

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular**

***TRIAGEM CLÍNICA E BIOQUÍMICA E DIAGNÓSTICO DE DEFICÊNCIA DE LIPASE  
ÁCIDA EM PACIENTES DE ALTO RISCO***

**CAMILA MATZENBACHER BITTAR**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani**

***Porto Alegre, Fevereiro de 2014***

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Serviço de Genética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) em parceria com as Redes Apoio ao Diagnóstico de Erros Inatos do Metabolismo e os ambulatórios de Genética Médica, Gastroenterologia (adulto e pediátrico) e Dislipidemia. O estudo foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do HCPA. Todos os experimentos apresentados nesta dissertação estão incluídos em projeto de pesquisa aprovado por seus aspectos éticos e metodológicos pelos comitês de ética e pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número 11-0373 (anexo 3).

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Roberto Giugliani, pela eficiente orientação em todas as etapas deste trabalho e pelo apoio persistente e positivo.

À Dra. Sandra Vieira e sua equipe pela ajuda na busca de pacientes e pelo incentivo para a realização deste trabalho.

Aos grandes amigos que fizeram parte desta caminhada comigo e que tanto me impulsionaram, colaborando para que eu pudesse chegar até aqui.

Às Enfermeiras Taiane Vieira, Andressa Federhen e Debora Pereira pela ajuda em todas etapas.

À toda minha família, em especial ao Andrei pelo amor e apoio e à Lívia Sumi que tornou tudo mais especial

Aos pacientes por aceitarem participar.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	7
ABSTRACT.....	8
CAPITULO I - INTRODUÇÃO .....	9
I.1. ERROS INATOS DO METABOLISMO .....	10
I.2. DOENÇAS LISOSSÔMICAS DE DEPÓSITO .....	10
I.3. DEFICIÊNCIA DE LIPASE ÁCIDA .....	12
I.3. DOENÇA DE DEPÓSITO DE ÉSTERES DE COLESTEROL.....	15
CAPÍTULO II - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....	18
II.1. JUSTIFICATIVA .....	19
II.2 OBJETIVO PRIMÁRIO .....	20
II.3. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS .....	20
CAPÍTULO III - MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
III.1 CASUÍSTICA .....	22
III.1.1 DESENHO DO ESTUDO .....	22
III.1.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO .....	22
III.1.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	22
III.1.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	23
III.1.5 TAMANHO DA AMOSTRA .....	23
III.2 MÉTODOS.....	23
III.2.1 LOGÍSTICA DO ESTUDO .....	24
III.2.2 PROTOCOLO LABORATORIAL .....	25
III. 2.2.1 DESCRIÇÃO DO ENSAIO ENZIMÁTICO DE LIPASE ÁCIDA EM LEUCÓCITOS: 25	
III. 2.2.2 DESCRIÇÃO DO MÉTODO PARA ENSAIO ENZIMÁTICO DE LIPASE ÁCIDA EM SANGUE SECO EM PAPEL FILTRO: .....	25
CAPÍTULO IV - RESULTADOS.....	27

IV.1 PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS LABORATORIAIS DA LAL: .....	28
IV.2 IDENTIFICAÇÃO DOS PACIENTES E CASOS SUSPEITOS DE DDEC: .....	30
CAPÍTULO V. DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS .....	34
CAPÍTULO VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
ANEXOS .....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABCA1</b>	<i>ATP-binding cassette transporter A1</i>
<b>ALT</b>	Alanina Transaminase
<b>ApoB</b>	Apolipoproteína B
<b>AST</b>	Aspartato Transaminase
<b>DDEC</b>	Doença de Depósito de Ésteres de Colesterol
<b>DGFNA</b>	Doença Gordurosa do Fígado Não-Alcoólica ( <i>NAFLD</i> )
<b>DLA</b>	Deficiência de Lipase Ácida
<b>DLD</b>	Doença Lisossômica de Depósito
<b>EHNA</b>	Esteatohepatite Não-Alcoólica ( <i>NASH</i> )
<b>EIM</b>	Erros Inatos do Metabolismo
<b>HDL</b>	Lipoproteína de Alta Densidade
<b>HMGCoA</b>	Hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase 3
<b>LA</b>	Lipase Ácida
<b>LAL</b>	Lipase Ácida Lisossomal
<b>LDL</b>	Lipoproteína de Baixa Densidade
<b>LIPA</b>	Gene que codifica a Lipase Ácida Lisossômica

## RESUMO

A Doença de Depósito de Ésteres de Colesterol (DDEC) é uma Doença Lisossômica de Depósito, herdada de modo autossômico recessivo, causada pela deficiência da enzima Lipase Ácida (LA). Essa enzima, quando deficiente, resulta na redução da hidrólise de ésteres de colesterol e triglicerídios levando ao acúmulo progressivo de ésteres de colesterol nos lisossomos, apresentando-se como doença de depósito em diversos órgãos, particularmente o fígado, mas também no baço, glândulas adrenais, nódulos linfáticos da mucosa intestinal, endotélio vascular e músculo. Além disso, pode-se encontrar, como achados laboratoriais, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e deficiência de HDL. Hepatomegalia, no entanto, pode apresentar-se como único e mais precoce sinal da doença. Há poucos relatos de casos no Brasil com o diagnóstico de DDEC e, o Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, um serviço de referência em diagnóstico de doenças lisossômicas, não possuía registro de casos com esse diagnóstico. Foi padronizada a técnica para medir a atividade da LA em leucócitos e sangue impregnado em papel filtro com o objetivo de encontrar casos suspeitos e diagnosticar DDEC. Foram analisadas 50 amostras de pacientes que preenchiam critérios de inclusão, tendo sido diagnosticado um caso positivo para deficiência de LA. Como os sinais e sintomas da DDEC são muitas vezes sutis e inespecíficos, um alto grau de suspeição é necessário para aumentarmos o diagnóstico desta doença pouco conhecida e possivelmente sub-diagnosticada.

## ABSTRACT

The Cholesterol Ester Storage Disease (CESD) is an autosomal recessive lysosomal storage disease, caused by the deficiency of the Acid Lipase enzyme (AL). This enzyme, when deficient, results in the reduced hydrolysis of cholesterol esters and triglycerides leading to a progressive accumulation of cholesterol esters in lysosomes, presenting as storage disease in many organs, particularly the liver, but also in spleen, adrenal glands, lymph nodes, intestinal mucosa, muscle and vascular endothelium. Furthermore, as laboratory findings, it can present with hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, and HDL deficiency. Hepatomegaly, however, can present as single early sign of the disease. The Medical Genetics Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre lacked the technique to diagnose CESD, and, therefore, had no reported cases with the diagnosis. A technique for measuring the activity of LA in leukocytes and in dried blood spots was standardized in order to screen and diagnose suspected cases of CESD. We analyzed 50 samples from patients who met inclusion criteria and diagnosed one positive case for AL deficiency. As the signs and symptoms of CESD are often subtle and nonspecific, a high index of suspicion is necessary for us to increase the diagnosis of this less known and potentially underdiagnosed disease.

## **CAPITULO I - INTRODUÇÃO**

## **I.1. ERROS INATOS DO METABOLISMO**

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são um conjunto de doenças caracterizadas por uma deficiência no funcionamento do metabolismo, herdadas, geralmente, de modo recessivo, sendo, em sua maioria, autossômicas. Garrod, em 1908, criou essa expressão para descrever doenças determinadas geneticamente, causadas por um defeito bioquímico específico que leva a um bloqueio em vias metabólicas, com conseqüente acúmulo de substrato ou deficiência de um produto (Carakushansky, 2001). Considera-se que cerca de 10% das patologias genéticas podem ser caracterizadas como EIM, por defeito na síntese, degradação, transporte ou armazenamento de moléculas biologicamente ativas. Com o avanço das técnicas de análise laboratorial, novas patologias decorrentes de defeitos metabólicos específicos vêm sendo crescentemente descritas. Ainda que individualmente raros, os EIM são frequentes em conjunto, tendo uma incidência estimada ao redor de um para cada 1000 nascimentos (Carakushansky, 2001; Clarke, 2006). Assim, é importante que o médico esteja familiarizado com a apresentação clínica desses distúrbios, com sua adequada investigação laboratorial, com o melhor manejo de emergência para estabilização dos pacientes gravemente doentes e com a identificação daqueles que podem se beneficiar de tratamentos específicos. (Giugliani et al., 1991; Wajner, Vargas, Burin, Giugliani, & Coelho, 2001)

## **I.2. DOENÇAS LISSÔMICAS DE DEPÓSITO**

Os lisossomos são organelas vesiculares com função de digestão intracitoplasmática. Estão presentes em todas as células, porém são mais abundantes nas fagocitárias, como os macrófagos e os leucócitos. As enzimas hidrolíticas presentes nos lisossomos são segregadas no retículo endoplasmático rugoso e transportadas para o aparelho de Golgi, onde são empacotadas nas vesículas. As macromoléculas a serem digeridas são introduzidas por meio da fagocitose, a fim de serem degradadas. Os catabólitos originados da digestão intralissossomal difundem-se através da membrana e entram no citosol onde são utilizados

pele metabolismo celular. As enzimas lisossômicas degradam diversos substratos, como os glicosaminoglicanos, esfingolípídios, glicolípídios e glicoproteínas (Figura 1). (Brum, Speck-Martins, & Pinto de Oliveira Rizzo, n.d.; Junqueira & Carneiro, 2004)

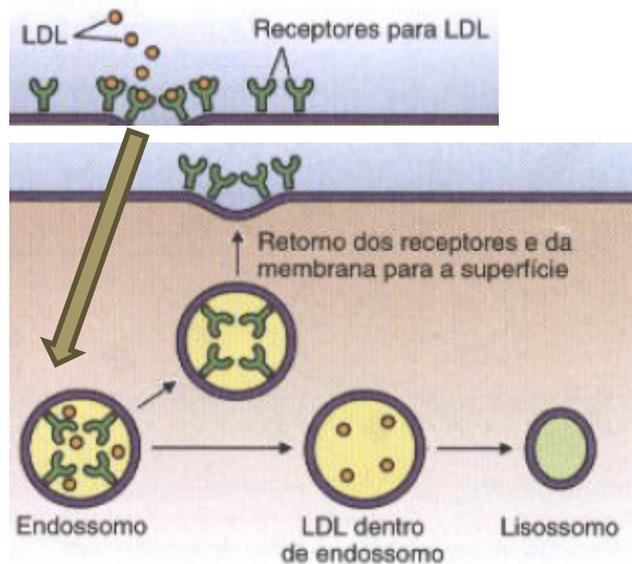


Figura 1. O caminho da digestão intracitoplasmática: Fagocitose da macromolécula (uma lipoproteína de baixa densidade – LDL) com auxílio dos receptores, formando um endossomo, retorno dos receptores para a superfície e encontro do endossomo com o lisossomo para posterior degradação. Adaptado de Junqueira e Carneiro, 2004.

As Doenças Lisossômicas de Depósito (DLD) são um grupo de EIM causados por deficiência de enzimas lisossômicas que podem estar envolvidas na degradação, armazenamento e transporte de macromoléculas, levando ao acúmulo progressivo de seus substratos (usualmente polímeros complexos que não podem ser normalmente hidrolisados), com ação tóxica e desorganizadora dos componentes celulares. Há, portanto, um subsequente acúmulo nos lisossomos de tecidos, incluindo o sistema nervoso central, fígado, baço, articulações e ossos, entre outros. Em geral, os sintomas das DLD iniciam-se após o período neonatal e são usualmente permanentes, progressivos, independentem de eventos intercorrentes e não têm ligação com ingestão de alimentos (Clarke, 2006; Giugliani et al., 1991; Meikle, 1999; Neufeld, 1991).

Estima-se que, em conjunto, tenham uma prevalência de um para cada 5000 nascimentos (Fuller M, Meikle PJ, 2006).

### I.3. DEFICIÊNCIA DE LIPASE ÁCIDA

A Lipase Ácida é uma enzima lisossômica que quando deficiente resulta na redução da hidrólise de ésteres de colesterol e triglicerídios levando ao acúmulo progressivo de ésteres de colesterol nos lisossomos, apresentando-se como doença de depósito em diversos órgãos, particularmente o fígado.

O gene da lipase ácida lisossomal (*LIPA*) localiza-se no braço longo do cromossomo 10 (10q23.2-q23.3) e contém 10 exons. Mutações no gene causam a deficiência da enzima Lipase Ácida Lisossômica (LAL - ou hidrolase de ésteres de colesterol). A Deficiência de Lipase Ácida (DLA) é uma DLD, herdada de forma autossômica recessiva (D'Agostino D, Bay L, Gallo G, 1998; Lohse P, Maas S, Sewell AC, van Diggelen OP, 1999).

A primeira mutação identificada no gene da LAL mostrou a substituição de uma guanina por uma adenina na posição -1 do exon 8 (E8SJM – exon 8 splice junction mutation), alterando o splicing do exon 8 gerando uma proteína truncada. (Chatrath, Keilin, & Attar, 2009; Grabowski, Charnas, & Du, 2012)

Essa enzima é essencial para a hidrólise intracelular de triglicerídeos e de ésteres de colesterol que foram internalizados via endocitose mediada por receptor de partículas de lipoproteínas (Champe, 2009; Muntoni et al., 2007). A atividade catalítica da enzima transforma um éster de colesterol + água em um colesterol livre + ácido graxo (figura 2). (Nakagawa, Matsubara, Kuriyama, & Yoshidome, 1995).

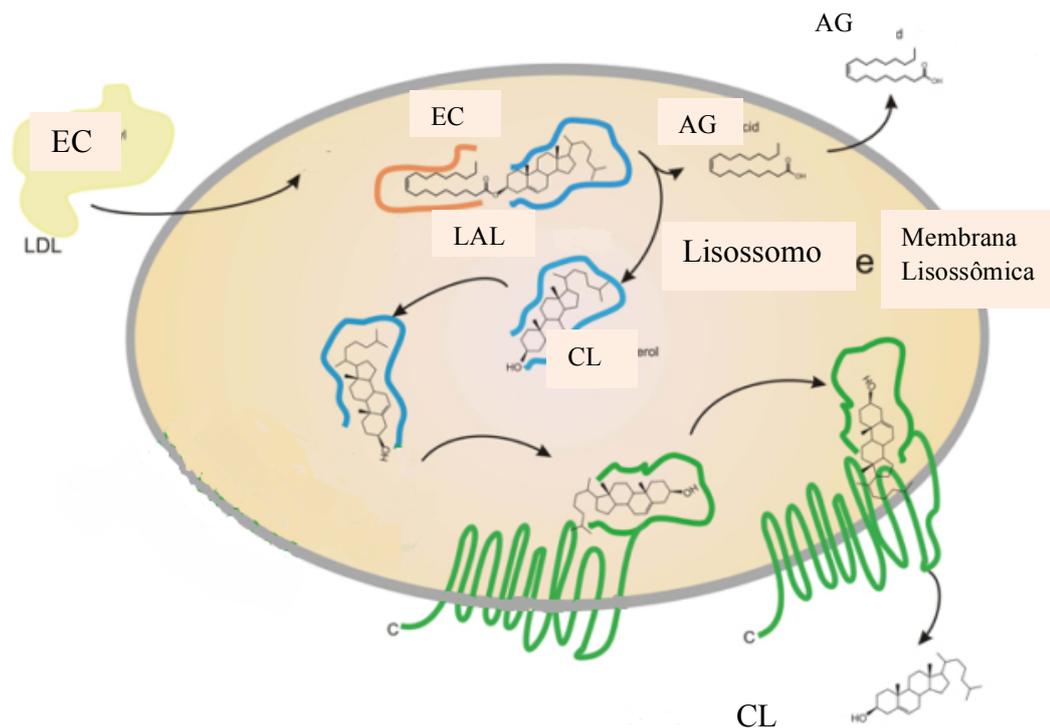


Figura 2: Atividade catalítica da LAL. Endocitose do éster de colesterol (EC), com subsequente hidrólise pela Lipase Ácida Lisossômica (LAL) transformando os EC em Ácido Graxo (AG) + Colesterol Livre (CL) que posteriormente são liberados do lisossomo. Modificado de Scriver's Online Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease (2012).

O defeito enzimático resulta em uma redução da hidrólise de ésteres de colesterol e triglicerídios e leva a um acúmulo progressivo nos lisossomos das células hepáticas assim como em outras células do sistema macrofágico. A consequente diminuição do colesterol livre leva a uma diminuição do *feedback* inibitório da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMGCoA) redutase, levando a um aumento na síntese de colesterol assim como estimulando a síntese da apolipoproteína B (ApoB) e receptores de LDL nas membranas. A expressão alterada do gene transportador dependente de Colesterol LDL (ABCA1 - *ATP-binding cassette transporter A1* - proteína transmembrana responsável pelo efluxo celular de colesterol e fosfolipídios que é um passo essencial para o transporte reverso do colesterol e para a biogênese da HDL) contribui para a redução do Colesterol HDL. As alterações metabólicas levam, portanto às manifestações clínicas da doença: aumento do Colesterol total, Colesterol LDL e triglicerídeos com diminuição do colesterol HDL. (Elleder M, Chlumská A, Ledvinová J, 2000; Elleder et al., 2000; Pisciotta et al., 2009; vom Dahl et al., 1999)

Portanto, a sua falta resulta no acúmulo significativo de ésteres de colesterol nos lisossomos, apresentando-se como doença de depósito em diversos órgãos, particularmente o fígado, mas também no baço, glândulas adrenais, nódulos linfáticos da mucosa intestinal, endotélio vascular e músculo. Além disso, pode-se encontrar, como achados laboratoriais, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e deficiência de HDL (Anderson, Bryson, & Parks, 1999; Bernstein, Hülkova, Bialer, & Desnick, 2013).

A DLA leva a um espectro de doenças que é classicamente dividido em duas (figura 3):

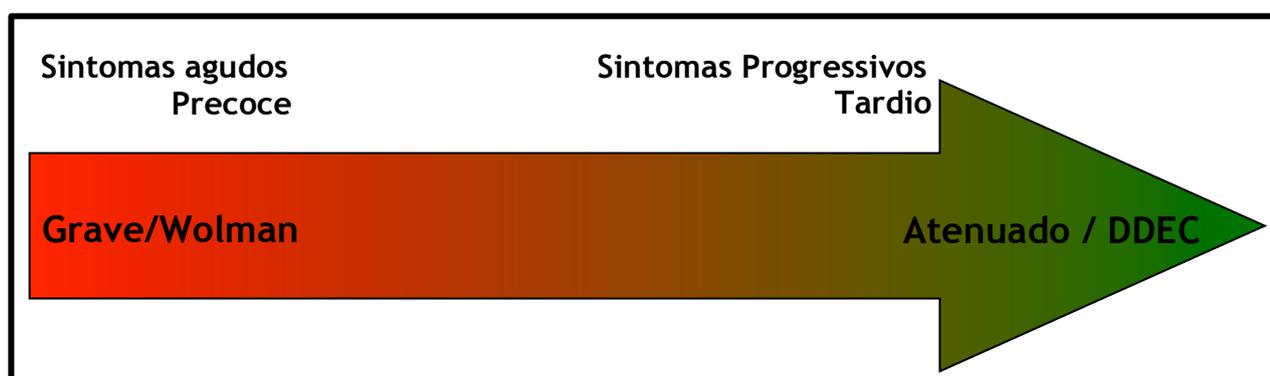


Figura 3. Espectro clínico da Doença de Wolman e DDEC.

- Doença de Wolman: é a forma mais grave e precoce da doença, caracterizando-se por deficiência completa da enzima, a qual leva a um acúmulo precoce e maciço de ésteres de colesterol e triglicerídeos, em especial no fígado, mas presente no baço, adrenal, medula óssea, linfonodo e macrófagos em geral, particularmente no vilo intestinal. Os sintomas se manifestam nas primeiras semanas de vida com hepatoesplenomegalia, esteatorréia, distensão abdominal, deficiência de crescimento e calcificação nas adrenais. O quadro geralmente progride para o óbito dentro do primeiro ano de vida. (Boldrini, Devito, Biselli, Filocamo, & Bosman, 2004; Grabowski et al., 2012; Valles-Ayoub et al., 2011).
- Doença de Depósito de Ésteres de Colesterol (DDEC): é a forma mais atenuada da doença, caracteriza-se pela presença de atividade residual da enzima. Esta doença leva a um acúmulo mais tardio, com manifestações clínicas variáveis, muitas vezes, sutis. A grande maioria dos pacientes descritos até o momento é portadora da mutação E8SJM.

Esta doença será detalhadamente descrita abaixo. (Chatrath et al., 2009; D'Agostino D, Bay L, Gallo G, 1998; Elleder et al., 2000)

### **I.3. DOENÇA DE DEPÓSITO DE ÉSTERES DE COLESTEROL**

A DDEC é uma doença que frequentemente não é reconhecida, pois apresenta manifestações clínicas variáveis, muitas vezes sutis que podem aparecer na infância, adolescência ou idade adulta dependendo da atividade residual da LAL (que geralmente varia entre 1 a 12% do normal). O acúmulo progressivo de ésteres de colesterol e triglicerídeos resulta em alteração hepática (depósito de lipídios e consequente hepatomegalia), elevação das transaminases e alteração do perfil lipídico (Colesterol LDL e triglicerídeos elevados com HDL baixo). (Anderson *et al.*, 1999; Tanaka, 1995)

Bernstein e colaboradores, em um estudo de revisão com 135 pacientes, avaliaram as manifestações clínicas, idade em que iniciaram os sintomas, exames laboratoriais (colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos e enzimas hepáticas), atividade enzimática da LAL, mutação no gene *LIPA* e tratamento. A revisão mostrou que, dentre os pacientes, 55% eram mulheres, a prevalência maior era de europeus (65%), enquanto os latino-americanos representaram 10% da amostra. A média de idade ao início dos sintomas foi entre três e 12 anos para 62% dos casos e 11% dos pacientes manifestaram os sintomas durante adolescência e idade adulta, sendo que dois pacientes foram diagnosticados durante necropsia. A apresentação clínica mais significativa era hepatomegalia (presente em 99,3% dos casos), Alanina Transaminase (ALT) e/ou Aspartato Transaminase (AST) elevadas (100%), esplenomegalia (74%), Colesterol total elevado (79%) e HDL diminuído (com níveis entre 8 e 50mg/dL) (88%). Outras manifestações encontradas eram decorrentes da doença de base: Manifestações hepáticas como esteatose microvesicular hepática com progressão para cirrose micronodular e suas consequências (hipertensão portal, ascite, varizes esofágicas, sangramento gastrointestinal, caquexia e falência hepática); Manifestações gastrointestinais como diarreias frequentes, dores abdominais e epigástricas; Manifestações cardiovasculares como doença arteriosclerótica coronariana, aneurisma, acidente vascular cerebral. A morte precoce pode ocorrer devido

à progressão da doença hepática e/ou doença arteriosclerótica secundária à dislipidemia. (Bernstein *et al.*, 2013).

Em geral, quanto mais afetado e mais precocemente o paciente demonstra sinais e sintomas, o diagnóstico é feito com maior precisão e rapidez do que pacientes com DDEC que evoluem com uma progressão mais lenta da doença hepática. (Pisciotta *et al.*, 2009). A biópsia hepática geralmente revela uma cor marcante amarelo-alaranjado, hepatócitos e macrófagos como células espumosas carregadas de lípido, e os cristais de ésteres de colesterol, melhor observado por exame ultraestrutural. No entanto, é necessário o conhecimento desta doença para buscar estas alterações, e, muitas vezes, a biópsia hepática pode ser diagnosticada como EHNA (esteatohepatite não alcoólica), DGFNA (doença hepática gordurosa não alcoólica), ou cirrose criptogênica. Como o diagnóstico é difícil, é provável que muitos pacientes adultos com DDEC estejam sendo erroneamente classificados como tendo DGFNA, EHNA, ou doença hepática criptogênica ou permanecem sem diagnóstico (Chatrath *et al.*, 2009; Gasche *et al.*, 1997; Hůlková & Elleder, 2012).

A DDEC é uma doença pan-etnica, no entanto, não tem sua incidência conhecida. Muntoni e colaboradores (2007), na Alemanha, através de um rastreamento populacional da mutação E8SJM, encontraram uma frequência de heterozigotos estimada em um a cada 100 indivíduos, indicando uma prevalência estimada de DDEC de um a cada 40.000 indivíduos. Estima-se que há uma grande disparidade entre os casos esperados e relatados, indicando que há uma parcela significativa de pacientes com DDEC não diagnosticados. Na República Checa, onde a taxa de natalidade é de apenas 13% da registrada na Alemanha, foram identificados cinco pacientes com DDEC menores de 18 anos de idade, o que sugere que a familiaridade clínica e patológica com a doença tem o potencial de aumentar a taxa do diagnóstico (Chatrath *et al.*, 2009; Lohse P, Maas S, Sewell AC, van Diggelen OP, 1999; Muntoni *et al.*, 2007)

Não há ainda um tratamento específico para essa doença. As medidas de tratamento sintomático incluem uso de colestiramina e estatinas (para diminuir o colesterol e a síntese da ApoB), e, em casos de insuficiência hepática, transplante hepático. Terapia de reposição enzimática com LAL recombinante se mostrou efetiva em modelos animais e,

recentemente, um estudo clínico fase I/II demonstrou segurança e potencial eficácia.  
(Bernstein *et al.*, 2013)

## **CAPÍTULO II - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

## II.1. JUSTIFICATIVA

O Serviço de Genética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM/HCPA) é um serviço de referência em doenças lisossômicas no Brasil; contando com redes de apoio ao diagnóstico de Erros Inatos do Metabolismo. No entanto, até o início deste trabalho o SGM/HCPA não dispunha da técnica para diagnóstico de DLA, e não tinha, portanto, registro de casos com esse diagnóstico. Levando-se em consideração que a DDEC é uma doença rara e que pode se apresentar de forma heterogênea e, muitas vezes, inespecífica, podemos inferir que possivelmente seja uma doença pouco considerada em casos menos graves e que, na maioria das vezes, não chegam a ser encaminhados para uma investigação diagnóstica específica. Cabe ressaltar que não estava ainda disponível, nesse laboratório e no Brasil de uma maneira geral, o procedimento bioquímico específico para o diagnóstico de deficiência de lipase ácida. Como a doença tem consequências potencialmente graves e considerando que um tratamento específico para a mesma está sendo desenvolvido, o diagnóstico mais precoce dessa doença possibilitaria um manejo que conduziria à modificação da sua história natural, bem como o aconselhamento genético às famílias.

## **II.2 OBJETIVO PRIMÁRIO**

O objetivo geral do presente estudo consistiu em prospectar pacientes com suspeita de DDEC (apresentando duas manifestações clínicas da doença) atendidos em ambulatórios específicos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre ou por amostras de pacientes com suspeita de DLD (apresentando uma ou mais manifestações clínicas da doença) recebidas via redes de apoio ao diagnóstico de Erros Inatos do Metabolismo.

## **II.3. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

- 3.2.1. Padronizar a técnica de medida da atividade enzimática de LA em amostras de leucócitos e em sangue impregnado em papel filtro no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do HCPA.
- 3.2.2. Medir a atividade enzimática de lipase ácida em amostras de pacientes com suspeita de DDEC, estabelecendo o diagnóstico nos casos com atividade deficiente dessa enzima.
- 3.2.3. Estimar a frequência de DDEC entre os pacientes que apresentam uma ou mais manifestações clínicas da doença.

## **CAPÍTULO III - MATERIAIS E MÉTODOS**

### III.1.1 DESENHO DO ESTUDO

Tratou-se de um estudo transversal, no qual foram avaliados pacientes em acompanhamento em ambulatórios específicos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Genética Médica, Gastroenterologia, Dislipidemia). Além disso, foram incluídas amostras de pacientes recebidas via redes de apoio ao diagnóstico de Erros Inatos do Metabolismo com suspeita de DLD.

### III.1.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Todos os pacientes atendidos em ambulatórios específicos do HCPA (Genética Médica, Gastroenterologia, Dislipidemia), e os pacientes que tiveram amostras encaminhadas via redes de apoio ao diagnóstico de EIM, que preencheram os critérios de inclusão.

### III.1.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os critérios clínicos e/ou laboratoriais para inclusão no estudo estão relacionados a seguir e também no Anexo 1. Os pacientes incluídos deveriam apresentar pelo menos dois critérios, sem que tivessem um diagnóstico já estabelecido.

- ✓ **Hepatomegalia sem etiologia definida;**
- ✓ **Hipercolesterolemia (com níveis de LDL elevados)**
- ✓ **Níveis de HDL abaixo do limite inferior**
- ✓ **Testes de função hepática alterados e/ou fibrose hepática e/ou esteatose microvesicular e/ou cirrose hepática, sem etiologia definida**

- ✓ **Sinais sugestivos, em exame anatomopatológico, de células hepáticas vacuolizadas ou espumosas**
- ✓ **História familiar positiva para o(s) mesmo(s) sinais e/ou sintomas**
- ✓ **Consanguinidade entre os pais**
- ✓ **Doença hepática de início na infância**
- ✓ **Esplenomegalia associada à hepatomegalia**
- ✓ **Linfoadenopatia e/ou linfonodos aumentados**
- ✓ **Má Absorção**
- ✓ **Colesterol Total Elevado e/ou Triglicerídeos Elevados**

#### **III.1.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Pacientes com diagnóstico de DDEC já estabelecido ou com outro diagnóstico que justifique a manifestação clínica apresentada.

#### **III.1.5 TAMANHO DA AMOSTRA**

Muntoni e colaboradores (2007) encontraram, na Alemanha, uma prevalência de DDEC estimada de 25 por um milhão de indivíduos. Essa estimativa encontrada é um aparente conflito entre o número de casos reportados na literatura, podendo indicar que a doença está sendo pouco considerada e diagnosticada. Por tratar-se de uma doença muito rara, a amostra foi de conveniência, não tendo sido estabelecido previamente um número amostral.

### **III.2 MÉTODOS**

### III.2.1 LOGÍSTICA DO ESTUDO

Pacientes atendidos nos ambulatórios de Genética, Gastroenterologia ou Dislipidemia do HCPA, no período de agosto de 2012 a março de 2013, foram avaliados em relação à presença de sinais e sintomas sugestivos de DDEC. Amostras de pacientes com suspeita de DLD recebidas, neste período, via redes de apoio ao diagnóstico de EIM também foram analisadas.

- Os pacientes do HCPA foram avaliados em consultas de rotina nos ambulatórios específicos (genética, gastroenterologia, dislipidemia) nos quais foi divulgado o estudo. A divulgação do estudo foi realizada através de cartazes nos ambulatórios específicos e continham as informações referentes aos sinais e sintomas sugestivos de DDEC, (Anexo 4).
- Para pacientes do HCPA com suspeita clínica ou laboratorial de DDEC, foi oferecida a possibilidade de participação no estudo. Os pacientes que aceitaram, foram solicitados a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2).
- Os pacientes que consentiram em participar do estudo foram encaminhados ao Centro de Pesquisa Clínica e tiveram uma amostra de sangue coletada para realização do ensaio enzimático no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Serviço de Genética Médica do HCPA.
- Foi solicitado consentimento para armazenamento da amostra de sangue para possíveis estudos futuros. Caso esses estudos venham a se desenvolver, será solicitado novo consentimento dos pacientes para uso dessas amostras. Para isso, foi solicitado endereço e telefone de contato dos pacientes;
- Para amostras de pacientes recebidas via Redes de apoio ao Diagnóstico de EIM (onde já há consentimento para participação de pesquisa), com suspeita de DLD, foram analisadas no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Serviço de Genética Médica do HCPA;
- Os resultados obtidos no laboratório foram enviados para o médico assistente para comunicação ao paciente;
- No caso em que foi confirmado o diagnóstico de DDEC, os pesquisadores orientaram os médicos assistentes sobre o manejo dessa condição;

### III.2.2 PROTOCOLO LABORATORIAL

Os controles normais foram obtidos (anonimizados) a partir de amostras de pacientes que estavam realizando exames de rotina que teriam parte da amostra descartada.

Os pacientes (controles positivos) foram cedidos por um laboratório internacional no qual a técnica já é padronizada e por um colega de outro centro do Brasil que teve um paciente diagnosticado no exterior.

#### III. 2.2.1 DESCRIÇÃO DO ENSAIO ENZIMÁTICO DE LIPASE ÁCIDA EM LEUCÓCITOS:

Método Adaptado de Hamilton et al (2012) que descreveram, conforme indicado abaixo, o procedimento para realização do ensaio enzimático para detecção de níveis de LA em leucócitos. Os reagentes principais utilizados são: Lalistat 2 200 $\mu$ M, 4-Metilumbeliferil-Palmitato 13.3mM, Tampão Acetato de Sódio 0,15M pH4 e Cardiolipina 0,5%.

**Procedimento:** Utilizar um volume de leucócitos correspondente a 40 $\mu$ g de proteína em um tubo tipo *ependorf* e diluir até 200 $\mu$ l com água destilada. Agitar e deixar em banho de gelo. Colocar 80 $\mu$ l da diluição em tubo *ependorf* e 20 $\mu$ l de Lalistat 30 $\mu$ M (para ensaio com inibidor). Colocar 80 $\mu$ l da mesma diluição em outro tubo *ependorf* com 20 $\mu$ l de água destilada (para ensaio sem inibidor). Agitar e incubar por 10 minutos, a 37°C em banho de água. Colocar 300 $\mu$ l da solução, tampão/substrato e agitar. Incubar por 30 minutos a 37°C. Adicionar 200 $\mu$ l de Cloreto de Mercúrio 15mM para parar a reação. Ler a fluorescência no espectrofluorômetro, excitação 320 nm - emissão 460 nm. Curva Padrão: Usar 200  $\mu$ l de concentração 0,5, 1, 2 e 3. Adicionar 400 $\mu$ l de Cloreto de Mercúrio e ler.

#### III. 2.2.2 DESCRIÇÃO DO MÉTODO PARA ENSAIO ENZIMÁTICO DE LIPASE ÁCIDA EM SANGUE SECO EM PAPEL FILTRO:

Hamilton *et al*, em 2012, descreveram conforme indicado abaixo o procedimento para realização do ensaio enzimático para detecção de níveis de LA em Papel Filtro. Os principais reagentes

foram: Lalistat 2 200 $\mu$ M, 4-Metilumbeliferil-Palmitato 13.3mM, Tampão Acetato de Sódio 0,15M pH4 e Cardiolipina 0,5%.

**Procedimento:** Utilizar 2 picotes de 3,2mm e adicionar 400 $\mu$ l de água destilada em tubo tipo *eppendorf*. Deixar 1 hora na temperatura ambiente e centrifugar 10 minutos a 3000 rotações por minuto. Colocar 80 $\mu$ l do sobrenadante em tubo *eppendorf* e 20 $\mu$ l de Lalistat 30 $\mu$ M (para ensaio com inibidor). Colocar 80 $\mu$ l do mesmo sobrenadante em outro tubo *eppendorff* com 20 $\mu$ l de água destilada (para ensaio sem inibidor). Agitar e incubar por 10 minutos a 37°C em banho de água. Colocar 300 $\mu$ l da solução, tampão/substrato e agitar. Incubar por 3 horas a 37°C. Adicionar 200 $\mu$ l de Cloreto de Mercúrio 15mM para parar a reação. Ler a fluorescência no espectrofluorômetro, excitação 320 nm - emissão 460 nm. Curva Padrão: Usar 200 ul de concentração 0,5, 1, 2 e 3. Adicionar 400 $\mu$ l de Cloreto de Mercúrio e ler.

## **CAPÍTULO IV - RESULTADOS**

#### IV.1 PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS LABORATORIAIS DA LAL:

A padronização das técnicas em leucócitos e papel filtro foi realizada. Os valores encontrados são mostrados, respectivamente, nos Gráficos 1 e 2 abaixo.

Gráfico 1: Atividade da LAL em leucócitos de pacientes (controles positivos) e controles normais

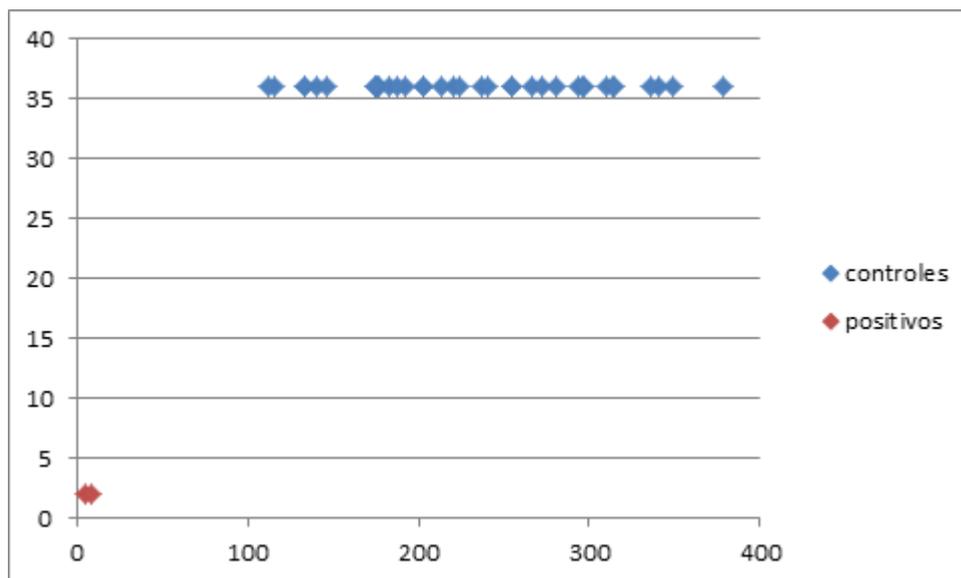
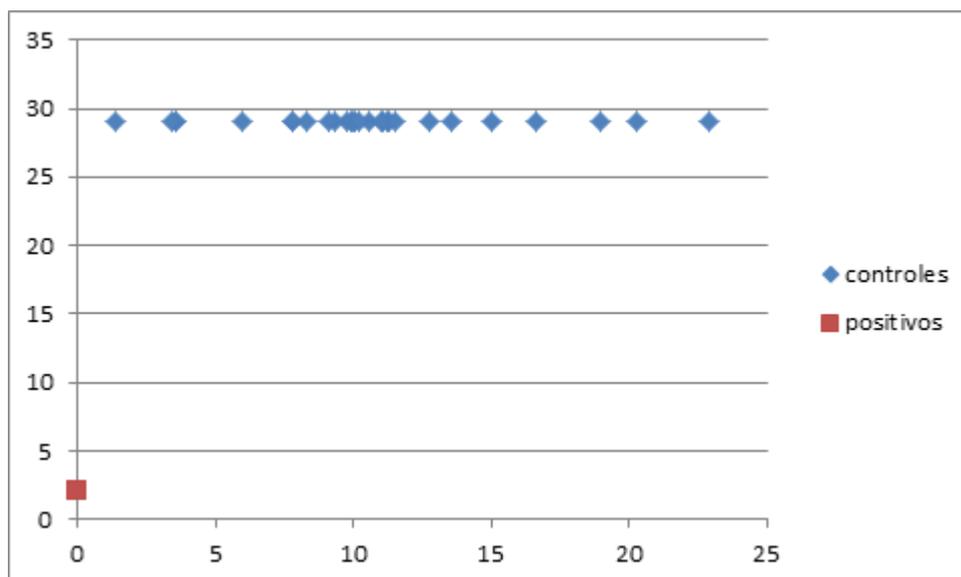


Gráfico 2: Atividade da LAL em sangue impregnado em Papel Filtro de pacientes (controles positivos) e controles normais



Os valores de referência encontrados para a atividade da LA em leucócitos e papel filtro estão descritos nas tabelas 1 e 2, respectivamente:

Tabela 1: Valores de referência para a atividade da LA em leucócitos:

<b>Amostras</b>	<b>“n”</b>	<b>Atividade (nmol/h/mg prot)</b> <b>Intervalo (média ± DP)</b>
Controles Normais	36	112 – 378 (227,89 ± 70,85)
Controles Positivos	2	5,1 – 8,5 (6,8 ± 2,4)

Tabela 2: Valores de referência para a atividade da LA em Papel Filtro:

<b>Amostras</b>	<b>“n”</b>	<b>Atividade (nmol/h/mg prot)</b> <b>Intervalo (média ± DP)</b>
Controles Normais	29	3,6 – 22,9 (10,88 ± 4,056)
Controles Positivos	2	Não detectável

#### IV.2 IDENTIFICAÇÃO DOS PACIENTES E CASOS SUSPEITOS DE DDEC:

Foram identificados 20 pacientes com suspeita clínica de DDEC nos ambulatórios específicos do HCPA. Dentre estes, 14 (70%) eram do sexo masculino e as idades variaram de zero a 60 anos (mediana 16). As características clínicas encontradas nos pacientes identificados são apresentadas na tabela 3.

Tabela 3: Principais sinais e sintomas presentes nos casos com suspeita clínica atendidos em ambulatórios específicos do HCPA:

<b>Sinal/sintoma</b>	<b>Presente (%)</b>
Alteração Enzimas hepáticas (ALT e/ou AST)	17 (85)
Hepatomegalia	12 (60)
Esplenomegalia	9 (45)
Esteatose hepática	9 (45)
Dislipidemia	9 (45)
Biopsia Hepática Alterada (Cirrose, Fibrose ou sugestiva de depósito)	8 (40)
EHNA	4 (20)
Consanguinidade	0 (0)

Foi medida a atividade enzimática em leucócitos e em sangue impregnado em papel filtro desses casos (Gráficos 3 e 4 respectivamente).

Gráfico 3: Atividade enzimática da LAL, em leucócitos, de 16 dos 20 pacientes avaliados em ambulatórios específicos do HCPA:

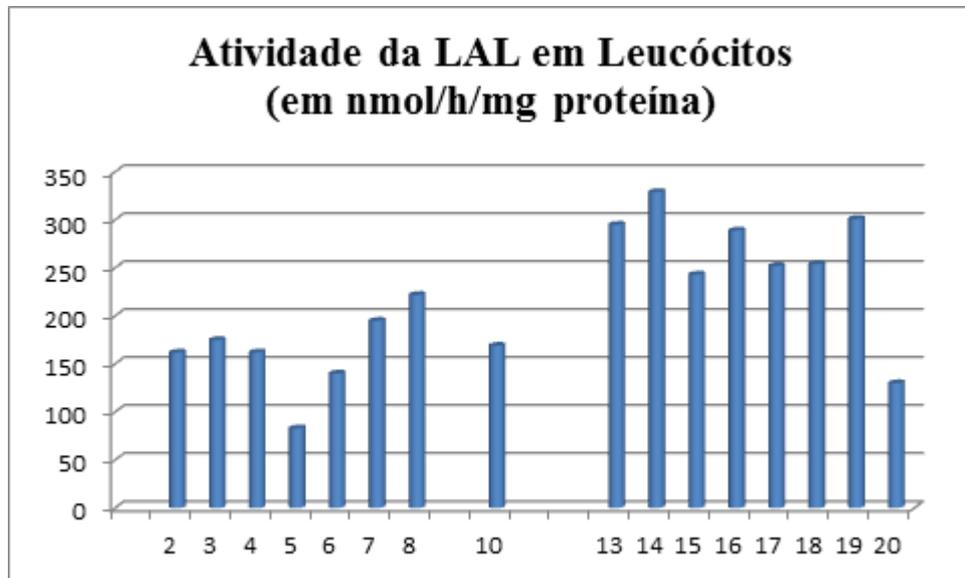
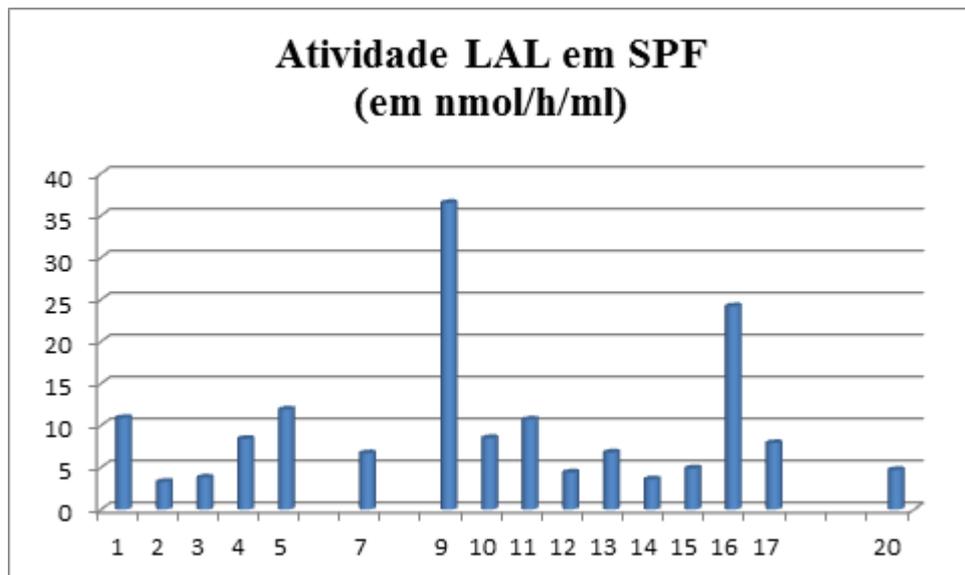


Gráfico 4: Atividade enzimática da LAL, em sangue impregnado em Papel Filtro, de 16 dos 20 pacientes avaliados em ambulatórios específicos do HCPA:



Em nenhum desses pacientes foi encontrado atividade deficiente da enzima em leucócitos (Gráficos 3 e 4).

Das amostras de pacientes encaminhadas via Redes de Diagnóstico foram identificados 30 casos com suspeita clínica de DLD (com manifestação clínica compatível de DDEC). Dezesete dos 30 eram do sexo masculino (56.6%), e as idades variavam entre zero e 34 anos (mediana 2,5). As características clínicas encontradas nos pacientes identificados são apresentadas na tabela 4.

Tabela 4: Principais sinais e sintomas presentes nos 30 casos com suspeita clínica encaminhados para as Redes de Apoio ao Diagnóstico de EIM:

<b>Sinal/sintoma</b>	<b>Presente (%)</b>
Hepatomegalia	22 (73,3)
Alteração de Enzimas Hepáticas (AST e/ou ALT)	10 (33,3)
Esplenomegalia	5 (16,6)
Heterozigotos (história familiar ou consanguinidade)	3 (10%)
Cirrose	2 (6,6)
Biópsia hepática compatível com depósito de ésteres de colesterol	1 (3,3)
Esteatose hepática	1 (3,3)

Foram dosadas as atividades enzimáticas em leucócitos e em sangue impregnado em papel filtro desses pacientes e os resultados estão demonstrados nos gráficos 5 e 6, respectivamente. Em um caso foi encontrada atividade deficiente da enzima, diagnosticando um caso de DDEC.

Gráfico 5: Atividade enzimática da LAL (em leucócitos, medida em nmol/h/mg de proteína) de 24 das 30 amostras de pacientes com achados suspeitos, encaminhadas via Redes de Apoio ao Diagnóstico de EIM:

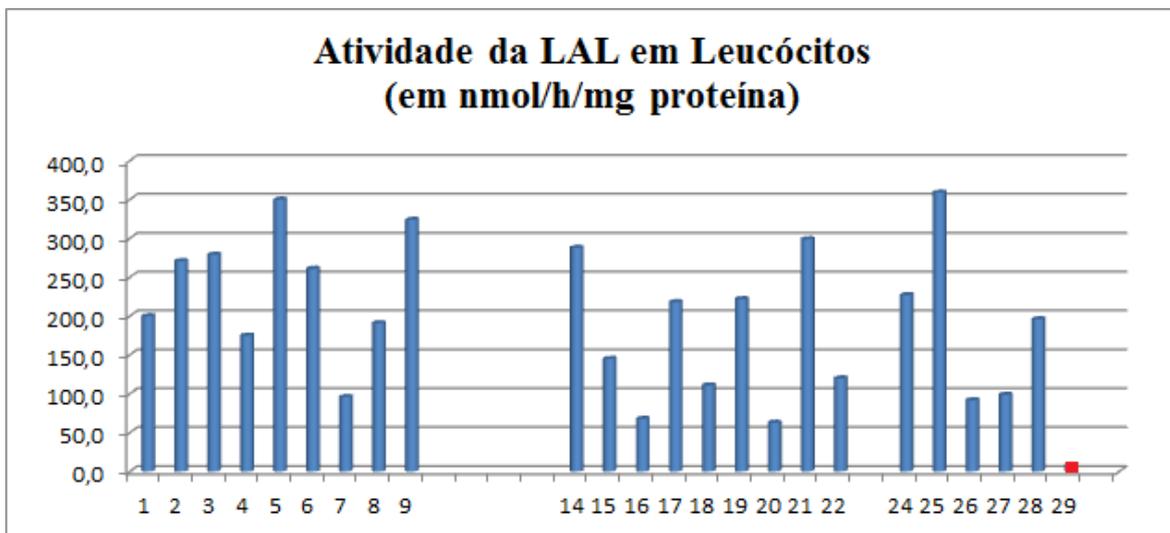
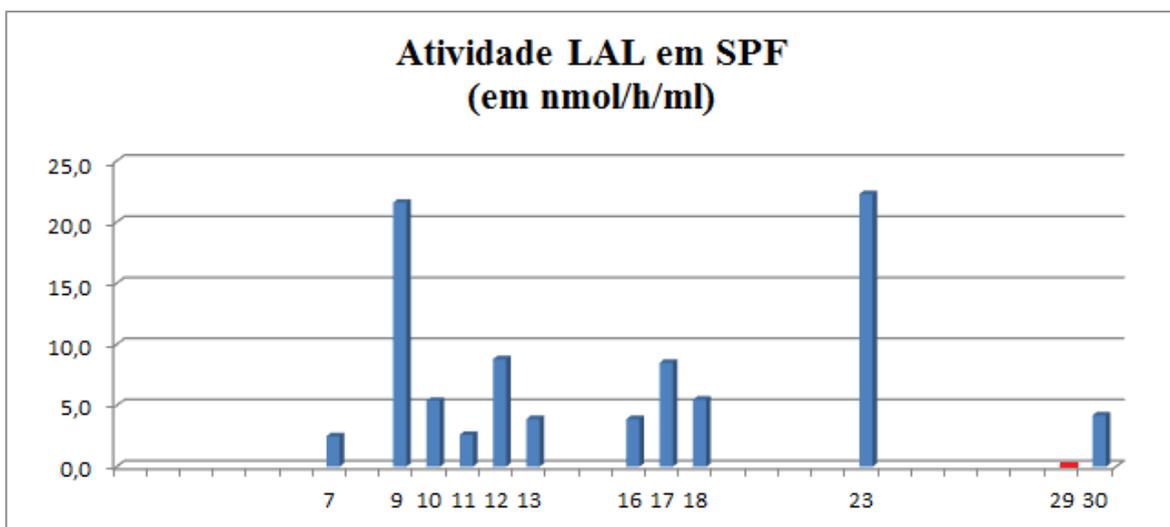


Gráfico 6: Atividade enzimática da LAL (em sangue impregnado em Papel Filtro, medida em nmol/h/ml) de 12 dos 30 amostras de pacientes com achados suspeitos, encaminhadas via Redes de Apoio ao Diagnóstico de EIM:



## **CAPÍTULO V. DISCUSSÃO, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Em relação ao objetivo geral do estudo - *Identificar pacientes com suspeita de DDEC (apresentando pelo menos duas manifestações clínicas da doença) atendidos em ambulatórios específicos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre ou por amostras de pacientes com suspeita de DLD (apresentando uma ou mais manifestações clínicas da doença) recebidas via redes de apoio ao diagnóstico de Erros Inatos do Metabolismo* - E um dos objetivos secundários: - *Medir a atividade enzimática de lipase ácida em amostras de pacientes com suspeita de DDEC e estabelecer o diagnóstico nos casos com atividade deficiente dessa enzima* - cabem os seguintes comentários:

Pacientes provenientes dos ambulatórios do HCPA:

- Nos parece oportuno comentar que, dos vinte pacientes com suspeita de DDEC identificados em ambulatórios específicos do HCPA (seguindo os critérios de inclusão - duas ou mais características - conforme descrito no Anexo 1: Todos apresentavam dois ou mais sintomas característicos da doença, sendo que os sintomas mais prevalentes foram alteração de enzimas hepáticas (85% dos casos), hepatomegalia (60% dos casos), esplenomegalia, esteatose ou dislipidemia (45% dos casos cada), biópsia hepática alterada (cirrose, fibrose ou sugestiva de depósito – 40% dos casos) e EHNA (20% dos casos). Em 50% dos casos, houve associação de hepatomegalia com alteração de enzimas hepáticas. Estes sinais podem ser considerados fortes indicativos para investigação diagnóstica, uma vez que são sintomas previamente relatados na literatura como prevalentes. Em um estudo de revisão com 135 pacientes, a hepatomegalia e a alteração de enzimas hepáticas eram sinais encontrados em 99,3% e em 100% dos casos, respectivamente (Bernstein *et al*, 2013).
- O curto período para busca de casos com sinais e sintomas característicos da doença somado à baixa prevalência da doença dificultaram a identificação de pacientes com pelo menos duas manifestações clínicas da doença. Supõe-se que o pouco conhecimento da doença pelos médicos assistentes e consequente falta de exames complementares também contribuiu para minimizar as chances de encontrar casos com suspeita da doença.

Amostras de pacientes com suspeita clínica encaminhadas às redes de apoio ao diagnóstico de Erros Inatos do Metabolismo:

- Trinta amostras de pacientes com suspeita de DDEC foram recebidas via Redes de Apoio ao Diagnóstico de EIM seguindo os critérios de inclusão (duas ou mais características) conforme descrito no Anexo 1.
- Todos os casos apresentavam 2 ou mais sintomas característicos da doença, sendo que os sintomas mais prevalentes foram alteração de hepatomegalia (73,3% dos casos), alteração de enzimas hepáticas (33,3% dos casos), esplenomegalia (16,6% dos casos), cirrose (6,6% dos casos) e esteatose hepática e biópsia hepática sugestiva de doença depósito de ésteres de colesterol (3,3% dos casos cada). Ao contrário dos casos provenientes do HCPA, nos quais não foi identificada consanguinidade, 10% dos pacientes investigados via Redes de Apoio ao Diagnóstico de EIM apresentavam história familiar positiva e/ou consanguinidade..
- Os gráficos 5 e 6 representam as dosagem da atividade enzimática (em leucócitos e papel filtro, respectivamente) de casos investigados, mostrando que foi detectada atividade deficiente em um dos pacientes.
- Cabe comentar que o paciente diagnosticado apresentou atividade enzimática da LA deficiente (7,0 nmol/h/mg prot) em uma das análises em Leucócitos e atividade Não Detectável em sangue em Papel Filtro. O paciente é do sexo feminino, tinha 2 anos ao diagnóstico, tendo iniciado investigação por hepatomegalia, dificuldade em ganhar peso, esteatose hepática vista em ecografia abdominal, discreto aumento de aminotransferases e aumento moderado do colesterol e triglicerídios sem melhora com dieta hipolipemiante. Foi submetida à biópsia hepática que mostrou marcada esteatose microgoticular e achados histológicos e de microscopia eletrônica sugestivos de doença de Depósito de Ésteres de Colesterol. Atualmente a pacientes está em acompanhamento com o médico assistente, seu quadro é estável e não há análise molecular disponível.

- O período para recebimento de amostras de pacientes com diagnóstico sugestivo da doença também foi curto. O preenchimento incompleto por parte do médico das informações clínicas na ficha de encaminhamento das Redes contribuiu significativamente para aumentar a dificuldade em encontrar casos com suspeita clínica.
- Pela quantidade insuficiente de algumas amostras, nem todos os pacientes tiveram sua atividade de lipase ácida avaliada tanto em leucócitos quanto em papel filtro.

Quanto aos objetivos secundários:

***- Padronizar a técnica para medir a atividade de lipase ácida em amostras de leucócitos e de sangue em papel filtro***

As técnicas tanto em leucócitos quanto em sangue impregnado em papel filtro foram padronizadas com sucesso. Os valores de referência encontrados no LEIM, para leucócitos e sangue impregnado em papel filtro foram, respectivamente 112 a 378 nmol/h/mg prot e 3,6 a 22,9 nmol/h/ml. O método foi realizado respectivamente em 36 e 29 controles e em 2 controles positivos. As atividades enzimáticas foram calculadas em micromole de substrato hidrolisado por hora e por mililitro de sangue para amostras de Sangue impregnado em Papel Filtro ou nanomoles de substrato hidrolisado por hora e por mg de proteína para amostras de leucócitos. A Atividade da LAL foi calculada subtraindo-se a atividade na reação com inibidor da reação sem inibidor. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney U e o teste de Kruskal-Wallis foram usados para medir as diferenças entre os controles e pacientes. Um  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS).

Por tratar-se de uma doença rara, a demora para a obtenção das amostras dos pacientes com atividade deficiente (controles positivos) contribuiu para o atraso no início da padronização da técnica e conseqüente atraso para iniciar busca de possíveis pacientes.

Pela eventual indisponibilidade de conjuntos completos de amostras, nem todas os controles tiveram seu material avaliado simultaneamente tanto em leucócitos quanto em papel filtro.

*- Estimar a frequência de DDEC entre os pacientes que apresentam uma ou mais manifestações clínicas da doença.*

Dentre os 50 pacientes investigados, identificados nos ambulatórios do HCPA e encaminhados via Redes de Apoio, o diagnóstico foi confirmado em um paciente.

Considerando a frequência estimada de heterozigotos (portadores de 1 mutação para DDEC), encontrada em um estudo de rastreamento populacional na Alemanha, de 1 portador para cada 100 indivíduos, Muntoni e colaboradores encontraram um incidência de DDEC estimada de 25 em 1 milhão de nascidos vivos (ou 1 em cada 40.000 nascidos vivos).

Se extrapolarmos a incidência encontrada por Muntoni, deveríamos encontrar uma incidência de, aproximadamente, 75 e 3,4 casos novos ao ano no Brasil e no estado do RS, respectivamente. Esse dado é muito distante do que encontramos atualmente, provavelmente por serem casos ainda muito sub-diagnosticados. (Muntoni et al., 2007; Valles-Ayoub et al., 2011; [www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br), 2013). No entanto, no presente estudo, encontramos 1 caso positivo dentre os 50 investigados, comprovando que, apesar do “n” pequeno, uma busca ativa de pacientes com uma ou mais manifestações clínicas de DDEC é eficaz para estabelecer o diagnóstico da doença. Não há dados na literatura para comparar a frequência encontrada.

## **PERSPECTIVAS**

De acordo com dados disponíveis na literatura, na maioria dos casos, o diagnóstico é confirmado antes dos 20 anos de idade, provavelmente porque essa parcela de doentes tem manifestações mais características da doença, nos permitindo inferir que, quando a doença se manifesta de forma mais leve e tardia e quando a progressão da doença ocorre mais lentamente, a dificuldade de identificá-la e diagnosticá-la é maior.

A DDEC deveria ser considerada no diagnóstico diferencial de doenças hepáticas crônicas (hepatomegalia e elevação de transaminases, em especial) que não tenham etiologia definida e em pacientes dislipidêmicos (com aumento do colesterol e HDL baixo combinados).

Alguns estudos mostraram que a quitotriosidase pode estar levemente elevada nos casos de DDEC, sendo um fator que poderia ser considerado para investigar DDEC, associado a outros fatores.

Embora o tempo de duração do estudo e número de sujeitos incluídos tenham sido pequenos, o desenvolvimento da técnica laboratorial para confirmação do diagnóstico permitirá a identificação dos pacientes e posterior encaminhamento para manejo das complicações associadas.

Considerando o amplo e inespecífico espectro de manifestações clínicas desta doença, faz-se necessária a maior divulgação das suas características a fim de aumentar o conhecimento dos profissionais que atendem este grupo de pacientes.

Diante da possibilidade de um tratamento medicamentoso específico, seguro e eficaz, o conhecimento da doença por hepatologistas, patologistas, cardiologistas e neurologistas ajudará na detecção precoce de pacientes com a forma mais tardia, permitindo que eles possam se beneficiar das medidas de tratamento disponíveis, modificando, assim, a história natural da doença.

Sugerem-se estudos de triagem em grupos de alto risco (subgrupos de pacientes com hepatopatia, pacientes com dislipidemia, etc) para identificação de um número maior de pacientes, possibilitando uma melhor caracterização do espectro da deficiência de lipase ácida em nosso meio.

Sugere-se estudos com um número maior de indivíduos para aperfeiçoamento da técnica laboratorial para confirmação do diagnóstico.

## **CAPÍTULO VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Anderson, R. a, Bryson, G. M., & Parks, J. S. (1999). Lysosomal acid lipase mutations that determine phenotype in Wolman and cholesterol ester storage disease. *Molecular genetics and metabolism*, 68(3), 333–45. doi:10.1006/mgme.1999.2904
- Bernstein, D. L., Hůlkova, H., Bialer, M. G., & Desnick, R. J. (2013). Cholesteryl ester storage disease: Review of the findings in 135 reported patients with an underdiagnosed disease. *Journal of hepatology*, 58(6), 1230–43. doi:10.1016/j.jhep.2013.02.014
- Boldrini, R., Devito, R., Biselli, R., Filocamo, M., & Bosman, C. (2004). Wolman disease and cholesteryl ester storage disease diagnosed by histological and ultrastructural examination of intestinal and liver biopsy. *Pathology, research and practice*, 200(3), 231–40. doi:10.1016/j.prp.2003.11.001
- Brum, J., Speck-Martins, C., & Pinto de Oliveira Rizzo, I. (n.d.). Genômica e Erros Inatos do Metabolismo. In *Genômica* (pp. 239–276). Atheneu.
- Carakushansky, G. (2001). Seção VI Erros Inatos do Metabolismo. In *Doenças Genéticas em Pediatria* (pp. 155–158). Guanabara Koogan S.A.
- Champe, P. C. (2009). *Bioquímica Ilustrada*. Artmed.
- Chatrath, H., Keilin, S., & Attar, B. M. (2009). Cholesterol ester storage disease (CESD) diagnosed in an asymptomatic adult. *Digestive diseases and sciences*, 54(1), 168–73. doi:10.1007/s10620-008-0310-2
- Clarke, J. (2006). *A Clinical Guide to Inherited Metabolic Diseases*. Cambridge University Press.
- D'Agostino D, Bay L, Gallo G, C. N. (1998). Cholesterol ester storage disease: Clinical, biochemical, and pathological studies of four new cases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 7, 446–450.
- Elleder M, Chlumská A, Ledvinová J, P. H. (2000). Testis - a novel storage site in human cholesteryl ester storage disease. Autopsy report of an adult case with a long-standing subclinical course complicated by accelerated atherosclerosis and liver carcinoma. *Virchows Arch*, 436, 82–87.
- Elleder, M., Chlumská, a, Hyánek, J., Poupětová, H., Ledvinová, J., Maas, S., & Lohse, P. (2000). Subclinical course of cholesteryl ester storage disease in an adult with hypercholesterolemia, accelerated atherosclerosis, and liver cancer. *Journal of hepatology*, 32(3), 528–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10735626>
- Gasche, C., Aslanidis, C., Kain, R., Exner, M., Helbich, T., Dejaco, C., ... Ferenci, P. (1997). A novel variant of lysosomal acid lipase in cholesteryl ester storage disease associated with mild phenotype and improvement on lovastatin. *Journal of hepatology*, 27(4), 744–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9365051>

- Giugliani, R., Dutra, J., Barth, M., Dutra-filho, C., Goldenfum, S., & Wajner, M. (1991). Seven-year Experience of a Reference Laboratory for detection of Inborn Errors of Metabolism in Brazil. *Journal of inherited metabolic disease*, *14*, 400–402.
- Grabowski, G. A., Charnas, L., & Du, H. (2012). Lysosomal Acid Lipase Deficiencies : The Wolman Disease / Cholesteryl Ester Storage Disease Spectrum. In *Scriver's Online Metabolic & Molecular Basis of Inherited Disease*.
- Guy, G., & Butterworth, J. (1978). Acid esterase activity in cultured skin fibroblasts and amniotic fluid cells using 4-methylumbelliferyl palmitate. *Clin Chim Acta*, *84*(3), 361–371.
- Hamilton, J., Jones, I., Srivastava, R., & Galloway, P. (2012). A new method for the measurement of lysosomal acid lipase in dried blood spots using the inhibitor Lalistat 2. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, *413*(15-16), 1207–10. doi:10.1016/j.cca.2012.03.019
- Hůlková, H., & Elleder, M. (2012). Distinctive histopathological features that support a diagnosis of cholesterol ester storage disease in liver biopsy specimens. *Histopathology*, *60*(7), 1107–13. doi:10.1111/j.1365-2559.2011.04164.x
- Junqueira, & Carneiro. (2004). *Histologia Básica* (10<sup>a</sup> ed.). Guanabara Koogan S.A.
- Lohse P, Maas S, Sewell AC, van Diggelen OP, S. D. (1999). Molecular defects underlying Wolman disease appear to be more heterogeneous than those resulting in cholesteryl ester storage disease. *J Lipid Res*, *40*, 221–228.
- Meikle, P. J. (1999). Prevalence of Lysosomal Storage Disorders. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, *281*(3), 249–254. doi:10.1001/jama.281.3.249
- Muntoni, S., Wiebusch, H., Jansen-Rust, M., Rust, S., Seedorf, U., Schulte, H., ... Assmann, G. (2007). Prevalence of cholesteryl ester storage disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *27*(8), 1866–8. doi:10.1161/ATVBAHA.107.146639
- Nakagawa, H., Matsubara, S., Kuriyama, M., & Yoshidome, H. (1995). Cloning of rat lysosomal acid lipase cDNA and identification of the mutation in the rat model of Wolman ' s disease, *36*, 2212–2218.
- Neufeld, E. F. (1991). Lysosomal storage diseases. *Annu. Rev. Biuchem.*, *60*, 257–280.
- Pisciotta, L., Fresa, R., Bellocchio, A., Pino, E., Guido, V., Cantafora, A., ... Bertolini, S. (2009). Cholesteryl Ester Storage Disease (CESD) due to novel mutations in the LIPA gene. *Molecular genetics and metabolism*, *97*(2), 143–8. doi:10.1016/j.ymgme.2009.02.007
- Tanaka, A. (1995). Acid lipase deficiency (Wolman disease and cholesteryl ester storage disease: CESD). (C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, & D. Valle, Eds.) *Nippon Rinsho*, *53*(19 Pt 2), 427–430. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9645100>

Valles-Ayoub, Y., Esfandiari, S., No, D., Sinai, P., Khokher, Z., Kohan, M., ... Darvish, D. (2011). Wolman disease (LIPA p.G87V) genotype frequency in people of Iranian-Jewish ancestry. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 15(6), 395–8. doi:10.1089/gtmb.2010.0203

Vom Dahl, S., Harzer, K., Rolfs, a, Albrecht, B., Niederau, C., Vogt, C., ... Häussinger, D. (1999). Hepatosplenomegalic lipidosis: what unless Gaucher? Adult cholesteryl ester storage disease (CESD) with anemia, mesenteric lipodystrophy, increased plasma chitotriosidase activity and a homozygous lysosomal acid lipase -1 exon 8 splice junction mutation. *Journal of hepatology*, 31(4), 741–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10551400>

Wajner, M., Vargas, C., Burin, M., Giugliani, R., & Coelho, J. (2001). Investigação de Erros Inatos do Metabolismo. *Revista HCPA*, 3, 343–360.

[www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br). (2013). DATASUS.

**ANEXOS**

## ANEXO 1

### CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Para ser incluído no estudo, o paciente precisa

Assinar o TCLE

Apresentar pelo menos dois dos seguintes critérios clínicos ou laboratoriais:

Hepatomegalia sem etiologia definida;

Hipercolesterolemia (com níveis de LDL elevados)

Níveis de HDL abaixo dos limite inferior

Testes de função hepática alterados e/ou fibrose hepática e/ou esteatose microvesicular e/ou cirrose hepática, sem etiologia definida

Sinais sugestivos, em exame anátomo-patológico, de células hepáticas vacuolizadas ou espumosas

História familiar positiva para o(s) mesmo(s) sinais e/ou sintomas

Consangüinidade entre os pais

Doença hepática de início na infância

Esplenomegalia associada à hepatomegalia

presença de linfadenopatia e/ou linfonodos aumentados

Má Absorção

Colesterol Total Elevado e/ou Triglicerídeos Elevados

## ANEXO 2

Versão 26/out/2011

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

#### **Avaliação de um Protocolo para Diagnóstico de Doença de Depósito de Ésteres de Colesterol em Pacientes de Alto Risco**

A Doença de Depósito de Ésteres de Colesterol (DDEC) é uma doença hereditária muito rara na população. Ela acontece quando falta, no nosso corpo, uma enzima chamada de Lípase Ácida Lisossômica (responsável pela limpeza das nossas células).

O diagnóstico é difícil, pois trata-se de uma doença que pode se parecer inicialmente com várias outras mais comuns nos adultos. Alguns adultos com essa doença nunca chegam a um diagnóstico final, sendo tratados como se tivessem outras doenças. Até o momento, não há tratamento nem cura para esta doença, mas há terapias específicas sendo pesquisadas.

Mesmo ainda não tendo um tratamento específico, é importante descobrir se você tem a DDEC para orientação sua, do seu médico e da sua família.

Estamos realizando um estudo para identificar os casos de DDEC em pacientes com sinais e sintomas sugestivos que são atendidos em ambulatórios específicos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Genética Médica, Gastroenterologia e Cardiologia) e de outros serviços médicos do Brasil. Para isso, precisamos coletar uma amostra de 10 ml de sangue (equivalente a duas colheres de sopa) para dosar a quantidade da enzima “lípase ácida” que tem no seu corpo. Os riscos e desconfortos dessa coleta são os mesmos de uma coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina. .

Com relação aos resultados deste exame, é importante salientar que não há prazo exato ou estipulado para receber resposta do resultado desta pesquisa. Ele será informado e entregue ao seu médico, que vai repassar todas as informações necessárias.

Estamos também solicitando sua autorização para o armazenamento da amostra de sangue obtido nesta pesquisa para talvez usar em pesquisas que possam acontecer no futuro. Caso você autorize, você será informado sobre essa possibilidade e será solicitado novo consentimento específico para o próximo estudo. Para isso, também coletaremos seu telefone e endereço de contato.

Rubrica: \_\_\_\_\_

Data: \_\_/\_\_/\_\_

As informações coletadas são confidenciais e seu nome não será vinculado ao resultado deste estudo quando eles forem publicados. Você não terá custos nem compensação financeira para participar desta pesquisa.

A participação neste estudo é voluntária. No caso de não querer participar, isso não prejudicará em nada o acompanhamento médico que você vem recebendo. Você também pode desistir de participar a qualquer momento, sem ter que dar justificativa.

Em caso de dúvida, não hesite em contatar os pesquisadores responsáveis, Dra. Camila Bittar ou o Dr. Roberto Giugliani, no Serviço de Genética Médica do HCPA (Centro de Pesquisa Experimental, 3º. Andar, telefone 51-33598011, ou o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (telefone 51-3359-7640). Você receberá uma via deste documento.

Preencha essa parte somente se você está assinando como Pai ou Responsável por um paciente menor de 18 anos que vai participar desta pesquisa:

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_

Nome do Responsável: \_\_\_\_\_

Grau de parentesco com o paciente: \_\_\_\_\_

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo assinado, fui informado dos objetivos e dos procedimentos da pesquisa, e autorizo:

( ) A coleta de sangue.

( ) O armazenamento da amostra para futuros estudos.

Local:

Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

Nome:

Assinatura: \_\_\_\_\_

TCLE aplicado por:

Nome:

Assinatura: \_\_\_\_\_

Testemunha:

Nome:

Assinatura: \_\_\_\_\_

## ANEXO 3



### HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

#### COMISSÃO CIENTÍFICA E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A Comissão Científica e o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP/HCPA), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 110373

**Data da Versão do Projeto:** 26/10/2011

**Data da Versão do TCLE:** 26/10/2011

**Pesquisadores:**

CARCLINA RSCHINGER MOURA DE SOUZA

MARIO REIS ALVARES DA SILVA

CAMILA MATZENBACHER BITTAR

ROBERTO GIUGLIANI

**Título:** AVALIAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE DEPÓSITO DE ÉSTERES DE COLESTEROL EM PACIENTES DE ALTO RISCO

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos, bem como o respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais de pesquisa clínica, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

- Os membros da Comissão Científica e do Comitê de Ética em Pesquisa não participaram do processo de avaliação dos projetos nos quais constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.
- Somente poderá ser utilizado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no qual conste o carimbo de aprovação do CEP/HCPA.

Porto Alegre, 16 de dezembro de 2011.

  
Prof. Nadine Clausel  
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

## ANEXO 4

### CARTAZ DE DIVULGAÇÃO DO PROJETO:

