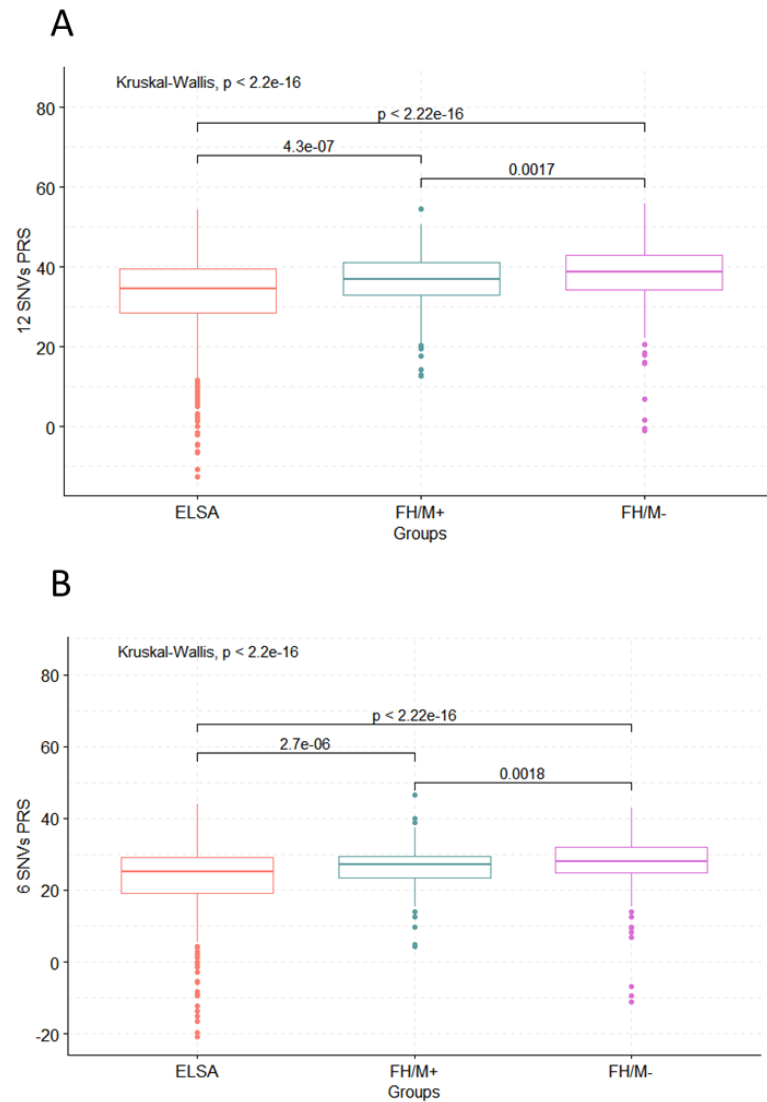


Figura 11: Resultado da comparação das médias dos escores entre os grupos por Kruskal Wallis. Tanto no escore principal (painel A) quanto no reduzido (painel B), o grupo FH/M- teve a maior média, seguido do grupo FH/M+.

O teste *post-hoc* de Dunn (comparações múltiplas) evidenciou que as médias dos escores tinham diferença estatística entre todos os grupos (Tabela 4).

Tabela 4: Resultado das comparações múltiplas utilizando o teste de Dunn.

Grupos	12 SNVs PRS		6 SNVs PRS	
	Média (DP)	p valor	Média (DP)	p valor
ELSA-Brasil vs. FH/M-	33,10 (9,13) e 38,25 (7,23)	2,2x10⁻¹⁶	23,03 (8,80) e 27,82 (6,87)	2,2x10⁻¹⁶
ELSA Brasil vs. FH/M+	33,10 (9,13) e 36,48 (6,97)	4,3x10⁻⁷	23,03 (8,80) e 26,26 (6,66)	2,7x10⁻⁶
FH/M- vs. FH/M+	38,25 (7,23) e 36,48 (6,97)	0,001	27,82 (6,87) e 26,26 (6,66)	0,012

4.4 Análise dos valores preditos de LDL-C pelos escores poligênicos

Após as análises de regressão linear múltipla ajustada com sexo, idade, IMC e o valor final dos escores, obtivemos os coeficientes e os valores de LDL-C preditos pelo modelo. Desta maneira, foi possível comparar os valores reais observados com os valores preditos. Para isto, os resultados dos escores foram estratificados em decis, para que se pudesse avaliar a distribuição dos valores de LDL-C dos indivíduos em cada nível.

Foi possível observar que nos indivíduos do ELSA-Brasil (Figura 12), o LDL-C predito aumenta gradativamente, acompanhando ao aumento dos escores, enquanto o LDL-C real acompanha os escores somente nos primeiros decis, tornando-se impreciso no decis mais altos.

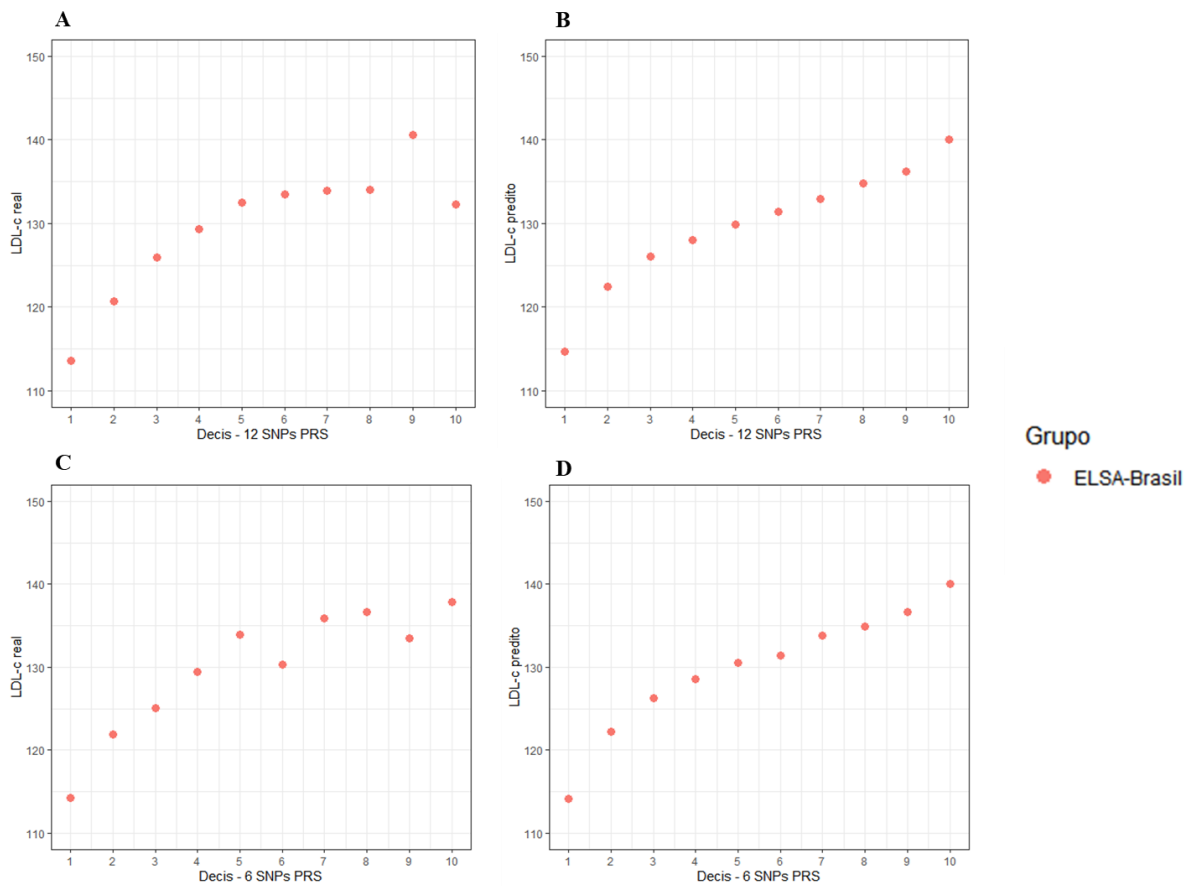


Figura 12: Distribuição dos valores de LDL-C entre os diferentes decis dos escores do grupo ELSA-Brasil. (A) LDL-C real observados distribuídos entre os decis do escore principal. (B) LDL-C preditos pelo modelo linear distribuídos entre os decis do escore principal. (C) LDL-C real observados distribuídos entre os decis do escore reduzido. (D) LDL-C preditos distribuídos entre os decis do escore reduzido.

Entretanto, este mesmo padrão não foi observado nos grupos HF. Tanto o LDL-C real quanto o predito não tiveram distribuição gradual entres os decis dos escores, conforme Figura 13.

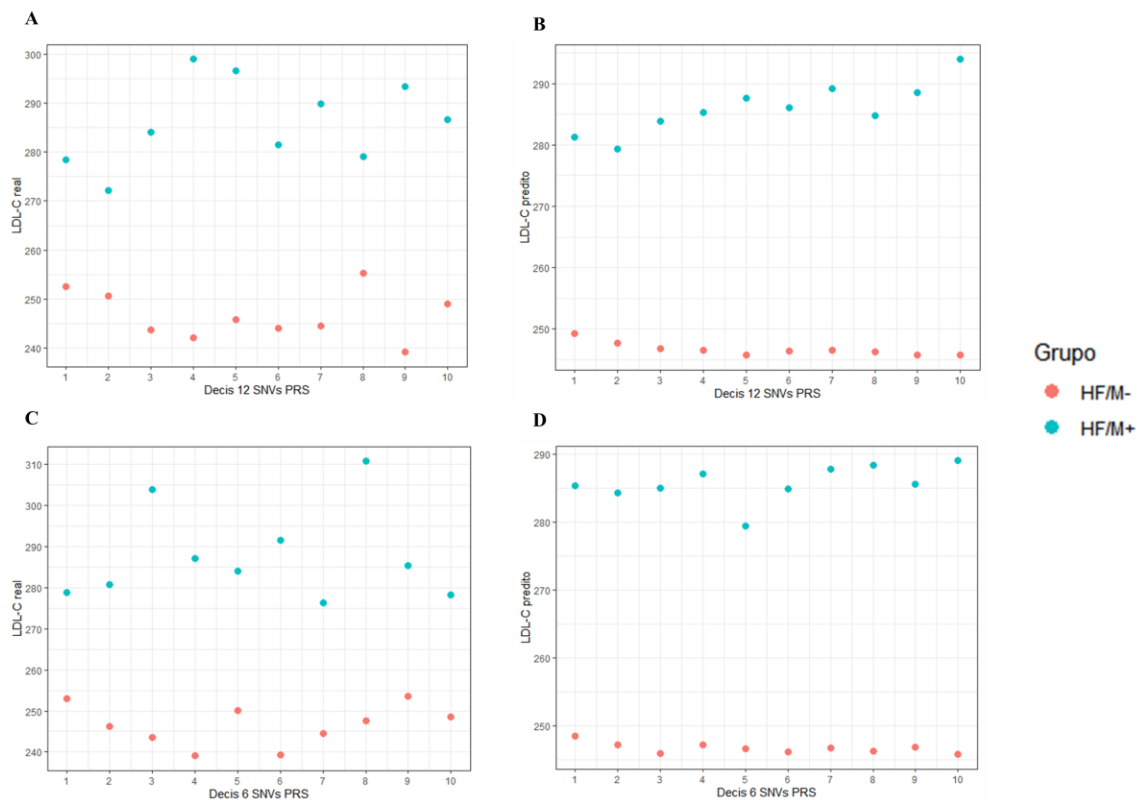


Figura 13: Distribuição dos valores de LDL-C entre os diferentes decis dos escores dos grupos dislipidêmicos. (A) LDL-C real observados distribuídos entre os decis do escore principal. (B) LDL-C preditos pelo modelo linear distribuídos entre os decis do escore principal. (C) LDL-C real observados distribuídos entre os decis do escore reduzido. (D) LDL-C preditos distribuídos entre os decis do escore reduzido.

4.5 Análise da frequência alélica dos escores poligênicos

A frequência do alelo menor (do inglês, *Minor Allele Frequency* ou MAF), ou seja, a frequência na qual o alelo menos comum ocorre em uma determinada população, foi calculada nos grupos ELSA-Brasil e HF. A Tabela 5 mostra os resultados deste cálculo, bem como as MAFs das bases de dados ABraOM e GnomAD.

Tabela 5: MAFs dos SNVs presentes no PRS em diferentes populações.

SNV	Gene	Alelo menor	Alelo comum	ABraOM (n = 1171)	GnomAD (n = 141456)	ELSA-Brasil (n = 1605)	FH/M+ (n = 172)	FH/M- (n = 468)
rs2479409	<i>PCSK9</i>	G*	A	0.396	0.344	0.358	0.384	0.378
rs629301	<i>CELRS2</i>	G	T*	0.251	0.249	0.244	0.200	0.190
rs1367117	<i>APOB</i>	A*	G	0.255	0.256	0.241	0.290	0.298
rs4299376	<i>ABCG8</i>	G*	T	0.271	0.243	0.271	0.300	0.295
rs1564348	<i>SLC22A1</i>	C	T*	0.142	0.138	0.163	0.174	0.166
rs1800562	<i>HFE</i>	A	G*	0.020	0.034	0.020	0.023	0.011
rs3757354	<i>MYLIP</i>	T	C*	0.219	0.283	0.246	0.277	0.230
rs11220462	<i>ST3GAL4</i>	A*	G	0.103	0.131	0.101	0.109	0.116
rs8017377	<i>NYNRIN</i>	A*	G	0.342	0.363	0.348	0.390	0.361
rs6511720	<i>LDLR</i>	T	G*	0.125	0.111	0.134	0.126	0.065
rs429358	<i>APOE</i>	C	T	0.130	0.142	0.139	0.142	0.222
rs7412	<i>APOE</i>	T	C	0.062	0.065	0.070	0.022	0.023

MAF: *Minor Allele Frequency*. *Alelo de risco utilizado para cálculo dos PRSs

4.6 Análise dos escores poligênicos entre raças

Como foi observada diferença estatística em relação à raça entre os grupos, e para que se pudesse conduzir uma análise comparativa das médias dos escores entre raças, os indivíduos do estudo foram divididos entre brancos e não-brancos. Os resultados das médias de cada escore estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Análise comparativa dos escores entre as raças dos indivíduos

Raça	Grupo	12 SNVs PRS		6 SNVs PRS	
		Média (DP)	<i>p</i> valor	Média (DP)	<i>p</i> valor
Não-brancos	ELSA-Brasil (n = 629)	31,56 (9,31)	< 0,001	21,91 (8,96)	< 0,001
	HF (n = 186)	37,61 (7,43)		27,32 (6,94)	
Branços	ELSA-Brasil (n = 959)	34,10 (8,9)	< 0,001	23,76 (8,65)	< 0,001
	HF (n = 389)	38,01 (6,82)		27,56 (6,49)	

Após a realização de teste de Mann-Whitney, foi possível observar que a raça não influencia diretamente nos escores. Assim como na análise geral, sem distinção de raça, tanto os indivíduos brancos quanto não-brancos do grupo HF possuíam maior média dos escores quando comparados ao grupo ELSA-Brasil ($p < 0,001$), conforme Figura 14.

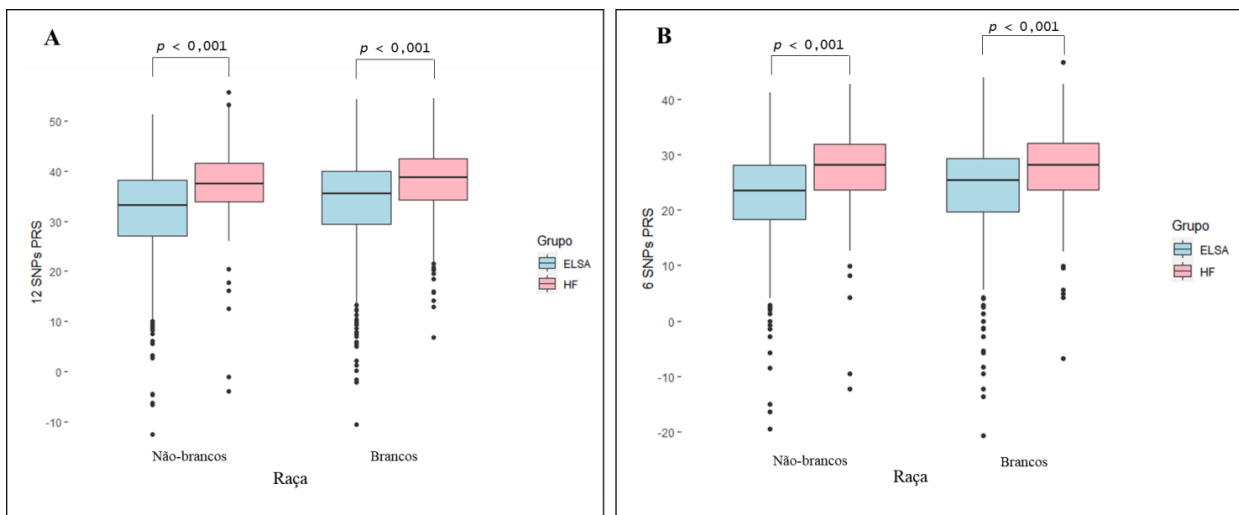


Figura 14: Análise raça-específica da distribuição dos escores entre os indivíduos brancos e não-brancos dos grupos ELSA-Brasil e HF. (A) Escore de 12 SNVs (B) Escore de 6 SNVs.

Contudo, também foi observado que no grupo ELSA-Brasil a média dos escores foi maior para os indivíduos que se autodeclaravam brancos, quando comparados aos não brancos.

4.7 Análise comparativa entre β -coeficientes GLGC e ELSA-Brasil

Os resultados das análises de regressão linear para verificação dos β -coeficientes no grupo ELSA-Brasil e sua comparação com os originalmente descritos pelo GLGC estão na tabela 11. Foi possível observar que dos 12 SNVs presentes no escore principal, o SNV rs1564348 e a isoforma $\epsilon 4\epsilon 4$ do *APOE* possuem sentidos opostos quando comparados aos originais.

Tabela 7: Comparativo dos β -coeficientes (Original GLGC e ELSA-Brasil).

SNP	Gene	Alelo Menor	Alelo Comum	β -coeficiente GLGC (mg/dL)	β -coeficiente ELSA-Brasil (mg/dL)
rs2479409	<i>PCSK9</i>	G	A	2.01	0.287
rs629301*	<i>CELSR2</i>	G	T	5.65	5.271
rs1367117*	<i>APOB</i>	A	G	4.05	3.028
rs4299376*	<i>ABCG8</i>	G	T	2.75	2.779
rs1564348	<i>SLC22A1</i>	C	T	0.56	-4.670
rs1800562	<i>HFE</i>	A	G	2.22	5.715
rs3757354	<i>MYLIP</i>	T	C	1.43	1.904
rs11220462	<i>ST3GAL4</i>	A	G	1.95	2.951
rs8017377	<i>NYNRIN</i>	A	G	1.14	0.129
rs6511720*	<i>LDLR</i>	T	G	6.99	5.328
rs429358*	<i>APOE</i>	C	T	-	-
rs7412*	<i>APOE</i>	T	C	-	-

ε2ε2	<i>APOE</i>	-34.75	-25.47
ε2ε3	<i>APOE</i>	-15.45	-17.58
ε2ε4	<i>APOE</i>	-7.72	-3.43
ε3ε3	<i>APOE</i>	0	0
ε3ε4	<i>APOE</i>	3.86	4.06
ε4ε4	<i>APOE</i>	7.72	-2.50

*SNVs presentes no escore de reduzido.

4.8 Resposta ao tratamento farmacológico dos indivíduos dos grupos HF

Do total de indivíduos do grupo HF/M-, 226 (46,02%) apresentavam valores de LDL-C pré e pós-tratamento farmacológico, com valor médio de LDL-C com tratamento de 121 mg/dL. Da mesma forma, 89 pacientes do grupo positivo (46,11%) apresentaram valores de LDL-C nestes dois momentos, com média de LDL-C de 145 mg/dL após o tratamento. Investigamos se a redução percentual do LDL-C dependia dos valores dos PRSs, mas não foi observada diferença significativa na redução do LDL-C entre os tercís de cada escore em ambos os grupos (Figura 15).

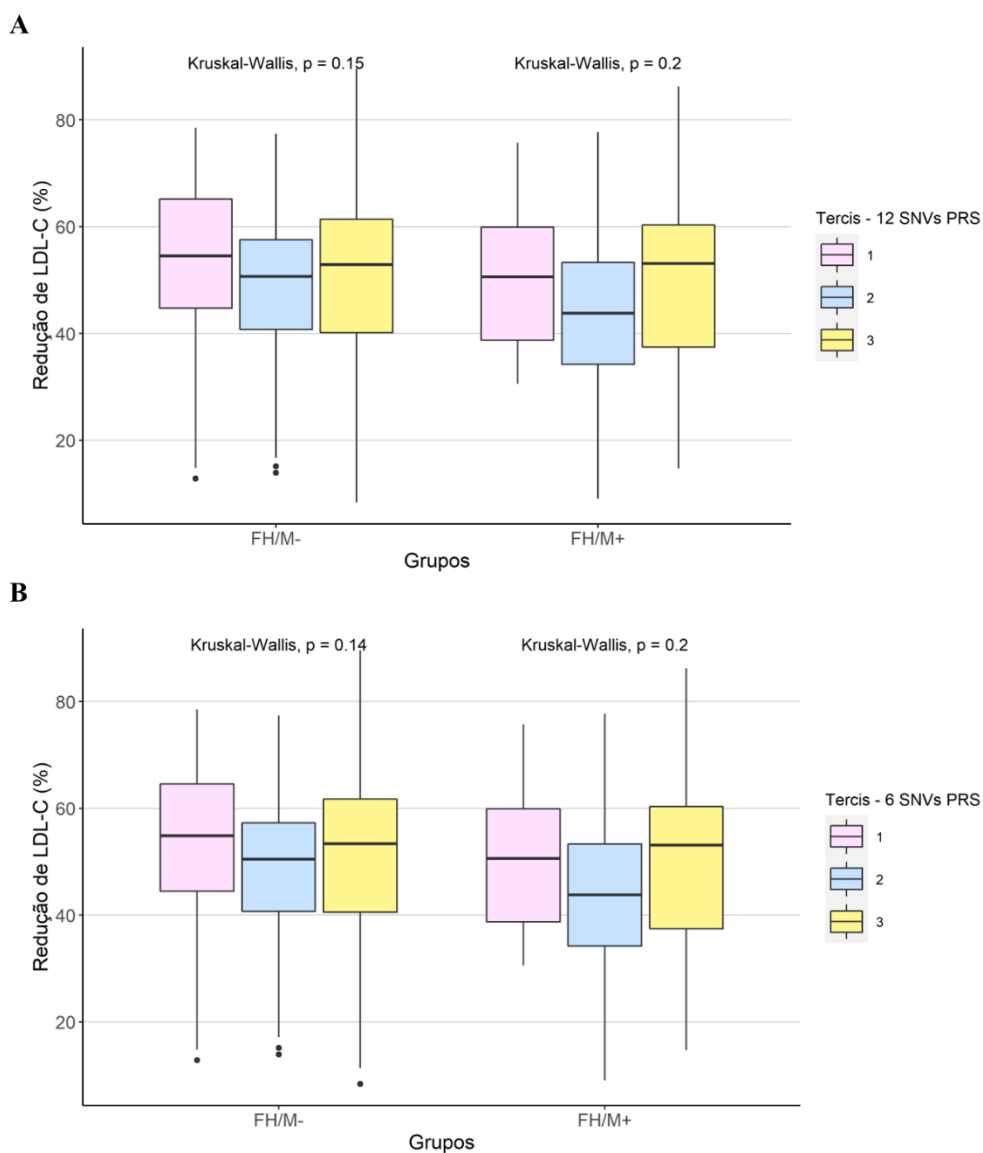


Figura 15: Percentual de redução de LDL-C após terapia hipolipemiante com estatinas e/ou ezetimibe, de acordo com os tercís de cada escore. (A) 12 SNVs PRS (B) 6 SNVs PRS

4.9 Associação dos PRSs com aterosclerose pré-clínica e doença cardiovascular

Informações sobre escore de cálcio estavam disponíveis em 1497 indivíduos do grupo ELSA-Brasil, em 81 indivíduos do grupo FH/M- e em 32 do

grupo HF/M+. Escore de cálcio zero foi observado em mais de 70% dos indivíduos do grupo controle, enquanto nos grupos HF esta frequência foi inferior a 50%. Níveis moderados e graves de escore de cálcio (>100 e >400, respectivamente) foram detectados em 37% dos pacientes do grupo HF/M+ e em cerca de 17% no grupo HF/M- (Figura 16).

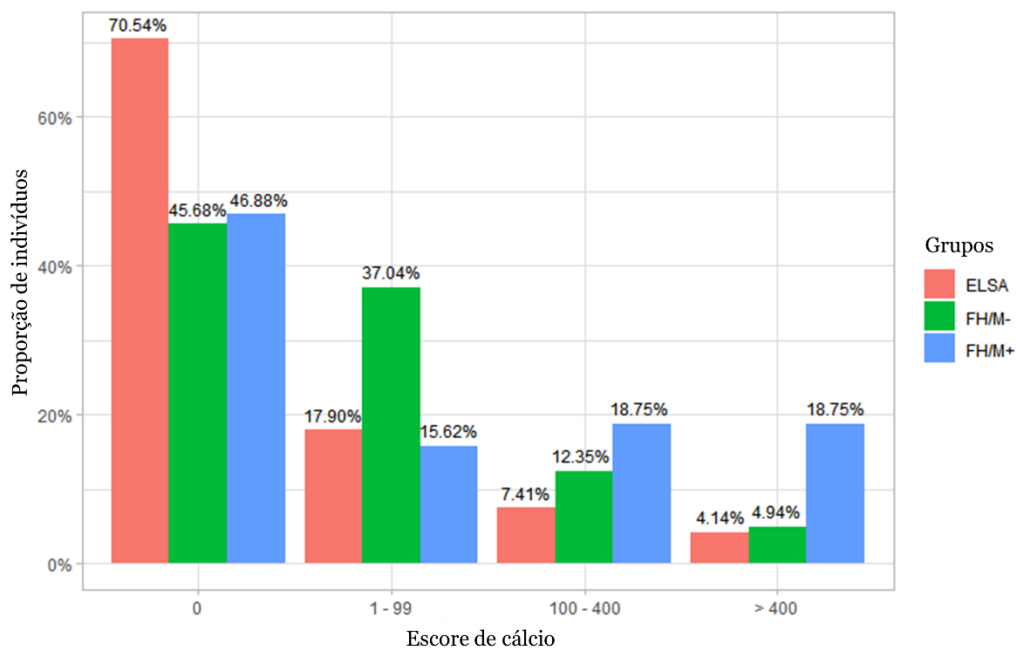


Figura 16: Porcentagem de indivíduos de cada grupo de acordo com os níveis de escore de cálcio

Os resultados da regressão logística binária ajustada no grupo ELSA-Brasil demonstraram que a razão de chances (OR) de escore de cálcio >100 unidades foi de 1,7 (IC 95%: 1,01 - 2,88, $p = 0,04$) para os indivíduos no quartil mais alto do escore de 12 SNVs quando comparados ao primeiro quartil (Tabela 8). Entretanto, não foi observada diferença significativa em relação aos quartis do escore de 6 SNVs (Tabela 9).

Tabela 8: Razão de chances de cada quartil do escore de 12 SNVs de escore de cálcio > 100 unidades nos indivíduos do grupo ELSA-Brasil após ajuste para idade e sexo

Variáveis	OR	95% IC	p-valor
Quartis			
1	Ref	-	-
2	1,45	0,85 – 2,48	0,2
3	1,27	0,75 – 2,17	0,4
4	1,70	1,01 – 2,88	0,047
Idade	1,14	1,12 – 1,17	< 0,001
Sexo			
Feminino	Ref	-	-
Masculino	6,00	4,03 – 9,13	< 0,001

OR: *Odds Ratio* (razão de chances); IC: Intervalo de confiança

Tabela 9: Razão de chances de cada quartil do escore de 6 SNVs de escore de cálcio > 100 unidades nos indivíduos do grupo ELSA-Brasil após ajuste para idade e sexo

Variáveis	OR	95% IC	p-valor
Quartis			
1	Ref	-	-
2	1,32	0,77 – 2,26	0,3
3	1,51	0,91 – 2,53	0,12
4	1,48	0,88 – 2,51	0,14
Idade	1,14	1,12 – 1,17	< 0,001
Sexo			
Feminino	Ref	-	-
Masculino	5,96	4,00 – 9,07	< 0,001

OR: *Odds Ratio* (razão de chances); IC: Intervalo de confiança

Em relação à doença cardiovascular, houve maior ocorrência de DCV no grupo HF/M+ do que no grupo HF/M- (28,50% e 19,35%, respectivamente, $p = 0,012$). Após ajuste para sexo, idade, hipertensão e tabagismo, os indivíduos do grupo HF/M+ apresentaram OR geral de 2,64 (IC 95%: 1,66 – 4,23, $p < 0,001$) de ter doença cardiovascular quando comparados aos indivíduos HF/M-. No entanto, na análise estratificada entre os quartis de ambos os PRSs, não foi observada diferença estatística em relação a razão de chances de

manifestação de doença cardiovascular (Tabelas 10 e 11). Também não houve diferença significativa na frequência de eventos cardiovasculares entre os grupos HF nos quartis de ambos os escores (12 SNVs PRS: $p= 0,61$; 6 SVPs PRS: $p= 0,40$).

Tabela 10: Razão de chances de cada quartil do escore de 12 SNVs de manifestação de doença cardiovascular nos indivíduos dos grupos HF após ajuste para idade, sexo e grupo

Variáveis	OR	95% IC'	p-valor
Quartis			
1	Ref	-	-
2	4,33	0,53 – 94,4	0,2
3	2,22	0,28 – 47,1	0,5
4	3,13	0,41 – 65,9	0,3
Idade	1,06	1,02 – 1,10	0,003
Sexo			
Feminino	Ref		
Masculino	0,53	0,18 – 1,43	0,2
Grupo			
HF/M-	Ref		
HF/M+	2,56	0,97 – 7,00	0,059

OR: *Odds Ratio* (razão de chances); IC: Intervalo de confiança

Tabela 11: Razão de chances de cada quartil do escore de 6 SNVs de manifestação de doença cardiovascular nos indivíduos dos grupos HF após ajuste para idade, sexo e grupo

Variáveis	OR	95% IC	p-valor
Quartis			
1	Ref	-	-
2	1,58	0,26 – 13,3	0,6
3	0,92	0,15 – 7,60	0,9
4	1,97	0,37 – 15,4	0,5
Idade	1,06	1,02 – 1,11	0,002
Sexo			
Feminino	Ref		
Masculino	0,48	0,16 – 1,27	0,2
Grupo			
HF/M-	Ref		
HF/M+	2,61	0,98 – 7,20	0,058

OR: *Odds Ratio* (razão de chances); IC: Intervalo de confiança

5. DISCUSSÃO

A HF, uma das doenças monogênicas mais comuns, apresenta-se como um problema de saúde mundial, uma vez que apenas uma pequena parcela dos afetados possui diagnóstico, e um número limitado destes recebe algum tipo tratamento. A identificação precoce de indivíduos de risco permite mudanças no estilo de vida, incluindo intervenção dietética e tratamento medicamentoso, melhorando a expectativa de vida e o prognóstico destes pacientes⁵¹.

Em muitos casos, indivíduos são clinicamente diagnosticados com HF, mas não possuem variante genética causal detectada. Escores de risco vêm sendo amplamente utilizados para prever ou estratificar o risco de certas doenças. A presença de polimorfismos associados que elevariam o LDL-C e a consequente detecção da hipercolesterolemia poligênica, poderia explicar a discrepância entre a porcentagem de indivíduos que apresentam diagnóstico molecular e indivíduos que possuem apenas o diagnóstico clínico³⁸.

O presente estudo visa calcular e validar o escore de risco poligênico reportado na literatura científica em pacientes com diagnóstico de HF, comparando-os com um grupo de indivíduos representativos da população brasileira, pois embora o PRS tenha sido replicado em outros países, o papel do mesmo ainda não havia sido avaliado em uma população latino-americana.

5.1 Características clínicas da casuística

Foram analisados 491 indivíduos com diagnóstico clínico, mas sem variante genética rara associada à HF e 193 indivíduos com diagnóstico clínico e genético para HF, todos integrantes da coorte Hipercol Brasil. Também fizeram parte da análise 1605 indivíduos do ELSA-Brasil, grupo que foi analisado como representação da população brasileira.

Os pacientes do grupo FH/M+ tiveram os valores de CT e LDL-C mais elevados do que os do grupo FH/M-, devido à presença de alteração genética que torna a captação de LDL-C defeituosa. Por outro lado, os níveis de HDL-C e triglicérides estavam mais elevados no grupo que não teve variante genética identificada, padrões que de fato não são característicos da fisiopatologia da HF. Os integrantes do grupo ELSA-Brasil tiveram as médias de seus exames laboratoriais dentro dos valores de referência.

Como resultado do acúmulo de LDL-C, proporcionalmente, mais indivíduos do grupo HF/M+ tiveram ocorrência de IAM. Entretanto, não houve diferença na frequência de AVC e revascularização.

5.2 Associação dos escores de risco poligênico com LDL-C

Através da análise de correlação de Spearman e de regressão linear nos 1605 indivíduos da coorte ELSA-Brasil, foi observada uma relação e associação mútua entre os escores e os valores de LDL-C. Entretanto, as correlações e associações foram modestas. O coeficiente de determinação R^2 da regressão linear mostrou que os modelos foram capazes de explicar pouco mais de 4% da variabilidade do LDL-C. Este resultado é maior do que o observado em pacientes de uma coorte Coreana, onde o modelo de regressão

explicou somente 1% de variabilidade⁴¹. Por outro lado, na coorte britânica onde o PRS de 12 SNVs foi validado, o modelo de regressão linear ajustado justificou 11% da variação dos valores de LDL-C³⁸. Estas disparidades entre diferentes etnias podem demonstrar que talvez o conjunto de 12 ou 6 SNVs isoladamente não seja suficiente para explicar a variabilidade do LDL-C, devido à variedade nas frequências alélicas entre diferentes populações. No entanto, não observamos grandes diferenças nos valores de frequência alélica entre nossa população e outras verificadas. Também é interessante notar que para a maioria, mas não todos, os marcadores utilizados em nosso escore, os coeficientes de regressão observados com relação ao LDL são bem similares aos descritos originalmente na coorte europeia (ver discussão a seguir).

É necessário também avaliar a necessidade de desenvolver PRSs mais precisos, usando diferentes conjuntos de SNVs. Wu et al⁵². desenvolveram um PRS com 8367 SNVs que foi capaz de explicar 21% da variabilidade do LDL-C em uma população caucasiana britânica. No entanto, além do número de SNVs ser muito elevado e, portanto, menos viável de ser implantado, ao validar o escore em indivíduos não caucasianos, o desempenho preditivo do escore diminuiu, sugerindo que os PRSs devem ser calibrados quando aplicados a diferentes raças.

As análises de predição dos valores de LDL-C apontam a imprecisão do aumento do LDL-C real observado do grupo ELSA-Brasil quando comparada ao aumento gradativo do LDL-C predito entre os decis em ambos os escores, o que corrobora com a concepção de que uma calibração destes escores pode ser necessária. Embora tenhamos usado os β -coeficientes originalmente descritos, na determinação dos coeficientes utilizando o grupo ELSA-Brasil

foram observadas pequenas diferenças entre os β -coeficientes, que podem ter consequências na aplicabilidade dos escores, causando inconsistência entre os valores de LDL-C reais e preditos.

Nos grupos HF, nem os valores de LDL-C reais nem os preditos tiveram distribuição correlacionada com os decis dos escores. Esta observação demonstra que nestes indivíduos ainda há um efeito residual presente, que deve ser investigado.

Não observamos diferença da distribuição do LDL-C entre os tercis de ambos os escores nos indivíduos dos grupos HF, mas apenas na população do ELSA-Brasil. Ao contrário do presente estudo, a maioria das pesquisas que avaliam a aplicabilidade desses escores utiliza coortes com fenótipo de HF mais brando, com critérios de inclusão de LDL-C em torno de 190 mg/dL ou seguindo os critérios DLNC ou Simon Broome^{38,39,53}. O critério de inclusão mais rígido do Hipercol Brasil de LDL-C >210 mg/dL pode ter limitado a associação do LDL-C com o escore, ao contrário da literatura atual. Também é importante destacar que uma parcela dos pacientes destes grupos estava sob uso de diferentes drogas hipolipemiantes. Além de cada indivíduo responder de uma maneira aos medicamentos, é possível que as variantes presentes nos escores possam influenciar esta resposta, o que afeta diretamente os valores de LDL-C. Portanto, além da necessidade de calibração dos escores, também pode ser necessário analisar com mais profundidade os efeitos do uso de medicamentos na associação do LDL-C com os escores.

5.3 Associação dos escores de risco poligênico com raça

Conforme posto por Vrabilik e colegas (2020)⁵⁴, o impacto dos SNVs associados às características lipídicas detectados por GWAS pode diferir significativamente em diferentes populações. Variantes idênticas podem ter efeitos diferentes sobre as frações lipídicas e podem diferir entre diferentes etnias, e há pouca informação sobre os perfis lipídicos de populações mistas. Entretanto, sabe-se que no Brasil a HF afeta mais pessoas pardas e negras do que brancas⁴.

Através da análise dos escores nos indivíduos divididos entre brancos e não brancos, foi observado que mesmo nesta sub-divisão, os integrantes do grupo HF tem escore mais alto quando comparados ao grupo ELSA-Brasil. Esta observação demonstra que qualquer que seja a raça, se o indivíduo tem o valor do escore mais elevado, há mais risco deste indivíduo ser dislipidêmico.

É importante destacar também que não houve grandes diferenças entre as frequências alélicas dos SNVs nas diferentes populações pesquisadas (significância estatística não calculada). Isto pode indicar que nenhum dos SNVs utilizados no escore é raro na nossa população ou vice-versa. Entretanto, as frequências analisadas foram globais, e talvez uma sub-análise entre as diferentes raças e etnias seja mais apropriada. Neste aspecto, por exemplo, estudo conduzido por Gratton⁵⁵ e colegas indicou que o escore de 12 SNVs teve melhor desempenho em indivíduos com ascendência branca e negros/caribenhos do Reino Unido do que indivíduos asiáticos e propuseram a hipótese da adoção de um valor de corte decil étnico-específico do que geral.

5.4 Distribuição dos escores poligênicos entre os grupos

Houve diferenças significativas entre o valor dos escores entre os três grupos analisados. Foi observado que, em ambos os escores, a média do valor do PRS foi maior no grupo HF/M-, evidenciando que os valores de LDL-C elevados de alguns indivíduos podem ter causa poligênica, ao invés de monogênica. O grupo HF/M+ teve os valores dos escores intermediários, sugerindo que até mesmo nos pacientes que tem alteração genética patogênica ou provavelmente patogênica associada à HF identificada, o LDL-C pode ter componente poligênico adicional. Estes achados vão ao encontro com o observado em pelo menos 6 países da Europa, Canadá, Coreia e Israel, locais onde foram replicados os escores^{39,41,43}. Apesar do grupo ELSA-Brasil ter a menor média de ambos os escores dentre os grupos, como o ELSA-Brasil é uma coorte que representa a população brasileira, e a frequência estimada da HF no Brasil é de 1 a cada 263 indivíduos, espera-se que haja cerca de 6 indivíduos com HF não diagnosticados dentre os 1605 analisados, o que pode ter elevado modestamente a média dos escores.

5.5 Resposta ao tratamento farmacológico dos indivíduos dos grupos HF

Ao investigar se a eficiência da terapia hipolipemiante estava associada à diferentes níveis de ambos os PRSs, não observamos nenhuma correlação entre a redução do LDL-C com o tratamento e os PRSs, independentemente da presença ou ausência de variante genética patogênica ou do valor basal do LDL-C. Entretanto, dados da literatura científica não corroboram com este achado. Mickiewicz et al.⁵⁶ mostraram que indivíduos com dislipidemia poligênica tiveram melhor resposta a baixas doses de estatina do que

indivíduos com dislipidemia monogênica. Isso reforça a hipótese da necessidade de calibração dos escores quando aplicados a outras populações. Porém, informações sobre tipo, dosagem e duração do tratamento farmacológico não foram avaliadas no presente estudo. Além disso, a presença e o tipo de variante genética influenciam diretamente na redução do LDL-C, uma vez que indivíduos sem alteração genética identificada tem maior resposta às estatinas^{57,58}.

5.6 Associação dos PRSs com aterosclerose pré-clínica e doença cardiovascular

Muitos estudos mostram que o escore CAC igual a zero indica baixo risco de DCV, enquanto o escore de cálcio >100 está associado a um aumento significativo na taxa de eventos mesmo em populações com HF, sendo um bom substituto da gravidade da aterosclerose pré-clínica^{59,60}. No presente estudo, mostramos que indivíduos da população geral no 4º quartil do 12 SNVs PRS tiveram 74% a mais de chance de ter escore de cálcio >100 e, conseqüentemente, maior chance de eventos clínicos ateroscleróticos. No entanto, os dados de CAC não estavam disponíveis para todos os indivíduos do grupo HF, sendo, portanto, uma limitação na presente análise.

O risco de desenvolvimento de aterosclerose e de DCV é proporcional à exposição prolongada a valores elevados de LDL-C e à presença de variação genética patogênica, como demonstrado anteriormente por nosso grupo e outros⁶¹⁻⁶³. Como o grupo HF/M+ apresentou uma média de LDL-C mais alta e conseqüente exposição cumulativa mais elevada, também poderíamos esperar que esse grupo tivesse uma frequência maior de DCV do que o HF/M-, como

observado neste estudo. Trinder et. al⁵³ apontaram que indivíduos que tinham apenas escore de risco poligênico associado à HF elevado tinham um risco semelhante aos pacientes sem variante causadora de HF e escore poligênico baixo, mas pacientes com HF monogênica e escore poligênico alto tinham o maior risco de DCV prematura quando comparados a indivíduos que têm apenas uma causa monogênica. Da mesma forma, outros grupos também demonstraram maior risco de DCV em indivíduos com alto PRS, confirmando a contribuição poligênica para os fenótipos e suas implicações clínicas^{64,65}. No entanto, não observamos uma associação significativa entre PRS e maiores chances de desenvolvimento de DCV dentro de cada grupo HF. Provavelmente, o poder estatístico reduzido devido ao tamanho limitado da amostra dificultou nossa capacidade de identificar um papel preditivo para o LDL-C PRS nesse cenário clínico específico. No entanto, um PRS específico para DCV, em oposição ao LDL-C, poderia ser mais útil para a estratificação do risco cardiovascular na HF, conforme sugerido anteriormente por outros grupos^{40,64}.

5.7 Aplicabilidade do Escore principal vs. Escore reduzido

O estudo publicado por Futema et al. em 2015³⁹, teve como objetivo aprimorar o primeiro escore para hipercolesterolemia poligênica publicado em 2013³⁸. Os autores observaram que aumentar o número de SNVs do PRS de 12 para 33 não melhorou a capacidade discriminatória do escore entre FH/M- e população controle. Entretanto, a remoção sequencial de SNVs com efeitos menores e/ou frequência mais baixa mostrou que um PRS de 6 SNVs teve um

desempenho tão bom quanto o escore de 12 SNVs. Estes resultados foram replicados em outros países, porém todas as amostras eram provenientes de pacientes caucasianos.

No presente estudo, os PRSs de 12 e 6 SNVs também tiveram desempenho semelhante. Tanto na análise de associação do escore com LDL-C quanto nas diferenças entre as médias entre os grupos, ambos os escores tiveram praticamente o mesmo valor. Entretanto, o quartil mais alto do escore de 12 SNVs mostrou associação significativa com níveis mais elevados de escore de cálcio na população do ELSA-Brasil, diferente do escore de 6 SNVs. Para fins práticos, não há grandes diferenças econômicas entre a avaliação de 12 ou 6 SNVs. Desta maneira, o escore principal mostra-se mais efetivo na estratificação de risco da população geral.

5.8 Vantagens e Limitações

Este é o primeiro estudo que valida o PRS associado à hipercolesterolemia como uma ferramenta de avaliação de risco em uma população latino-americana. Este trabalho possui algumas vantagens em relação a outros semelhantes publicados em outros países. A maioria destes trabalhos sequenciou apenas o gene *LDLR* e parte do *APOB* e *PCSK9* para fins de diagnóstico molecular. Na nossa metodologia, além dos genes citados serem sequenciados em todas as regiões codificantes, nosso painel customizado *SureSelect* ainda contém genes que causam doenças raras que muitas vezes são confundidas com a HF, como a Sitosterolemia, associada aos genes *ABCG5* e *ABCG8* e a Doença de Depósito de Ésteres de Colesterol,

associada ao gene *LIPA*, por exemplo. Além disso, o painel compreende genes que causam HF em menor frequência e que só são sequenciados ocasionalmente, como o *LDLRAP1*. A presença destes genes implica em um diagnóstico correto, evitando casos de falsos-negativos que podem comprometer as análises.

Entretanto, a principal desvantagem deste estudo possivelmente é a utilização de SNVs e β -coeficientes que foram derivados de estudos de GWAS com maioria dos indivíduos com ancestralidade europeia e caucasiana. Esta translação entre populações pode ser um viés, e estes marcadores genéticos podem não ser os mais adequados para o cálculo do PRS na população brasileira. Uma forma de superar essa limitação seria realizar um GWAS de indivíduos brasileiros, com o propósito de identificar variantes associadas ao LDL-C frequentes nesta população. Outras limitações destacam-se: número reduzido de indivíduos dos grupos HF com informação de escore de cálcio; utilização de uma subamostra de participantes do estudo ELSA-Brasil e não de toda a coorte; e a substituição da tecnologia NGS, uma vez que nem todos os sujeitos foram sequenciados utilizando o mesmo painel. Além disso, a falta de informações sobre tipo, dosagem e duração do tratamento farmacológico nos grupos de HF também é uma limitação do estudo.

6. CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo a avaliar dois PRSs associados à dislipidemia como ferramenta de avaliação de risco em uma população latino-americana com HF. Nosso estudo mostrou que indivíduos com o fenótipo HF, mas nos quais nenhuma variante genética causal foi identificada, tiveram uma PRS média maior quando comparados aos grupos HF/M+ e controle. Entretanto, ambos os escores não parecem prever níveis de LDL-C e eventos cardiovasculares ou influenciar a resposta ao tratamento farmacológico na população de HF. No entanto, o PRS de 12 SNVs se mostrou um preditor de risco de aterosclerose pré-clínica na população geral. Estas observações suportam a hipótese da necessidade de calibração dos escores quando aplicados a outras populações ou o uso de diferentes conjuntos de SNVs. Concluimos, ainda, que o escore de 12 SNVs é mais efetivo na estratificação de risco da população geral quando comparado ao escore de 6 SNVs.

7. REFERÊNCIAS

1. Gidding SS, Champagne MA, De Ferranti SD, Defesche J, Ito MK, Knowles JW, et al. The Agenda for Familial Hypercholesterolemia: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2015;132(22):2167–92.
2. Cuchel M, Bruckert E, Ginsberg HN, Raal FJ, Santos RD, Hegele RA, et al. Homozygous familial hypercholesterolaemia: New insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J*. 2014;35(32):2146–57.
3. Vallejo-Vaz AJ, Ray KK. Epidemiology of familial hypercholesterolaemia: Community and clinical. *Atherosclerosis* [Internet]. 2018;277:289–97. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.06.855>
4. Harada PH, Miname MH, Benseñor IM, Santos RD, Lotufo PA. Familial hypercholesterolemia prevalence in an admixed racial society: Sex and race matter. The ELSA-Brasil. *Atherosclerosis* [Internet]. 2018;277(August):273–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.08.021>
5. Singh S, Bittner V. Familial Hypercholesterolemia—Epidemiology, Diagnosis, and Screening. *Curr Atheroscler Rep*. 2015;17(2).
6. Farnier M, Bruckert E. Severe familial hypercholesterolaemia: Current and future management. *Arch Cardiovasc Dis* [Internet]. 2012;105(12):656–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.acvd.2012.05.011>
7. Beheshti SO, Madsen CM, Varbo A, Nordestgaard BG. Worldwide Prevalence of Familial Hypercholesterolemia: Meta-Analyses of 11 Million Subjects. *J Am Coll Cardiol*. 2020;75(20):2553–66.
8. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL Receptor Gene in Familial Hypercholesterolemia. 1992;6.
9. Alves AC atarina, Etxebarria A, Soutar AK atherine, Martin C, Bourbon M. Novel functional APOB mutations outside LDL-binding region causing familial hypercholesterolaemia. *Hum Mol Genet*. 2014;23(7):1817–28.
10. Strøm TB, Laerdahl JK, Leren TP. Mutations affecting the transmembrane domain of the LDL receptor: Impact of charged residues on the membrane insertion. *Hum Mol Genet*. 2017;26(9):1634–42.
11. Paththinige C, Sirisena N, Dissanayake V. Genetic determinants of inherited susceptibility to hypercholesterolemia – a comprehensive literature review. *Lipids Health Dis* [Internet]. 2017;16(1):103. Available from: <http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-017-0488-4>

12. Wintjens R, Bozon D, Belabbas K, Mbou F, Girardet J, Tounian P, et al. Global molecular analysis and APOE mutations in a cohort of autosomal dominant hypercholesterolemia patients in France. 2016;57.
13. Chouinard-watkins R, Plourde M. Fatty Acid Metabolism in Carriers of Apolipoprotein E Epsilon 4 Allele: Is It Contributing to Higher Risk of Cognitive Decline and Coronary Heart Disease? 2014;4452–71.
14. Fouchier SW, Dallinga-thie GM, Meijers JCM, Zelcer N, Kastelein JJP, Defesche JC, et al. Mutations in STAP1 Are Associated With Autosomal Dominant Hypercholesterolemia. 2014;552–5.
15. Loaiza N, Hartgers ML, Reeskamp LF, Balder J, Rimbert A, Bazioti V, et al. Taking One Step Back in Familial Hypercholesterolemia. 2020;(April):973–85.
16. Lamiquiz-moneo I, Restrepo-córdoba MA, Mateo-gallego R, María A, Alberiche-ruano P, García-pavía P, et al. Predicted pathogenic mutations in STAP1 are not associated with clinically defined familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* [Internet]. 2020;292(July 2019):143–51. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.11.025>
17. Wong B, Kruse G, Kutikova L, Ray KK, Mata P, Bruckert E. Cardiovascular Disease Risk Associated With Familial Hypercholesterolemia: A Systematic Review of the Literature. *Clin Ther* [Internet]. 2016;38(7):1696–709. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.05.006>
18. Sharifi M, Higginson E, Bos S, Gallivan A, Harvey D, Li KW, et al. Greater preclinical atherosclerosis in treated monogenic familial hypercholesterolemia vs. polygenic hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2017;263:405–11.
19. Fernandes JL, Bittencourt MS. Escore De Cálcio Coronariano: Onde E Quando Faz a Diferença Na Prática Clínica Tt - Coronary Calcium Score: Where and When Does It Make a Difference in Clinical Practice. *Rev Soc Cardiol Estado São Paulo* [Internet]. 2017;27(2):f:88-l:95. Available from: <http://www.socesp.org.br>
20. Santos RD, Gidding SS, Hegele RA, Cuchel MA, Barter PJ, Watts GF, 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* [Internet]. 2016;4(10):850–61. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587\(16\)30041-9](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587(16)30041-9)
21. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, Ginsberg HN, Masana L, Descamps OS, et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: Guidance for clinicians to prevent coronary heart disease. *Eur Heart J*. 2013;34(45):3478–90.

22. Alonso R, Mata N, Castillo S, Fuentes F, Saenz P, Muñiz O, et al. Cardiovascular disease in familial hypercholesterolaemia: Influence of low-density lipoprotein receptor mutation type and classic risk factors. *Atherosclerosis*. 2008;200(2):315–21.
23. Coppinger C, Movahed MR, Azemawah V, Peyton L, Gregory J, Hashemzadeh M. A Comprehensive Review of PCSK9 Inhibitors. 2022;27:1–14.
24. Connor WE, Connor SL. Importance of diet in the treatment of familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* [Internet]. 1993;72(10):42D-53D. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8213496>
25. Marks D, Wonderling D, Thorogood M, Lambert H, Humphries SE, Neil HAW. Screening for hypercholesterolaemia versus case finding for familial hypercholesterolaemia: A systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health Technol Assess (Rockv)*. 2000;4(29).
26. Poonia A, Giridhara P. Xanthomas in Familial Hypercholesterolemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2017;377(5):e7. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMicm1616147>
27. 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):407–20.
28. Williams RR, Hunt SC, Schumacher MC, Hegele RA, Leppert MF, Ludwig EH, et al. Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *Am J Cardiol*. 1993;72(2):171–6.
29. World Health Organization. Familial hypercholesterolemia (FH) - Report of a second WHO Consultation [Internet]. Human Genetics Programme. Geneva; 1998. Available from: <apps.who.int/iris/handle/10665/64162>
30. Santos RD, Gagliardi ACM., Xavier HZ, Casella Filho A, Araújo DB.; Cesena FY, Alves RJ, Pereira AC, Lottenberg AM, Chacra APM, Faludi AA, Sposito AC, Ribeiro Filho FF, Fonseca FAH., Giuliano ICB, Catani LH, Bertolami MC, Miname MH, Izar MCO, Monte O, Mara SFW. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). In: *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2012.
31. Knowles JW, Rader DJ, Khoury MJ. Cascade Screening for Familial Hypercholesterolemia and the Use of Genetic Testing. 2017;318(4):381–2.
32. Jannes CE, Souza R De, Turolla L, Santos RD, Gagliardi ACM, Marsiglia JDC, et al. Familial hypercholesterolemia in Brazil: Cascade screening program , clinical and genetic aspects. *Atherosclerosis*. 2015;238.
33. Cibelle Mariano, Ana Catarina Alves, Ana Margarida Medeiros, Joana Rita Chora, Marília Antunes, Marta Futema, Steve E Humphries MB. THE FH PHENOTYPE: MONOGENIC FAMILIAL

HYPERCHOLESTEROLAEMIA, POLYGENIC
HYPERCHOLESTEROLAEMIA AND OTHER CAUSES. *Clin Genet.*
2020;97(3):457–66.

34. Norrgard K. Genetic Variation and Disease: GWAS. *Nat Educ* [Internet]. 2008;1(1):87. Available from: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/genetic-variation-and-disease-gwas-682/#>
35. Choi SW, Mak TSH, O'Reilly PF. Tutorial: a guide to performing polygenic risk score analyses. *Nat Protoc* [Internet]. 2020;15(9):2759–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41596-020-0353-1>
36. Illumina. Polygenic risk: what's the score? *Nat Res Cust media* [Internet]. 2019;1–4. Available from: <https://www.nature.com/articles/d42473-019-00270-w>
37. Teslovich TM, Musunuru K, Smith A V, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* [Internet]. 2010;466(7307):707–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20686565>
38. Philippa J Talmud*, Sonia Shah*, Ros Whittall, Marta Futema, Philip Howard, Jackie A Cooper, Seamus C Harrison, KaWah Li, Fotios Drenos, Frederik Karpe, H Andrew W Neil, Olivier S Descamps, Claudia Langenberg, Nicholas Lench, Mika Kivimaki, John Whittaker SEH. Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: a case-control study. *Lancet* [Internet]. 2013;381(9874):1302–11. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62127-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62127-8)
39. Futema M, Shah S, Cooper JA, Li K, Whittall RA, Sharifi M, et al. Refinement of variant selection for the LDL cholesterol genetic risk score in the diagnosis of the polygenic form of clinical familial hypercholesterolemia and replication in samples from 6 countries. *Clin Chem.* 2015;
40. Paquette M, Chong M, Thériault S, Dufour R, Paré G, Baass A. Polygenic risk score predicts prevalence of cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol* [Internet]. 2017;725–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28456682>
41. Kwon M, Han SM, Kim D II, Rhee MY, Lee BK, Ahn YK, et al. Evaluation of polygenic cause in Korean patients with familial hypercholesterolemia - A study supported by Korean Society of Lipidology and Atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2015;
42. Lamiquiz-Moneo I, Pérez-Ruiz MR, Jarauta E, Tejedor MT, Bea AM, Mateo-Gallego R, et al. Single Nucleotide Variants Associated With Polygenic Hypercholesterolemia in Families Diagnosed Clinically With Familial Hypercholesterolemia. *Rev Esp Cardiol.* 2018;71(5):351–6.
43. Durst R, Ibe UK, Shpitzen S, Schurr D, Eliav O, Futema M, et al.

- Molecular genetics of familial hypercholesterolemia in Israel—revisited. *Atherosclerosis* [Internet]. 2017;257(2017):55–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.12.021>
44. Aquino EML, Barreto SM, Bensenor IM, Carvalho MS, Chor D, Duncan BB, et al. Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil): Objectives and Design. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2012 Feb 15;175(4):315–24. Available from: <https://academic.oup.com/aje/article-lookup/doi/10.1093/aje/kwr294>
 45. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K RH. 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. 2015;17(5):405–24.
 46. ThermoFisher Scientific. Superior performance-reliable, robust solutions TaqMan Assays for genetic variation research [Internet]. 2015. Available from: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/taqman-assay-genetic-variation-research-br.pdf>
 47. Naslavsky MS, Scliar MO, Yamamoto GL, Yu J, Wang T, Zverinova S, et al. Whole-genome sequencing of 1 , 171 elderly admixed individuals from the largest Latin American metropolis (São Paulo , Brazil) † Corresponding author s ZIP 05508090 ZIP 05508090 Abstract As whole-genome sequencing (WGS) becomes the gold standard tool . 2020;1–29.
 48. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*. 2020;581(7809):434–43.
 49. Trinder M, Francis GA, Brunham LR. Association of Monogenic vs Polygenic Hypercholesterolemia With Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *JAMA Cardiol*. 2020;1–10.
 50. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M, Detrano R, et al. Quantification of Coronary Artery Calcium Using Ultrafast Computed Tomography. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15(4):827–59.
 51. Cunha AFC, Ribeiro I. Hipercolesterolemia familiar: a importância do diagnóstico e tratamento precoces. *Int j Cardiovasc sci*. 2017;30(6):550–3.
 52. Wu H, Forgetta V, Zhou S, Bhatnagar SR, Paré G. Polygenic Risk Score for Low-Density Lipoprotein Cholesterol Is Associated With Risk of Ischemic Heart Disease and Enriches for Individuals With Familial Hypercholesterolemia. 2021;(February):88–96.
 53. Trinder M, Li X, DeCastro ML, Cermakova L, Sadananda S, Jackson LM, et al. Risk of Premature Atherosclerotic Disease in Patients With Monogenic Versus Polygenic Familial Hypercholesterolemia. *J Am Coll*

- Cardiol. 2019;74(4):512–22.
54. Vrablik M, Tichý L, Freiberger T, Blaha V, Satny M, Hubacek JA. Genetics of Familial Hypercholesterolemia: New Insights. *Front Genet* [Internet]. 2020;11(October):1–10. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.09.15.298026v1>
 55. Gratton J, Finan C, Hingorani AD, Humphries SE. LDL-C Concentrations and the 12-SNP LDL-C Score for Polygenic Hypercholesterolaemia in Self-Reported South Asian , Black and Caribbean Participants of the UK Biobank. 2022;13(March):1–9.
 56. Mickiewicz A, Futema M, Ćwiklinska A, Kuchta A, Jankowski M, Kaszubowski M, et al. Higher responsiveness to rosuvastatin in polygenic versus monogenic hypercholesterolaemia: A propensity score analysis. *Life*. 2020;10(5).
 57. Santos PCJL, Morgan AC, Jannes CE, Turolla L, Krieger JE, Santos RD, et al. Presence and type of low density lipoprotein receptor (LDLR) mutation influences the lipid profile and response to lipid-lowering therapy in Brazilian patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* [Internet]. 2014;233(1):206–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.028>
 58. Kim H, Lee CJ, Pak H, Kim D II, Rhee MY, Lee BK, et al. GENetic characteristics and REsponse to lipid-lowering therapy in familial hypercholesterolemia: GENRE-FH study. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75901-0>
 59. Blaha MJ, Silverman MG, Budoff MJ. Clinical risk scores are not sufficient to define primary prevention treatment strategies among asymptomatic patients. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2014;7(2):398–408.
 60. Grundy SM, Stone NJ, Bailey AL, Beam C, Birtcher KK, Blumenthal RS, et al. 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCN A Guideline on the Management of Blood Cholesterol: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2019;73(24):e285–350. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2018.11.003>
 61. Khera A V., Won HH, Peloso GM, Lawson KS, Bartz TM, Deng X, et al. Diagnostic Yield and Clinical Utility of Sequencing Familial Hypercholesterolemia Genes in Patients With Severe Hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(22):2578–89.
 62. Coutinho ER, Miname MH, Rocha VZ, Bittencourt MS, Jannes CE, Tada MT, et al. Familial hypercholesterolemia and cardiovascular disease in older individuals. *Atherosclerosis* [Internet]. 2021;318:32–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2020.12.012>

63. Starr B, Hadfield SG, Hutten BA, Lansberg PJ, Leren TP, Damgaard D, et al. Development of sensitive and specific age- and gender-specific low-density lipoprotein cholesterol cutoffs for diagnosis of first-degree relatives with familial hypercholesterolaemia in cascade testing. *Clin Chem Lab Med.* 2008;46(6):791–803.
64. Hegele RA, Baass A, Brunham LR. Polygenic Contribution to Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels and Hypercholesterolemia. 2020;(October):515–23.
65. D'erasmo L, Minicocci I, Di Costanzo A, Pigna G, Commodari D, Ceci F, et al. Clinical implications of monogenic versus polygenic hypercholesterolemia: Long-term response to treatment, coronary atherosclerosis burden, and cardiovascular events. *J Am Heart Assoc.* 2021;10(9).

8. ANEXOS

ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

1

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I. Dados da pesquisa:

Título da pesquisa : Programa Genético de Rastreamento Ativo de Hipercolesterolemia Familiar no Brasil

Pesquisador principal : Prof. José Eduardo Krieger

Pesquisador Executante: Dr. Alexandre da Costa Pereira

Coordenadora: Cinthia Elim Jannes Lepski

Departamento/Instituto: Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular - Instituto do Coração – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - HCFMUSP

De acordo com a resolução [466/2012](#), os seguintes conteúdos devem fazer parte das explicações sobre a pesquisa.

II. Descrição e objetivo da pesquisa:

Você é convidado a participar de um estudo de rastreamento genético em cascata para hipercolesterolemia familiar. Será efetuada coleta de sangue ou saliva para posterior análise do seu DNA para verificação da presença ou ausência de alteração genética correlacionada com hipercolesterolemia familiar. Quando o resultado ficar pronto entraremos em contato com o(a) senhor(a) para entregarmos o laudo. Caso a alteração seja encontrada, todos seus familiares serão convocados para coleta e da mesma forma, faremos a busca da alteração no DNA deles.

Rubrica sujeito da pesquisa ou responsável:

Rubrica responsável pelo projeto:

TCLE 3ª versão de 05/05/2016

III. Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados:

A obtenção de DNA do paciente poderá ser realizada de três formas:

Coleta de sangue

- Não é necessário estar em jejum

- Será efetuada coleta de 8 mL de sangue em tubo com EDTA e 10 mL de sangue em tubo sem anticoagulante. A coleta deve seguir todas as normas de higiene e segurança estabelecidas para este fim e será efetuada por profissionais enfermeiros treinados e participantes do projeto.

Coleta de saliva:

- Não é necessário estar de jejum

- A coleta de 2 ml de saliva será realizada em tubo específico contendo líquido estabilizador. As instruções de coleta a serem realizadas pelo paciente serão enviados juntamente com o Kit de coleta.

Coleta de sangue em papel filtro:

- Não é necessário estar de jejum

- Coleta de 4 gotas de sangue em papel filtro FTA após perfuração do dedo com lanceta específica após esterilização com álcool 70%. As instruções de coleta a serem realizadas pelo paciente serão enviados juntamente com o Kit de coleta.

IV. Riscos e benefícios esperados:

Riscos: Risco mínimo.

Benefícios esperados para o participante: realização de teste genético para Hipercolesterolemia Familiar, ajudando assim no diagnóstico e tratamento da doença.

Rubrica sujeito da pesquisa ou responsável:

Rubrica responsável pelo projeto:

TCLE 3ª versão de 05/05/2016

V. Esclarecimentos dados pelo pesquisador sobre garantias do sujeito da pesquisa consignado

- 1 Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa identificar pessoas com alteração genética causadora de hipercolesterolemia familiar;
- 2 Você pode, a qualquer momento, fazer a retirada do consentimento, ou seja, você pode desistir do estudo em qualquer momento sem que haja qualquer prejuízo.
- 3 Direito de confidencialidade: para manter sua privacidade, será fornecido um número de registro à sua amostra. Dessa forma, seu nome será mantido no mais absoluto sigilo e não será divulgado em nenhum momento da pesquisa. Esses dados estarão apenas disponíveis ao coordenador do projeto.
- 4 Os participantes serão beneficiados por terem a identificação ou não de uma alteração genética e poderão auxiliar e beneficiar os familiares, que muitas vezes não sabem que possuem a doença e estão sem acompanhamento médico. Encaminharemos os indivíduos que apresentarem alterações nos exames coletados para tratamento e acompanhamento no sistema público de saúde da sua região. Você não terá nenhuma despesa proveniente da participação nesse estudo, mas também não terá nenhum ganho material.
- 5 Os pacientes que concordarem em participar do projeto deverão assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.
- 6 Você assinará as duas vias do termo de consentimento livre esclarecido de igual teor e receberá por direito uma das vias para controle pessoal.
- 7 Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Prof. José Eduardo Krieger que poderá ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, nº 44, andar AB. Telefone: 11 2661-5579. Se o Sr.(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5ª andar – tel:(11)2661-7585/ (11)2661 1548 (11)2661 1549 FAX: 2661-6442– E-mail: cep@hc.fm.usp.br
- 8 É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- 9 Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;
- 10 Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
- 11 Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Rubrica sujeito da pesquisa ou responsável:

Rubrica responsável pelo projeto:

TCLE 3ª versão de 05/05/2016

- 12 O material coletado será processado e armazenado em banco/repositório do InCor. O mesmo será utilizado para sequenciamento de DNA e identificação da presença de mutação e dosagem dos níveis de colesterol. Após os testes, o DNA será mantido no banco/repositório para identificações futuras de novas mutações e para futuros estudos envolvendo este ou outro projeto relacionado à Hipercolesterolemia Familiar. O material será mantido no banco/repositório durante os três anos de vigor do Projeto, mas este prazo poderá ser maior caso o Projeto seja renovado.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Eu discuti com o Prof. José Eduardo Krieger ou Dra. Cinthia Elim Jannes ou as enfermeiras do programa sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M F DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Programa Genético de Rastreamento Ativo de Hipercolesterolemia Familiar no Brasil

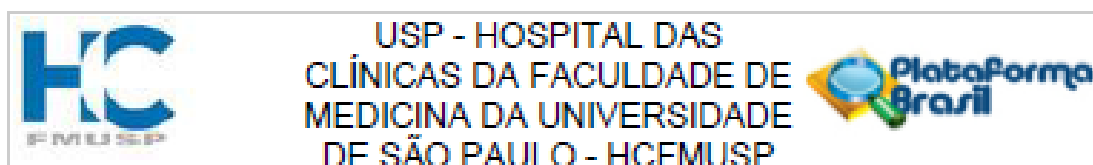
2. PESQUISADOR: Prof. José Eduardo Krieger
 NÚMERO INSCRIÇÃO CRM: 61339
 CARGO/FUNÇÃO: Diretor do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular
 Pesquisador Executante: Dr. Alexandre da Costa Pereira
 NÚMERO INSCRIÇÃO CRM: 97329
 CARGO/FUNÇÃO: Pesquisador executante
 Pesquisador: Dra. Cinthia Elim Jannes Lepski
 CARGO/FUNÇÃO: Coordenadora
 UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto do Coração – Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
 RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
 RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 10 anos

Rubrica sujeito da pesquisa ou responsável:
 Rubrica responsável pelo projeto:
 TCLE 3ª versão de 05/05/2016

ANEXO II – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Programa Genético de Rastreamento Ativo de Hipercolesterolemia Familiar na População Brasileira

Pesquisador: Jose Eduardo Krieger

Área Temática: Genética Humana;
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 10

CAAE: 00594212.0.1001.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: ASSOCIACAO SAMARITANO
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.729.942

Apresentação do Projeto:

Apresentação da Emenda:

Emenda referente ao projeto nº CAAE: 00594212.0.1001.0068.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo da emenda:Inclusão dos subprojetos e respectivos executantes:1- "Análise dos genes STAP1, APOE, ABCG5 e ABCG8 em pacientes hipercolesterolêmicos com diagnóstico molecular negativo para os genes LDLR, APOB e PCSK9" - MAURICIO TERUO TADA;2- "Hipercolesterolemia poligênica: cálculo de escore genético de alelos de risco em pacientes com LDL elevado" - ISABELLA RAMOS LIMA -
OBJETIVOS DOS SUBPROJETOS SUPRACITADOS:Objetivos Subprojeto 1:- Análisar os genes STAP1 e APOE para a Investigação de variantes genéticas que possam estar relacionadas à hipercolesterolemia familiar e analisar os genes ABCG5 e ABCG8 como diagnóstico diferencial para sitosterolemia;
- Verificar se as alterações encontradas estão descritas na literatura médica e se possuem relação com a hipercolesterolemia familiar.- Investigar se pacientes hipercolesterolêmicos com diagnóstico molecular negativo para HF possuem sitosterolemia, pesquisa feita através da investigação de variantes patogênicas nos genes ABCG5 e ABCG8.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 3.729.942

- Avaliar a frequência das variantes encontradas através da comparação de populações controles disponíveis.- Verificar qual isoforma do gene APOE é mais frequente em pacientes hipercolesterolêmicos brasileiros e comparar com a literatura internacional vigente.- Avaliar a predição do efeito de variantes provavelmente patogênicas na estrutura e função de proteínas, assim como avaliar a conservação entre as espécies utilizando softwares de bioinformática. Realizar co-segregação familiar de variantes provavelmente patogênicas através do sequenciamento dos familiares pela metodologia de Sanger. Objetivos subprojeto 2: - Analisar 12 SNPs associados ao aumento do LDL-C e realizar cálculo de escore genético em pacientes com ou sem mutação associada à HF, visando o diagnóstico da hipercolesterolemia poligênica- Validar o escore genético reportado na literatura científica em pacientes com diagnóstico clínico de HF previamente genotipados, comparando-os com um grupo controle.- Investigar e comparar a aplicabilidade do escore genético para hipercolesterolemia poligênica com 12 ou 6 SNPs.- Avaliar a influência dos SNPs relacionados aos três principais genes que causam a HF (LDLR, APOB e PCSK9) no escore genético, uma vez que estes podem estar em desequilíbrio de ligação com mutações não identificadas.- Investigar a influência do escore de risco poligênico em pacientes com mutação identificada para HF.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e Benefícios dos subprojetos inseridos na presente emenda: Mantidos quando comparados ao projeto original.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

CONSIDERAÇÕES SOBRE OS SUBPROJETOS SUBMETIDOS NESTA EMENDA:1- Quanto ao subprojeto "Análise dos genes STAP1, APOE, ABCG5 e ABCG8 em pacientes hipercolesterolêmicos com diagnóstico molecular negativo para os genes LDLR, APOB e PCSK9", será analisado o gene APOE em cerca de 500 pacientes não relacionados e que possuem diagnóstico molecular negativo para os genes LDLR, APOB e PCSK9. Será investigado se as variantes genéticas encontradas podem estar relacionadas à HF. Também serão analisados os genes APOE, STAP1, ABCG5 e ABCG8 em cerca de 300 pacientes não relacionados e que também possuem diagnóstico molecular negativo para os genes LDLR, APOB e PCSK9. Os critérios de seleção estão bem descritos, para ambos os grupos. Quanto ao material biológico, o pesquisador informa que foram captados através do programa de rastreamento genético em cascata de hipercolesterolemia familiar – Hipercol Brasil, do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração de São Paulo. Quanto ao sequenciamento genético, a metodologia está detalhadamente descrita no projeto.2- Quanto

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2861-7585 Fax: (11)2861-7585 E-mail: cappelq adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 3.729.942

ao subprojeto "Hipercolesterolemia poligênica: cálculo de escore genético de alelos de risco em pacientes com LDL elevado", serão analisados 600 pacientes previamente consentidos, participantes do programa Hipercol Brasil. Caso alguma alteração patogênica seja identificada, o programa realiza o rastreamento em cascata nos familiares do indivíduo com diagnóstico molecular de HF. Quanto aos SNPs selecionados, reportados na literatura, estão todos descritos na brochura do subprojeto. Quanto à metodologia de análise dos genótipos está adequadamente descrita.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE subprojeto "Análise dos genes STAP1, APOE, ABCG5 e ABCG8 em pacientes hipercolesterolêmicos com diagnóstico molecular negativo para os genes LDLR, APOB e PCSK9" adequado. TCLE subprojeto "Hipercolesterolemia poligênica: cálculo de escore genético de alelos de risco em pacientes com LDL elevado" adequado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada, sem objeções.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1443220_É5.pdf	26/09/2019 17:41:29		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Infantil_Isabela.doc	26/09/2019 17:38:55	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE_Isabela.doc	26/09/2019 17:38:20	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2961-7585 Fax: (11)2961-7585 E-mail: cappelq.edm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 3.729.942

Justificativa de Ausência	TCLE_Isabella.doc	26/09/2019 17:38:20	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Subprojeto_Isabella.docx	26/09/2019 17:38:00	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Acelto
Outros	ORCAMENTO_Isabella.docx	26/09/2019 17:37:22	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Acelto
Outros	Declaracaodematricula_Janus.pdf	26/09/2019 17:36:59	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Acelto
Outros	CRONOGRAMA_Isabella.docx	26/09/2019 17:36:25	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Acelto
Outros	carta_sub_ISABELA.pdf	26/09/2019 17:36:13	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	SUBPROJETO_MAUICIO.doc	26/09/2019 17:35:44	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_MAUICIO_INFANTIL.doc	26/09/2019 17:34:55	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_MAUICIO.doc	26/09/2019 17:34:24	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Acelto
Outros	DECL_MATRICULA.pdf	26/09/2019 17:33:53	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Acelto
Outros	Cronograma_MAUICIO.docx	26/09/2019 17:33:19	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Acelto
Outros	carta_sub_MAUICIO.pdf	26/09/2019 17:32:54	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Acelto
Outros	REL_PARCIAL.doc	26/09/2019 17:32:24	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	SUBPROJETO_corrigido_19_07_18.docx	03/09/2018 08:58:29	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Acelto
Parecer Anterior	aprovado_HIPERCOL_PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_66159.pdf	12/06/2018 17:19:35	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Acelto
Outros	Carta_de_Inclusao_de_subprojeto_2018_02_03_signed.pdf	07/03/2018 17:27:12	Jose Eduardo Krieger	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Proj_Hipercol_Pop_Brasileira_versao_3.pdf	07/03/2018 17:23:17	Jose Eduardo Krieger	Acelto
Outros	Fomulario_para_submissao_de_emenda_e_brochura_2018_02_03_signed.pdf	07/03/2018 17:23:05	Jose Eduardo Krieger	Acelto
Outros	Carta_parceria_unicamp.pdf	07/03/2018 17:22:06	Jose Eduardo Krieger	Acelto

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2981-7585 Fax: (11)2981-7585 E-mail: cappelq.edm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 3.729.942

Outros	Carta_de_emenda_e_Inclusao_de_pesq uisador_2018_02_03_signed.pdf	07/03/2018 17:21:39	Jose Eduardo Krieger	Acelto
Cronograma	Cronograma_2018_02_03.pdf	07/03/2018 17:21:16	Jose Eduardo Krieger	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_HipercolBrasil_versao3_1.pdf	10/02/2017 15:18:58	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_HipercolBrasil_06_2016.docx	05/10/2016 10:02:58	Jose Eduardo Krieger	Acelto
Folha de Rosto	Folha de rosto_HF_final.pdf	13/07/2012 11:49:17		Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 27 de Novembro de 2019

Assinado por:
Joel Falntuch
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2961-7585 Fax: (11)2961-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Página 05 de 05



Contents lists available at ScienceDirect

Atherosclerosis Plus

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis

Polygenic risk score for hypercholesterolemia in a Brazilian familial hypercholesterolemia cohort



Isabella Ramos Lima ^{a,*}, Mauricio Teruo Tada ^a, Theo G.M. Oliveira ^a, Cinthia Elim Jannes ^a,
Isabela Bensenor ^b, Paulo A. Lotufo ^b, Raul D. Santos ^c, Jose E. Krieger ^a,
Alexandre C. Pereira ^{a,d,**}

^a Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

^b Center for Clinical and Epidemiologic Research, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^c Lipid Clinic, Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School Hospital, São Paulo, Brazil

^d Genetics Department, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 January 2022

Received in revised form

3 June 2022

Accepted 24 June 2022

Available online 28 June 2022

Keywords:

Polygenic risk score
Familial hypercholesterolemia
Genetics
Lipid disorder
Atherosclerosis

ABSTRACT

Background and aims: Familial hypercholesterolemia (FH) is a genetic disorder characterized by high levels of LDL-C leading to premature cardiovascular disease (CAD). Only about 40% of individuals with a clinical diagnosis of FH have a causative genetic variant identified, and a proportion of genetically negative cases may have a polygenic cause rather than a still unidentified monogenic cause. This work aims to evaluate and validate the role of a polygenic risk score (PRS) associated with hypercholesterolemia in a Brazilian FH cohort and its clinical implications.

Methods: We analyzed a previously derived PRS of 12 and 6 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) in 684 FH individuals (491 mutation-negative [FH/M−], 193 mutation-positive [FH/M+]) and in 1605 controls. Coronary artery calcium (CAC) score was also evaluated.

Results: The PRS was independently associated with LDL-C in control individuals ($p < 0.001$). Within this group, in individuals in the highest quartile of the 12 SNPs PRS, the odds ratio for CAC score > 100 was 1.7 (95% CI: 1.01–2.88, $p = 0.04$) after adjustment for age and sex. Subjects in the FH/M− group had the highest mean score in both 12 and 6 SNPs PRS (38.25 and 27.82, respectively) when compared to the other two groups ($p = 2.2 \times 10^{-16}$). Both scores were also higher in the FH/M+ group (36.48 and 26.26, respectively) when compared to the control group ($p < 0.001$ for the two scores) but inferior to the FH/M− group. Within FH individuals, the presence of a higher PRS score was not associated with LDL-C levels or with CAD risk.

Conclusion: A higher PRS is associated with significantly higher levels of LDL-C and it is independently associated with higher CAC in the Brazilian general population. A polygenic cause can explain a fraction of FH/M− individuals but does not appear to be a modulator of the clinical phenotype among FH individuals, regardless of mutation status.

© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant genetic disorder characterized by high levels of low-density cholesterol (LDL-C) leading to premature coronary heart disease.

It is estimated that heterozygous FH affects about 1 in 300 individuals worldwide, while the homozygous form affects around 1 in 300,000 [1,2]. A study by Harada et al. estimated that the prevalence of FH in the Brazilian population is around 1 in 263 individuals [3].

FH is mainly caused by genetic defects in the *LDLR* gene [4], where 93% of the causative genetic variants are located. Another 5% of causal FH genetic variants are in the *APOB* gene [5,6]. In addition, 2% of the genetic variants are gain-of-function variants in the *PCSK9* gene, responsible for encoding the subtilisin/kexin type 9 pro-protein convertase [4,7].

* Corresponding author.

** Corresponding author. Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

E-mail addresses: isabellalima@usp.br (I.R. Lima), alexandre.pereira@incor.usp.br (A.C. Pereira).

<https://doi.org/10.1016/j.athplu.2022.06.002>

2667-0895/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Despite the number of patients diagnosed with the FH phenotype has increased in recent years, pathogenic genetic variants are not detected in about 60% of clinically diagnosed individuals [8]. Although this number depends on the defined inclusion criteria and the investigated genes, it has been proposed that a proportion of the negative cases may have a polygenic cause, rather than a still unidentified monogenic cause [9]. In fact, the realization of the great inter-individual heterogeneity of both the clinical presentation and prognosis of FH patients, even when carrying the same pathogenic variant, highlights the importance of understanding sources of residual variation in FH patients and hyperlipidemia.

It is assumed that in polygenic hypercholesterolemia, patients who does not have an identified monogenic cause of FH present a specific combination of common (single nucleotide variations) SNPs that, together, elevate the LDL-c concentrations, exceeding the diagnostic threshold. Polygenic hypercholesterolemia could explain the disparity between the individuals who present a molecular diagnosis and individuals who have only a clinical diagnosis without any pathogenic genetic variant identified [10].

Talmud et al. [10] proposed a polygenic risk score (PRS) of 12 SNPs derived from the weighted sum of the number of risk alleles found in each individual. The weights used are the β -coefficients of each risk allele reported on a lipid GWAS meta-analysis performed by the Global Lipid Genetics Consortium (GLGC) [11]. In a complementary study, the group later showed that this score could be efficiently decreased from 12 to 6 SNPs [12,13]. Currently, the replication of this PRS has already been carried out in at least 6 European countries, in Israel and Korea, and in all studies, the score was significantly associated with LDL-c values [13,14]. In addition, a recent study showed this score distribution and association with LDL-C in three different UK ethnic groups [15].

However, most analyses with this PRS were performed on European or Asian individuals. To the best of our knowledge, up to this date, no study has shown the applicability of PRS in Latin American populations which may have a diverse ancestry and genetic backgrounds. In addition, although the association structure between PRS and lipid-related phenotypes has been replicated in the general population [16,17], its applicability in individuals with FH is less clear. Therefore, we aim to test whether the PRS scores of 12 and 6 SNPs apply to Brazilian FH cases and what are their clinical implications. For that we have tested the association of PRS with cholesterol levels and preclinical and clinical manifestations of atherosclerosis in individuals that had been submitted to genetic FH cascade screening and in a subgroup of participants of the ELSA-Brasil study.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

We analyzed 684 non-related adults included in the Hipercol-Brasil, the largest FH genetic cascade screening program in Latin America with around 5000 patients enrolled [18], conducted at the Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology at the Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the local institutional review boards (Ethics Committee CAPPesq number 3757/12/013). All subjects signed an informed consent form. HipercolBrasil program inclusion criteria were LDL-C ≥ 210 mg/dL, and exclusion criteria were triglycerides ≥ 400 mg/dL, liver failure, nephropathy, uncontrolled hypothyroidism, and infection by the HIV [18].

As a comparative group, we analyzed 1605 healthy adults from the ELSA-Brasil (Brazilian Longitudinal Study of Adult Health) study, a multicenter cohort composed of individuals aged between

35 and 74 years old from six public research institutions in different regions of Brazil. The main objective of the ELSA-Brasil is to investigate the incidence, progressions, and risk factors for chronic diseases, particularly cardiovascular diseases and diabetes [19]. For the present analysis, we have only used participants from the ELSA-Brasil Sao Paulo site, the same city in which HipercolBrasil has ascertained FH cases.

2.2. Genetic sequencing

Next-generation sequencing (NGS) was performed in all selected subjects in two different ways. Four hundred forty samples were sequenced using an AmpliSeq panel on Ion Torrent PGM platform (Thermo Fisher) that included *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, and *LIPA* genes and 10 of the 12 SNPs presented in the PRS. The two remaining SNPs were genotyped using a TaqMan assay (Thermo Fisher) in a QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System.

The other 244 samples were sequenced through the SureSelect QXT panel by Agilent Technologies, including all genes of the AmpliSeq panel plus the *ABCG5*, *ABCG8*, *APOE*, and *STAP1* genes and the 12 SNPs of the PRS.

In participants where no genetic variants associated with FH were found, MLPA (MRC-Holland) was performed to screen for the presence of copy number variations in the *LDLR* gene.

Population databases GnomAD and ABraOm (Brazilian Online Mutation Database) were used to assess the frequency of variants. *In silico* predictions were also verified, using SIFT, PolyPhen-2, and PROVEAN algorithms. HGMD and ClinVar literature databases were consulted. Variant classification was made according to the ACMG recommendations.

The group that had no identified causal variant was classified as FH/M– (n = 491) and the group in which a unique pathogenic or likely-pathogenic variant was found was classified as FH/M+ (n = 193). Variants of uncertain significance (VUS) were not considered in this study.

Control subjects were genotyped through Axiom™ Precision Medicine Research Array (Thermo Fisher) using the GeneTitan MultiChannel system, following manufacturer's instructions.

2.3. Polygenic risk score calculation and analysis

The polygenic risk score was performed for each FH group (FH/M– and FH/M+) and in the control group (ELSA-Brasil). The score was calculated with a weighted sum of the risk alleles (the allele associated with increased LDL-C levels) where the weights used were the β -coefficient of each SNP reported by the GLGC [11]. In all groups, the PRS was performed with both 12 and 6 SNPs.

For the LDL-C distribution analysis among the scores, we divided it into tertiles. If available, baseline LDL-C was used, and for statins and/or ezetimibe users we adjusted the LDL-C concentration multiplying the LDL-C values by the coefficient correction 1.43, as previously described [20]. To compare the occurrence of CVD with the value of PRSs in each group, the scores were divided into quartiles.

To investigate the response to pharmacological treatment according to the PRS, we analyzed the LDL-C reduction in individuals in the FH groups through the difference between the LDL-C value at baseline (no treatment) and after pharmacological treatment with statins and/or ezetimibe.

2.4. Coronary artery calcium (CAC) measurement

A CAC score was available in 1497 subjects of the control group, 81 in the FH/M– group, and 32 subjects in the FH/M+. Scans were performed on a 64-slice multi-detector computed tomography

(MDCT) scanner (Philips Brilliance; Philips, Netherlands), with a standard technique for CAC scoring, including prospective acquisition in mid-diastole; 120 KVp tube voltage; and variable current based on body mass index. CAC was measured according to the Agatston method of area-density product summation. The total CAC score was obtained by adding the individual lesion area-density products from all epicardial coronary arteries. This method is both reliable and reproducible, with low interscan variability [21].

2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R 3.6.1. An initial descriptive analysis was carried out in the groups. Categorical variables are described as frequencies. To compare the difference between those, we used the Chi-square test. For quantitative variables with non-normal distribution, median and first and third interquartile range were calculated, and data analyzed with Mann–Whitney *U* test to compare the medians. For comparison of more than two groups, Kruskal Wallis test was used, with multiple post-hoc test comparison.

Linear regression was used to assess the association between LDL-C levels and polygenic scores among the groups and control subjects. Statistical significance was considered at a *p*-value <0.05.

2.6. Patients and public involvement

Patients and public were not involved in the design, conduct and concept of our study.

3. Results

3.1. Subjects characteristics

Six hundred and eighty-four individuals with a clinical diagnosis of FH were analyzed. One hundred and ninety-three subjects were in the FH/M+ group and 491 individuals were in the FH/M– group. The clinical and laboratory characteristics of these subjects and the 1605 individuals in the control group are listed in Table 1. FH/M– patients had a higher proportion of women and older individuals when compared to the other two groups (*p* < 0.001). Significant differences were also observed in body mass index (*p* = 0.01) and all the measured laboratory values between groups (*p* < 0.001). LDL-C values without lipid-lowering treatment (baseline) was available in 466 individuals of FH groups. Among these individuals, the positive group had a higher frequency of pharmacological treatment at enrolment when compared with the individuals in the FH/M– group (*p* = 0.004), and there was a higher frequency of previous MI in the FH/M+ group (*p* = 0.01), but no statistical differences were observed regarding stroke and myocardial revascularization (Table 1).

3.2. Polygenic risk score

The 12 and 6 SNPs present in the PRS and their respective weights and frequencies are described in Table 2. As a result of simple linear regression and Pearson correlation performed in the control group, we observed a significant association between LDL-C and both scores: 12 SNPs PRS: Adjusted $R^2 = 0.044$ *p* < 0.001 (Fig. 1) and 6 SNPs PRS: Adjusted $R^2 = 0.046$, *p* < 0.001 (Supplementary Figure 1). We did not observe significant differences regarding the effect size of the derived PRS and LDL-C among the different self-referred ancestry in the Brazilian population in the 12 SNPs PRS. However, in the third tertile of the 6 SNPs PRS, we observed a significant difference between White and Black groups (Supplementary Table 1).

Once showing that the scores were associated with LDL-C in the general Brazilian population, we verified how the scores differ between the studied groups. The control group had the lowest mean score in both 12 SNPs (33.10 [SD 9.13]) and 6 SNPs PRS (23.03 [SD 8.80]) when compared to the FH groups. The FH/M– group had the highest mean in both weighted scores (12 SNPs PRS mean 38.25 [SD 7.23] and 6 SNPs PRS mean 27.82 [SD 6.87]) followed by the FH/M+ group (12 SNPs PRS mean 36.48 [SD 6.97] and 6 SNPs PRS mean 26.26 [SD 6.66]) (Supplementary Table 2). When compared, the difference between all the groups was statistically significant (*p* < 0.001 in both scores). Fig. 2 shows those comparisons in the 12 SNPs PRS (See Supplementary Figure 2 for results from the 6 SNPs PRS).

As shown in Fig. 3, patients in the highest tertile of the 12 SNPs PRS in the control group had a higher LDL-C value when compared to the lowest tertiles (*p* < 0.001 in the two scores). However, this difference was not observed in the FH groups. In both FH/M– and FH/M+ individuals, the LDL-C value was not statistically different between the tertiles of both scores (FH/M–: 12 SNPs PRS *p* = 0.68; FH/M+: 12 SNPs PRS *p* = 0.55) See Supplementary Figure 3 to 6 SNPs PRS.

As a statistically significant difference was observed in terms of ancestry between groups, we performed a sub-analysis, dividing the individuals into whites and non-whites. Similarly, both white and non-white individuals in the FH group had a higher mean score when compared to the control group (Supplementary Table 3, Supplementary Figure 4).

3.3. Response to pharmacological treatment in the FH group

Of the total individuals in the FH/M– group, 226 (46.02%) had pre- and post-pharmacological treatment LDL-C values, with a mean on-treatment LDL-C value of 121 mg/dL. Likewise, 89 patients in the positive group (46.11%) had pre- and post-pharmacological treatment LDL-C values with an average of 145 mg/dL after treatment. We investigated whether the LDL-C percentage reduction depended on the PRSs and found no significant difference in LDL-C reduction between the tertiles of each score in both groups. (Fig. 4 for 12 SNPs PRS and Supplementary Figure 5 for 6 SNPs PRS).

3.4. Association of PRSs with clinical and preclinical atherosclerosis and manifestations of CVD

CAC score, used as a proxy of preclinical atherosclerosis, was first divided into four different categories: 0, 1–99, 100–400 and, > 400 units. A CAC score of zero was observed in more than 70% of the subjects of the control group, while in the FH groups this frequency was less than 50%. A moderate and severe level of CAC (>100 and > 400, respectively) was detected in 37% of the FH/M+ group, and in about 17% in the FH/M– group (Supplementary Figure 6). Once CAC distributions were non-normal and right-skewed, we performed a binary logistic regression in the control group to determine which quartile of both PRSs had higher risk of developing CVD, using 100 units as a cutoff. After adjustment for age and sex, the OR for having a CAC score >100 was 1.7 (95% CI: 1.01–2.88, *p* = 0.04) in the 4th quartile of the 12 SNPs PRS when compared to the 1st quartile (Table 3). CAC score comparison between quartiles of PRS was not performed in the FH groups because the number of individuals with CAC score >100 in each quartile of the groups was low.

Myocardial infarction, stroke, and myocardial revascularization were defined as previous cardiovascular disease. CVD occurred in a higher proportion in the FH/M+ than the FH/M– group (28.50% and 19.35%, respectively, *p* = 0.012). When adjusted for age, sex, hypertension and smoking habit, FH/M+ subjects had an overall OR of 2.64 (95% CI: 1.66–4.23, *p* < 0.001) of having CVD disease when

Table 1
Characteristics of patients included in the study.

Variables	ELSA-Brasil (n = 1605)	FH/M-(n = 491)	FH/M+ (n = 193)	p-value
Age (years)	50 (45–57)	56 (46–63)	47 (36–58)	<0.001
Female sex, n (%)	868 (54.1)	336 (68.4)	116 (60.10)	<0.001
Self-declared ancestry				0.045
White, n (%)	959 (59.75)	274 (55.80)	115 (59.58)	
Mixed, n (%)	386 (24.05)	87 (17.72)	37 (19.17)	
Black, n (%)	211 (13.15)	39 (7.94)	10 (5.18)	
Indigenous, n (%)	19 (1.18)	7 (1.43)	2 (1.04)	
Asian, n (%)	13 (0.81)	2 (0.41)	2 (1.04)	
Others or nondeclared, n (%)	17 (1.06)	82 (16.70)	27 (13.99)	
Medical history				
Myocardial infarction, n (%)	–	75 (15.27)	46 (23.83)	0.011
Stroke, n (%)	–	21 (4.28)	9 (4.66)	0.988
Myocardial revascularization n (%)	–	25 (5.09)	17 (8.80)	0.099
Hypertension, n (%)	515 (32.09)	216 (43.99)	55 (28.50)	<0.001
Smoking habit				0.002
Current smoker, n (%)	259 (16.13)	65 (13.23)	24 (12.44)	
Former smoker, n (%)	489 (30.47)	143 (29.12)	37 (19.17)	
Never smoke, n (%)	857 (53.40)	276 (56.21)	130 (67.36)	
Laboratory values				
Total Cholesterol (mg/dL)	208 (185–236)	323.5 (305–346)	341.5 (318–394)	<0.001
Triglycerides (mg/dL)	116 (80–164)	156 (114–210)	137.5 (100.5–178.2)	<0.001
HDL-C (mg/dL)	53 (46–63)	50 (42–59.25)	47 (39–55)	<0.001
LDL-C without lipid-lowering therapy	127 (106–150)	239 (223–258)	277 (244–325)	<0.001
LDL-C with lipid-lowering therapy	–	116.5 (94–142)	142 (111–177)	<0.001
Therapies at enrolment**				
Lipid-lowering therapy, n (%)	–	343 (71.45)	158 (82.29)	0.004
Antiplatelet, n (%)	–	128 (26.07)	60 (31.09)	0.232
Antihypertensives, n (%)	–	128 (26.07)	56 (29.01)	0.065
Physical examination				
BMI	26.70 (24.01–29.76)	27.28 (24.28–30.85)	26.73 (23.80–30.71)	0.015
Xanthoma, n (%)	–	10 (2.04)	23 (11.92)	<0.001
Xanthelasma, n (%)	–	40 (8.15)	23 (11.92)	0.162
Corneal arcus, n (%)	–	5 (1.02)	5 (2.59)	0.226
Dutch Lipid Clinic Network Score (DLCNS)				
Definite FH, n (%)	–	44 (8.96)	66 (34.20)	<0.001
Probable FH, n (%)	–	162 (32.99)	75 (38.86)	
Possible FH, n (%)	–	255 (51.94)	39 (20.21)	
Missing information, n (%)	–	30 (6.11)	13 (6.73)	

Abbreviations: BMI – body mass index (kg/m^2); FH – Familial hypercholesterolemia.

Continuous variables with abnormal distribution are expressed as median and quartiles 1 and 3 (Age, Total cholesterol, Triglycerides, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, and BMI). Mann–Whitney *U* test was used to compare the medians between two groups and Kruskal Wallis test was used for three groups comparison.

Categorical variables (Sex, Ancestry, Medical History, Pharmacological Treatment, Smoking Habit, Xanthoma, Xanthelasma, Corneal Arcus and Dutch Lipid Clinic Network Score) are expressed as absolute numbers and percentages. To compare the difference between those variables, we used the Chi-square test.** For lipid-lowering therapy, statins and ezetimibe were considered. ASA (acetylsalicylic acid) and clopidogrel were considered antiplatelet drugs. ACE inhibitors, angiotensin receptor blockers, diuretics, and alpha-blockers were considered antihypertensives.

compared to FH/M– subjects. However, there was no significant difference in the frequency of CVD events between the FH groups in the quartiles of both scores (12 SNPs PRS: $p = 0.371$; 6 SNPs PRS: $p = 0.227$).

4. Discussion

In the present study we analyzed a large Brazilian FH cohort for two LDL-C polygenic risk scores reported by Talmud et al. [10] and observed that the subjects who have an FH phenotype but no identified genetic variants in the FH canonical genes have a higher mean PRS, followed by individuals who have a positive genetic diagnosis. Thus, suggesting that hypercholesterolemia in some individuals may have a polygenic rather than a monogenic cause. Moreover, even in the FH/M+ group, elevated LDL-C may have an additional polygenic component, once this group also showed significantly higher PRSs than controls. Our findings are similar to the ones from other studies in individuals with different ancestries [10,22]. Of notice, in our work, PRS was associated with LDL-C concentrations in the Brazilian general population as well as

preclinical manifestations of atherosclerosis. However, in people with the FH phenotype no association was encountered with the latter and with response to lipid lowering pharmacological therapy. Our results extend these findings for a Latin American population, as well as, for a new range of clinically related traits in FH.

Both scores showed a moderate association with LDL-C in the control group. In this cohort, the linear regression coefficient showed that those models were able to explain about 4% of the overall LDL-C variability. Possibly, the allele frequency among different ethnics groups explains why this value was lower than the observed in a British cohort, where the regression model explained about 11% of this variability [10], but higher than the observed in a Korean cohort, where about 2% of LDL-C was explained by the regression model [14]. Naturally, the major limitation of this study is the use of SNPs identified using mainly European samples. Gratton et al. (2022) [15] demonstrated that this PRS had better performance in individuals with UK Black and Caribbean and White ancestries than Asians individuals and proposed the hypothesis of the adoption of a specific-ethnic decile cut-off value than a general one. Likewise, as shown by Toft-Nielsen and colleagues [23], FH

Table 2
List of genotyped SNPs associated with an increased LDL-c.

SNP	Gene	Minor Allele	Common Allele	GLGC weight	Minor Allele Frequency			6 SNPs PRS
					ELSA-Brasil (n = 1605)	FH/M+ (n = 193)	FH/M-(n = 491)	
rs2479409	<i>PCSK9</i>	G	A	2.01	0.358	0.388	0.400	
rs629301	<i>CELSR2</i>	G	T	5.65	0.244	0.166	0.180	Yes
rs1367117	<i>APOB</i>	A	G	4.05	0.241	0.285	0.317	Yes
rs4299376	<i>ABCG8</i>	G	T	2.75	0.271	0.290	0.311	Yes
rs1564348	<i>SLC22A1</i>	C	T	0.56	0.163	0.184	0.178	
rs1800562	<i>HFE</i>	A	G	2.22	0.020	0.020	0.014	
rs3757354	<i>MYLIP</i>	T	C	1.43	0.246	0.280	0.224	
rs11220462	<i>ST3GAL4</i>	A	G	1.95	0.101	0.109	0.120	
rs8017377	<i>NYNRIN</i>	A	G	1.14	0.348	0.399	0.373	
rs6511720	<i>LDLR</i>	T	G	6.99	0.134	0.111	0.058	Yes
rs429358	<i>APOE</i>	C	T	–	0.139	0.153	0.215	Yes
rs7412	<i>APOE</i>	T	C	–	0.070	0.023	0.018	Yes
ε2ε2	<i>APOE</i>			–34.75	0.007	0	0.008	
ε2ε3	<i>APOE</i>			–15.45	0.107	0.041	0.012	
ε2ε4	<i>APOE</i>			–7.72	0.02	0.005	0.004	
ε3ε3	<i>APOE</i>			0	0.624	0.601	0.556	
ε3ε4	<i>APOE</i>			3.86	0.225	0.207	0.305	
ε4ε4	<i>APOE</i>			7.72	0.017	0.031	0.045	

Abbreviations: SNP - Single Nucleotide Polymorphism; GLGC - Global Lipid Genetic Consortium; Minor Allele Frequency (MAF). Risk Alleles are in bold. *APOE* weights were based on haplotypic effects. The weights reported by GLGC are in mg/dL.

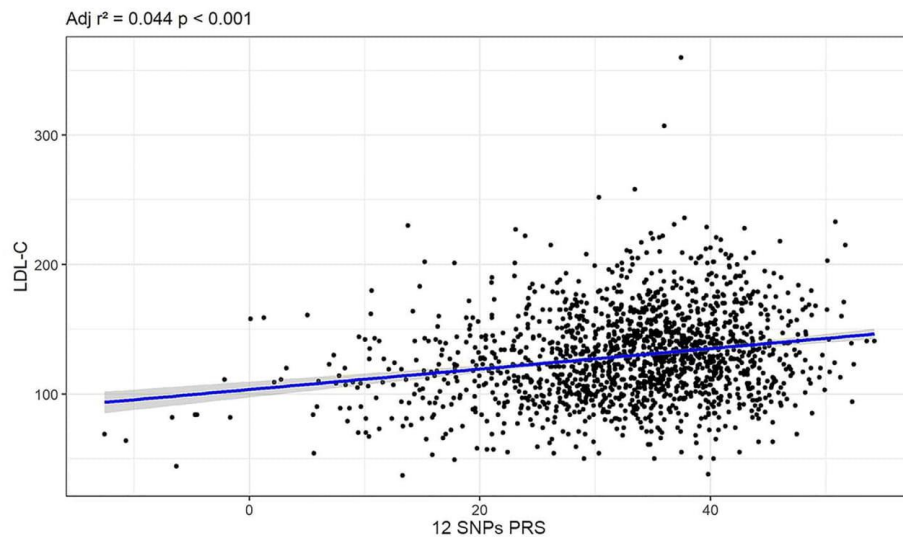


Fig. 1. Association between 12 SNPs PRS and LDL-C in individuals from the ELSA-Brasil group.

prevalence diverge among different ancestries, being more prevalent in Black and White than Asian individuals.

Additionally, it is necessary to assess the need to develop more accurate PRSs, using different sets of SNPs. Wu and colleagues [24] developed a PRS that explained 21% of LDL-C variability in a Caucasian British population. Nonetheless, when validating the score in non-Caucasian individuals, the predictive performance of the score decreased, indicating that PRSs must be calibrated when applied to different ancestries. Although we have used the effect estimates originally described, we also determined the β-coefficients using individuals of the control group for comparison (Supplementary Table 4). Vrablik et al. [25] showed that the impact

of SNPs associated with lipids fractions detected by GWAS may diverge in different populations, where the same variant can have different effects on the phenotype. However, we did not observe major differences in minor allele frequencies values among our population and others (Supplementary Table 5).

We did not observe LDL-C difference between the tertiles of both scores in individuals in the FH groups but only in the control population. Unlike our research, most studies that assess the applicability of these scores use cohorts with a milder FH phenotype, with LDL-C around 190 mg/dL or following the DLNC or Simon Broome criteria [10,13,26]. The stricter inclusion criterion of LDL-C >210 mg/dL may have disfavored the LDL-C association with the

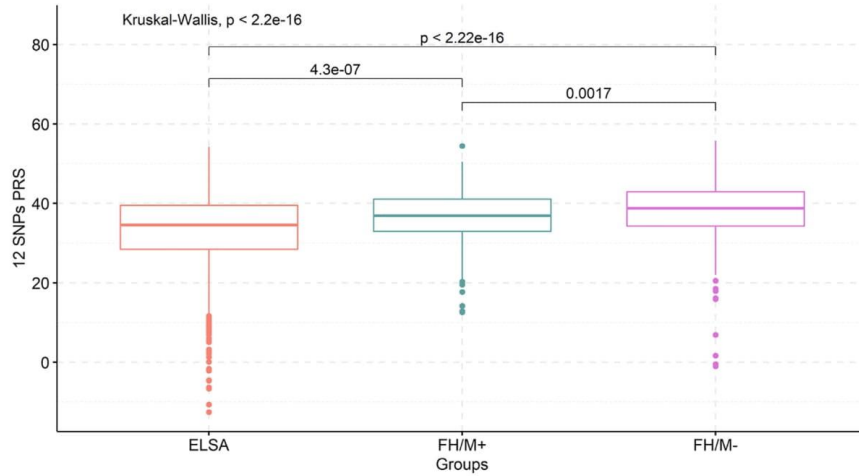


Fig. 2. Comparison of mean value 12 SNPs PRS between ELSA-Brazil, FH/M+ and FH/M – groups.

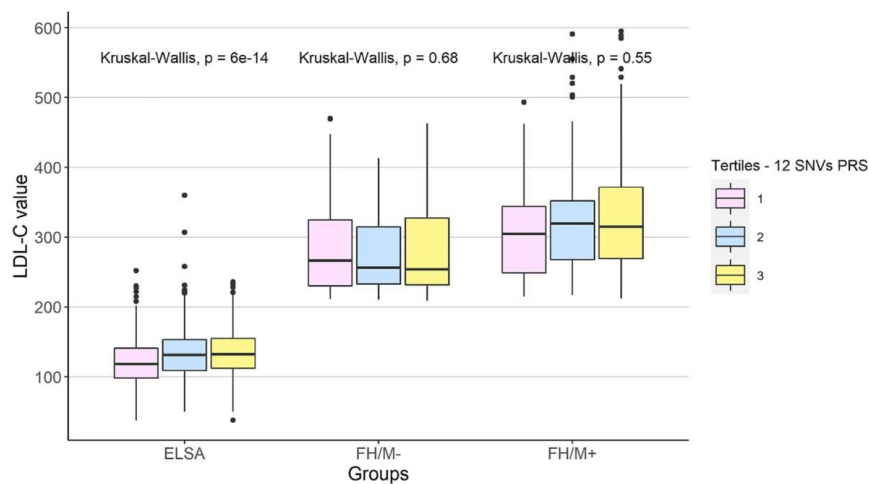


Fig. 3. Distribution of LDL-C value between tertiles of 12 SNPs PRSs in each study group.

score tertiles, in contrast to the current literature.

Mickiewicz et al. [27] showed that individuals with polygenic dyslipidemia had a better response to low doses of statin than individuals with monogenic dyslipidemia. Furthermore, other studies showed that the presence and type of genetic variant directly influenced LDL-C reduction since FH/M – individuals had a greater response to statins [28,29]. When investigating if lipid-lowering therapy efficiency was associated with the PRSs, we did not observe any correlation between LDL-C reduction with treatment and PRSs regardless of the presence or absence of a genetic mutation or the baseline LDL-C value.

Multiple studies have shown that CAC score of zero indicates

low CVD risk, while CAC >100 is associated with a significant increase in event rate even in populations with FH, being a good surrogate of the severity of preclinical atherosclerosis [30,31]. In the present study, we have shown that subjects of the general population in the 4th quartile of the 12 SNPs PRS had a 74% increased odds of having CAC > 100 and consequently, a greater chance of clinical atherosclerotic events. However, CAC data were not available for all individuals in the FH group, being thus a limitation in the current analysis.

The risk of developing atherosclerosis and of having a CVD event has also been shown to be proportional to the long-term exposure to high LDL-C values and the presence of pathogenic genetic

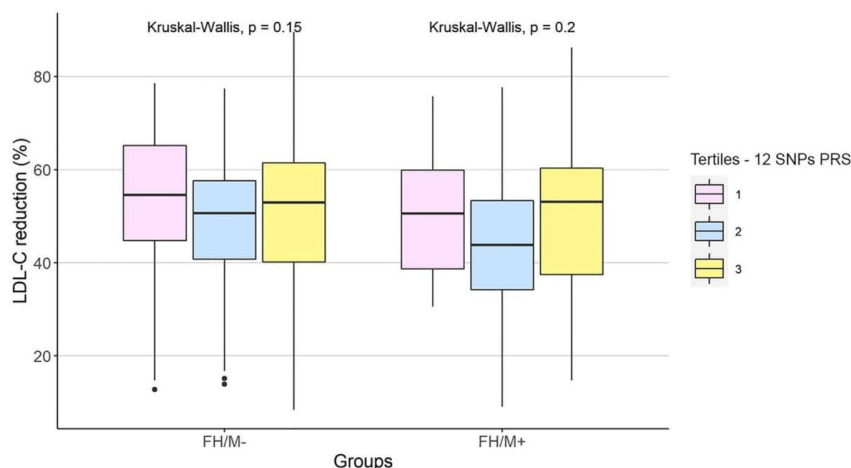


Fig. 4. Percentage of LDL-C reduction (LDL-C post treatment minus LDL-C at baseline) after lipid-lowering therapy with statins and/or ezetimibe in the FH groups according to the tertiles of 12 SNPs PRS.

Table 3

Association between the quartiles of the 12 SNPs PRS and CAC score >100 in the ELSA-Brasil control group after adjustment for age and sex.

Variables	Quartile	OR	95% CI	p-value
	1	Ref	–	–
	2	1.45	0.85, 2.48	0.2
	3	1.27	0.75, 2.17	0.4
	4	1.70	1.01, 2.88	0.047
OR for the trend		1.15	0.98, 1.36	0.086
Age		1.14	1.12, 1.17	<0.001
Sex				
Female		Ref	–	–
Male		6.00	4.03, 9.13	<0.001

Abbreviations – OR: Odds Ratio; CI: Confidence Interval.

Dependent variable: CAC score > 100. Independent variables: 12 SNPs PRS Quartiles. Logistic regression model intercept: -10.77, p-value: <0.001.

variation, as previously shown by our group and others [32–34]. Since the FH/M+ group had a higher mean LDL-C and an expectedly higher cumulative exposure, we could also expect that this group would have an increased frequency of CVD than the FH/M–, as shown in this study. Trinder et al. [26] pointed that subjects who had only elevated FH polygenic risk score had a similar risk than patients with no FH-causing variant and a low polygenic score, but patients with both monogenic FH and high polygenic score had the highest risk of premature CVD when compared to subjects who have only a monogenic cause. Likewise, other groups also demonstrated a higher risk of CVD in individuals with high PRS, confirming the polygenic contribution to the phenotypes and its clinical implications [35,36]. However, we did not observe a significant association between PRS and higher odds of CVD, or sub-clinical atherosclerosis, within each FH group. Probably the reduced statistical power due to the limited sample size hindered our ability to identify a predictive role for LDL-C PRS in this specific clinical scenario. Nonetheless, a PRS specific for CVD, as opposed to only LDL-C, could be more useful for cardiovascular risk stratification in FH as previously suggested and ascertained [35,37].

Further studies are necessary to validate PRSs in the Latin American FH populations and to clarify why a proportion of

patients in the FH/M– group, even having high values of LDL-C, still do not have either a monogenic or polygenic cause identified. The availability of numerous GWAS can allow the improvement of a more comprehensive PRS, with greater risk stratification power and applicability [38]. Also, some other genes may be involved in the genetics of FH, such as *APOE*, *STAP1* and *LIPA*, but the exact contribution of those genes remains unclear [39]. In the present study, 35% of the subjects in the two FH groups had a complete screening of those genes, excluding this possibility as an explanation for the low yield of molecular testing in FH. On the contrary, our results support the proposition that a significant fraction of people with the FH phenotype are, indeed, individuals with polygenic hypercholesterolemia.

The main study limitations are its cross-sectional design, the small number of individuals with the FH phenotype and CAC scores; the use of a subsample of participants from the ELSA-Brasil study and not the whole cohort; and the replacement in NGS technology, once not all subjects were sequenced using the same panel. Furthermore, the lack of information about the type, dosage, and duration of pharmacological treatment in the FH groups is also a limitation of the study.

We conclude that this is the first study to evaluate two PRSs associated with dyslipidemia as a risk assessment tool in a Latin American sample of FH individuals. Our study showed that subjects with the FH phenotype, but in whom no causal genetic variant was identified had a higher mean PRS when compared to FH/M+ and control groups. In addition, despite not predicting LDL-C levels, CVD events or atherosclerosis in the FH population, the 12 SNPs PRS has been shown to be a risk predictor of preclinical atherosclerosis in the general population.

Financial Support

IRL has received a scholarship from Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES) #88887.531079/2020-00. RDS is recipient of a scholarship from Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico, Brazil (CNPq) #303734/2018-3. The ELSA-Brasil baseline study was

supported by the Brazilian Ministry of Health (Science and Technology Department) and the Brazilian Ministry of Science and Technology (Financiadora de Estudos e Projetos and CNPq National Research Council). The funding of Sociedade Hospital Samaritano and Ministério da Saúde (PROADI-SUS; SIPAR: 25000.180.672/2011-81) are gratefully acknowledged.

Author contributions

IRL conceptualized and designed the study, researched data, performed experiments and wrote the manuscript. IRL and MTT were responsible for carrying out the genetic tests, analyzed and interpreted the results. ACP and TGMO assisted with the data analysis. ACP and CEJ were responsible for the HipercolBrasil program and assisted with the data collection. IB and PA were responsible for the ELSA-Brasil program and assisted with the data collection. RDS gave clinical support, acquired data and drafted the manuscript. ACP and JEK supervised the work. All authors reviewed the manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: RDS has received honoraria related to consulting, research and or speaker activities from: Abbott, Amgen, Aché, Astra Zeneca, Esperion, EMS, GETZ Pharma, Kowa, Libbs, Merck, MSD, Novo-Nordisk, Novartis, PTC Therapeutics, Pfizer, Roche and Sanofi.

IRL has received a scholarship from Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES) #88887.531079/2020-00. RDS is recipient of a scholarship from Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico, Brazil (CNPq) #303734/2018-3. The ELSA-Brasil baseline study was supported by the Brazilian Ministry of Health (Science and Technology Department) and the Brazilian Ministry of Science and Technology (Financiadora de Estudos e Projetos and CNPq National Research Council).

Acknowledgments

The authors thank the staff and participants of the Hipercol Brasil and ELSA-Brasil for their important contributions to the science.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.athplu.2022.06.002>.

References

- [1] Santos RD, 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;4:850–61.
- [2] Singh S, Bittner V. Familial hypercholesterolemia—epidemiology, diagnosis, and screening. *Curr Atherosclerosis Rep* 2015;17.
- [3] Harada PH, Miname MH, Benseñor IM, Santos RD, Lotufo PA. Familial hypercholesterolemia prevalence in an admixed racial society: sex and race matter. *The ELSA-Brasil. Atherosclerosis* 2018;277:273–7.
- [4] Raal FJ, Hovingh GK, Catapano AL. Familial hypercholesterolemia treatments: guidelines and new therapies. *Atherosclerosis* 2018;277:483–92.
- [5] Alves A C atarina, Etxebarria A, Soutar A K atherine, Martin C, Bourbon M. Novel functional APOB mutations outside LDL-binding region causing familial hypercholesterolemia. *Hum Mol Genet* 2014;23:1817–28.
- [6] Iacocca MA, et al. ClinVar database of global familial hypercholesterolemia-associated DNA variants. *Hum Mutat* 2018;39:1631–40.
- [7] Stroom TB, Tveten K, Leren TP. Pcsk9 acts as a chaperone for the ldl receptor in the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 2014;457:99–105.
- [8] Taylor A, et al. Mutation detection rate and spectrum in familial hypercholesterolaemia patients in the UK pilot cascade project. *Clin Genet* 2010;77:572–80.
- [9] Silva PRS, et al. Evaluation of clinical and laboratory parameters used in the identification of index cases for genetic screening of familial hypercholesterolemia in Brazil. *Atherosclerosis* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.06.917>.
- [10] Philippa* J Talmud, Shah* Sonia, Whittall Ros, Futema Marta, Howard Philip, Cooper Jackie A, Harrison Seamus C, Li KaWah, Drenos Fotios, Karpe Frederik, Neil H Andrew W, Descamps Olivier S, Langenberg Claudia, Lench Nicholas, Kivimaki Mika, John Whittaker SEH. Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: a case-control study. *Lancet* 2013;381:1302–11.
- [11] Teslovich TM, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 2010;466:707–13.
- [12] Futema M, Bourbon M, Williams M, Humphries SE. Clinical utility of the polygenic LDL-C SNP score in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2018;277:457–63.
- [13] Futema M, et al. Refinement of variant selection for the LDL cholesterol genetic risk score in the diagnosis of the polygenic form of clinical familial hypercholesterolemia and replication in samples from 6 countries. *Clin Chem* 2015. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.231365>.
- [14] Kwon M, et al. Evaluation of polygenic cause in Korean patients with familial hypercholesterolemia - a study supported by Korean Society of Lipidology and Atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.06.053>.
- [15] Gratton J, Finan C, Hingorani AD, Humphries SE. LDL-C concentrations and the 12-SNP LDL-C score for polygenic hypercholesterolemia in self-reported south Asian. In: Black and Caribbean Participants of the UK Biobank. 13; 2022. p. 1–9.
- [16] Klarin D, et al. Genetics of blood lipids among ~300,000 multi-ethnic participants of the Million Veteran Program. *Nat Genet* 2018;50:1514–23.
- [17] Kathiresan S, et al. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat Genet* 2009;41:56–65.
- [18] Jannes CE, et al. Familial hypercholesterolemia in Brazil : cascade screening program , clinical and genetic aspects. *Atherosclerosis* 2015;238.
- [19] Aquino EML, et al. Brazilian longitudinal study of adult Health (ELSA-Brasil): objectives and design. *Am J Epidemiol* 2012;175:315–24.
- [20] Trinder M, Francis GA, Brunham LR. Association of monogenic vs polygenic hypercholesterolemia with risk of atherosclerotic cardiovascular disease. *JAMA Cardiol* 2020;1–10. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2019.5954>.
- [21] Agatston AS, et al. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:827–35.
- [22] Durst R, et al. Molecular genetics of familial hypercholesterolemia in Israel—revisited. *Atherosclerosis* 2017;257:55–63.
- [23] Toft-nielsen F, Emanuelsson F, Benn M. Familial hypercholesterolemia prevalence among ethnicities — Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Genet* 2022;13:1–10.
- [24] Wu H, Forgetta V, Zhou S, Bhatnagar SR, Paré G. Polygenic risk score for low-density lipoprotein cholesterol is associated with risk of ischemic heart disease and enriches for individuals with familial hypercholesterolemia. 2021. p. 88–96. <https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.120.003106>.
- [25] Vrablik M, et al. Genetics of familial hypercholesterolemia: new insights. *Front Genet* 2020;11:1–10.
- [26] Trinder M, et al. Risk of premature atherosclerotic disease in patients with monogenic versus polygenic familial hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2019;74:512–22.
- [27] Mickiewicz A, et al. Higher responsiveness to rosuvastatin in polygenic versus monogenic hypercholesterolaemia: a propensity score analysis. *Life* 2020;10.
- [28] Santos PCJL, et al. Presence and type of low density lipoprotein receptor (LDLR) mutation influences the lipid profile and response to lipid-lowering therapy in Brazilian patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2014;233:206–10.
- [29] Kim H, et al. GENetic characteristics and REsponse to lipid-lowering therapy in familial hypercholesterolemia: GENRE-FH study. *Sci Rep* 2020;10:1–8.
- [30] Blaha MJ, Silverman MG, Budoff MJ. Clinical risk scores are not sufficient to define primary prevention treatment strategies among asymptomatic patients. *Circ Cardiovasc. Imaging* 2014;7:398–408.
- [31] Grundy SM, et al. AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APHA/ASPC/NLA/PCNA guideline on the management of blood cholesterol: a report of the American college of Cardiology/American heart association task force on clinical practice guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2018;73:e285–350. 2019.
- [32] Khera AV, et al. Diagnostic yield and clinical utility of sequencing familial hypercholesterolemia genes in patients with severe hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2016;67:2578–89.
- [33] Coutinho ER, et al. Familial hypercholesterolemia and cardiovascular disease in older individuals. *Atherosclerosis* 2021;318:32–7.
- [34] Starr B, et al. Development of sensitive and specific age- and gender-specific low-density lipoprotein cholesterol cutoffs for diagnosis of first-degree relatives with familial hypercholesterolemia in cascade testing. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:791–803.
- [35] Hegele RA, Baass A, Brunham LR. Polygenic contribution to low-density lipoprotein cholesterol levels and hypercholesterolemia. 2020. p. 515–23. <https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.120.002919>.

- [36] D'erasmo L, et al. Clinical implications of monogenic versus polygenic hypercholesterolemia: long-term response to treatment, coronary atherosclerosis burden, and cardiovascular events. *J Am Heart Assoc* 2021;10.
- [37] Paquette M, et al. Polygenic risk score predicts prevalence of cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia. *J. Clin. Lipidol.* 2017: 725–32. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2017.03.019>.
- [38] Cupido AJ, Tromp TR, Hovingh GK. The clinical applicability of polygenic risk scores for LDL-cholesterol: considerations, current evidence and future perspectives. *Curr Opin Lipidol* 2021;32:112–6.
- [39] Alonso R, Isla L P de, Muñiz-Grijalvo O, Luis Diaz-Diaz J, Mata P. Familial hypercholesterolaemia diagnosis and management. *Eur Cardiol* 2018;13: 14–20.