MARGARETE DE JESUS CARVALHO

**Avaliação do olfato em pacientes com doença de
Wilson**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Programa de Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Egberto Reis
Barbosa

**SÃO PAULO
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Carvalho, Margarete de Jesus

Avaliação do olfato em pacientes com doença de Wilson / Margarete de
Jesus Carvalho. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Neurologia.

Orientador: Egberto Reis Barbosa.

Descritores: 1.Degeneração hepatolenticular 2.Cobre 3.Ceruloplasmina
4.Olfato 5.Penicilamina 6.Manifestações neurológicas

USP/FM/DBD-386/15

A meu pai Antonio Maria (in memorian)

À minha mãe Eliza

À minha família

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Dr. Egberto Reis Barbosa, pela oportunidade de conviver com todo o seu conhecimento e experiência e compartilhá-los comigo, e pelo constante estímulo, pelo apoio e pela presença em todas as etapas deste estudo.

Ao Dr. Alexandre Aluisio Costa Machado, à Dra. Chien Hsin Fen, ao Dr. Flavio Augusto Sekeff Salem, à Dra. Laura Silveira-Moriyama e à Dra. Luciana Rahal Abrão, pela dedicada colaboração na correção deste trabalho e pelas sugestões dadas.

Ao Dr. Eduardo Luiz Rachid Cançado, à Dra. Márcia Radanovic e ao Dr. Daniel Ciampi Araujo de Andrade, componentes da banca de qualificação, pela preciosa e generosa análise crítica.

Ao Dr. João Carlos Papaterra Limongi, Dra. Mônica Santoro Haddad, Dra. Márcia Rubia e a todos os colegas médicos, fisioterapeutas, fonoaudiólogas, secretários, enfermeiros e voluntários do Grupo de Estudo de Distúrbios de Movimento do Hospital de Clínicas com quem tenho compartilhado as atividades e convivido nos últimos 5 anos.

À Sra. Odaleia Conde de Brito Lowy, ao Dr. Emerson Gisoldi e à Dra. Grace Mary Santos Lydia, pela amizade e pelo apoio durante todo o período de elaboração deste estudo.

Aos pacientes com doença de Wilson incluídos neste estudo e aos seus familiares.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	3
2 OBJETIVOS.....	7
3 REVISÃO DA LITERATURA	11
3.1 Doença de Wilson	11
3.1.1 Histórico	11
3.1.2 Metabolismo do cobre e a proteína ATP7B.....	12
3.1.3 Aspectos genéticos	15
3.1.4 Fisiopatologia da DW	16
3.1.5 Quadro clínico	19
3.1.6 Diagnóstico da DW.....	23
3.1.7 Tratamento	30
3.1.8 Prognóstico	34
3.2 Olfato	35
3.2.1 Função olfatória.....	35
3.2.2 Bases anatômicas da função olfatória.....	35
3.2.2.1 <i>Mucosa olfatória</i>	35
3.2.2.2 <i>Bulbo olfatório</i>	37
3.2.2.3 <i>Córtex olfatório e amígdala</i>	39
3.2.2.4 <i>Percepção do odor</i>	41
3.2.3 Distúrbios do olfato.....	43
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	49
4.1 Seleção da casuística	49
4.1.1 Seleção dos pacientes com DW	49
4.1.2 Seleção dos controles	50
4.1.3 Análise do olfato	54

4.2 Análise estatística	56
5 RESULTADOS.....	59
5.1 Análise univariada das variáveis contínuas	59
5.1.1 Análise da distribuição dos dados nas variáveis contínuas.....	59
5.1.2 Comparações univariadas das variáveis contínuas entre os grupos...	60
5.2 Análise univariada das variáveis nominais.....	64
5.3 Análises dos fatores que influenciam o olfato	64
5.3.1 Gênero	64
5.3.2 Tabagismo.....	65
5.3.3 Idade	66
5.3.4 Desempenho cognitivo	67
5.3.5 Escolaridade.....	68
5.3.6 Fatores que potencialmente influenciam o olfato	68
5.3.6.1 <i>Relação entre olfato e duração da doença</i>	68
5.3.6.1 <i>Relação entre olfato e escore neurológico</i>	69
5.4 Análise multivariada do olfato nos três grupos	69
5.5 Sensibilidade e especificidade.....	70
6 DISCUSSÃO	73
7 CONCLUSÃO	87
8 ANEXOS	91
8.1 ANEXO A - Miniexame do estado mental.	91
8.2 ANEXO B - Ficha de anamnese da percepção olfatória.....	92
8.3 ANEXO C - Alternativas de respostas para cada odor.....	93
8.4 ANEXO D - Aprovação do projeto pela Comissão de Ética do HCFMUSP.....	97
8.5 ANEXO E - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	98
9 REFERÊNCIAS.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Mutações do gene <i>ATP7B</i> em diferentes populações (Ferenci, 2006; Weiss, 2014, Deguti <i>et al.</i> , 2004*; Bem <i>et al.</i> , 2013**) 16
Tabela 2	Critérios diagnósticos de Scheinberg e Sternlieb (1984)..... 23
Tabela 3	Sistema de escore para diagnóstico de DW 24
Tabela 4	Causas de distúrbio de olfato 45
Tabela 5	Distribuição dos dados dos pacientes com DW e controle..... 60
Tabela 6	Análise por pares das variáveis 61
Tabela 7	Análise das variáveis nominais 64
Tabela 8	Correlação sensibilidade e especificidade do teste SS16 70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Metabolismo fisiológico do cobre.	14
Figura 2	Mecanismo fisiopatológico da DW	19
Figura 3	Neuroepitélio olfatório	36
Figura 4	Interações entre as células do sistema olfatório no bulbo olfatório.	38
Figura 5	Principais projeções das estruturas do sistema olfatório.....	41
Figura 6	Fluxograma dos métodos.....	53
Figura 7	Representação gráfica da variável idade entre os 3 grupos: controle, DW com manifestação neurológica e DW com manifestação hepática	62
Figura 8	Representação gráfica da variável escolaridade entre os 3 grupos: controle, DW com manifestação neurológica e DW com manifestação hepática.....	62
Figura 9	Representação gráfica da variável MEEM entre os 3 grupos: controle, DW com manifestação neurológica e DW com manifestação hepática	63
Figura 10	Representação gráfica da variável escore SS-16 entre os 3 grupos: controle, DW com manifestação neurológica e DW com manifestação hepática.....	63
Figura 11	Distribuição do escore SS-16 segundo a variável gênero nos 3 grupos.	65
Figura 12	Distribuição do escore SS-16 segundo a variável tabagismo nos 3 grupos	66
Figura 13	Distribuição do escore SS-16 segundo a variável idade nos 3 grupos	67
Figura 14	Distribuição do escore SS-16 segundo a variável MEEM	67
Figura 15	Distribuição do escore SS-16 de acordo com a escolaridade	68
Figura 16	Distribuição do escore SS-16 de acordo com o tempo de doença	69

RESUMO

Carvalho MJ. *Avaliação do olfato em pacientes com doença de Wilson* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A Doença de Wilson (DW) é uma moléstia hereditária, caracterizada pela deficiência de excreção do cobre pelo fígado devido à mutação do gene *ATP7B*. O distúrbio do olfato ocorre com frequência em doenças neurodegenerativas como na doença de Parkinson (DP) e na doença de Alzheimer (DA). A análise do olfato tem sido utilizada como um instrumento útil no diagnóstico diferencial das diversas formas de parkinsonismo degenerativo, e, especialmente, na diferenciação entre DP e tremor essencial. O diagnóstico precoce na DW é a chave para o sucesso do tratamento. Na hipótese de haver comprometimento do olfato em fases iniciais da doença, esse poderia ser um dado a mais para auxiliar no diagnóstico. Até o presente, há apenas um estudo relacionando a DW com a disfunção do olfato. O objetivo deste estudo foi avaliar o olfato em um grupo de pacientes com DW e confrontar com grupo-controle. No presente estudo, foram analisados 37 portadores de DW com manifestação neurológica, 24 portadores de DW sem manifestação neurológica e 59 controles. Todos os indivíduos foram analisados com relação à idade, ao gênero, ao grau de escolaridade, ao uso de tabaco e ao minixame do estado mental (MEEM), e os portadores de DW foram avaliados quanto ao tempo de doença, tratamento medicamentoso e escore neurológico. O olfato foi avaliado por meio do teste de identificação de odor Sniffin' Sticks (SS-16 canetas numeradas e quatro opções de resposta para cada uma). Vinte e quatro indivíduos eram pacientes da DW sem manifestação neurológica (45,83% do gênero feminino) e 37 pacientes apresentavam manifestações neurológicas (56,76% do gênero masculino). O grupo-controle foi composto por 59 indivíduos, 35 (59,33%) do gênero masculino. As médias de idade foram de $33,38 \pm 9,79$ anos no grupo de portadores de DW com manifestação neurológica; $29 \pm 9,61$ anos no grupo de portadores de DW sem manifestação neurológica e $33,81 \pm 10,67$ anos no grupo-controle. Todos os pacientes com DW estavam em tratamento: 47(77%) com penicilamina, 7 (11,5%) com trientine e 7 (11,5%) com sais de zinco. As médias de respostas corretas no teste de identificação do odor SS-16 foram: $12,03 \pm 2,21$ no grupo de portadores de DW com manifestação neurológica, $12,15 \pm 2,07$ no grupo de portadores de DW com manifestação hepática e $12,70 \pm 2,03$ para o grupo-controle. Na avaliação objetiva do olfato com o teste de identificação do odor SS-16, não foi evidenciada diferença significativa entre os três grupos analisados, mas observou-se que o MEEM e o grau de escolaridade influenciaram significativamente no escore do SS-16 na comparação do grupo de pacientes com DW com manifestação neurológica com os outros dois

grupos (grupo-controle e o grupo de portadores de DW com manifestação hepática). No presente estudo, não foi evidenciada disfunção olfatória nos pacientes com DW, mas foi observada diminuição da percepção do olfato em alguns pacientes com DW (com e sem manifestação neurológica). Em relação à disfunção olfatória evidenciada em alguns pacientes com DW na presente análise, algumas considerações são pertinentes e poderiam ter influenciado na identificação do olfato neste grupo de pacientes com DW. O acúmulo de cobre e a produção de radicais livres no sistema nervoso central (SNC) podem desencadear processos de neurodegeneração em estruturas envolvidas no olfato, alterações metabólicas, acúmulo de substâncias neurotóxicas (amônia e manganês) e alterações de neurotransmissores, e contribuir para o surgimento da disfunção olfatória.

Descritores: Degeneração hepatolenticular; Cobre; Ceruloplasmina; Olfato; Penicilamina; Manifestações neurológicas.

ABSTRACT

Carvalho MJ. *Smell analysis in patients with Wilson's disease* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Wilson's disease (WD) is a hereditary disease due to a mutation in ATP7B gene, characterized by deficiency of copper excretion by the liver. Smell disorders are frequently encountered in neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease (PD) and Alzheimer's disease (AD). Smell analysis has been a useful tool for the differential diagnosis of several forms of degenerative parkinsonism, and especially for the differentiation between PD and essential tremor. Early diagnosis in WD is the key for a successful treatment. If there were smell impairment in the early stages of the illness, it could be used as another clue to help on its diagnosis. To the present date, there is only one study connecting WD with smell problems, the aim of this study was to evaluate smell function in a group of WD patients and compare them with a control group. We analyzed 37 WD patients with and 24 WD patients without neurologic symptoms, and 59 controls. All subjects were evaluated regarding age, gender, schooling, tobacco use, Mini Mental State Examination (MMSE), and the WD patients were also evaluated regarding duration of the illness, medication and neurologic scoring. Smell was analyzed by means of Sniffin' Sticks smell identification test (SS-16 numbered pens and four options of answer for each pen). Twenty-four subjects with WD had no neurologic symptoms (45.83% female), and 37 patients had neurologic impairment (56,76% male). The control group was composed by 59 individuals, 35 (59,33%) male. Their age average were $33,38 \pm 9,79$ years for WD neurologic symptoms; $29 \pm 9,61$ years for WD without neurologic symptoms; and $33,81 \pm 10,67$ years for the control group. All WD patients were on treatment: 47(77%) with penicillamine, 7(11,5%) with trientine, and 7(11,5%) with zinc salt formulations. The average of correct answers in the SS-16 were: $12,03 \pm 2,21$ for the WD with neurologic symptoms group; $12,15 \pm 2,07$ for the WD without neurologic symptoms; and $12,70 \pm 2,03$ for the control group. In the smell testing with SS-16, there was no significant difference among the three groups, but the MMSE scoring and schooling had a significant influence over SS-16 score when comparing WD with neurologic symptoms patients with the other groups (WD patients without neurologic symptoms and control group). There was no smell dysfunction in WD patients in this study, but diminished smell perception was observed in some WD patients (either with or without neurologic impairment). Regarding smell impairment observed in some WD patients in the current analysis, some considerations must be made that could have influenced smell identification in these individuals. Copper accumulation and free radicals production in the central nervous system can trigger neurodegeneration

processes in structures involved in smell perception, metabolic impairment, building up of neurotoxic substances (such as ammonia and manganese), and neurotransmitter disorders, contributing to the emergence of smell dysfunction.

Descriptors: Hepatolenticular degeneration; Copper; Ceruloplasmine; Smell; Penicillamine; Neurologic manifestations.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A DW, também conhecida como degeneração hepatolenticular (DHL), é causada por um distúrbio no metabolismo do cobre e é uma das poucas doenças genéticas em que o diagnóstico e a intervenção terapêutica precoces favorecem um bom prognóstico e uma expectativa de vida maior (Patil *et al.*, 2013).

Há vários estudos sobre o distúrbio de olfato em doenças neurodegenerativas, principalmente na DP, mas a avaliação da função olfatória em doenças metabólicas e neurodegenerativas foram pouco investigadas.

A análise do olfato tem sido utilizada como um instrumento útil no diagnóstico diferencial das diversas formas de parkinsonismo degenerativo e, especialmente, na diferenciação entre DP e tremor essencial.

Na DW, o diagnóstico precoce é a chave para o sucesso do tratamento. Na hipótese de haver comprometimento do olfato em fases iniciais da doença, esse poderia ser um dado a mais para auxiliar no diagnóstico.

Até o presente momento, há apenas um estudo correlacionando o olfato e DW.

Distúrbios de olfato ocorrem em metade da população entre 65 e 80 anos de idade, e em cerca de três quartos daqueles com mais de 80 anos de idade. A disfunção do olfato pode comprometer a qualidade de vida, habilidades vocacionais, aumentar os riscos à saúde pelo fato de que o indivíduo pode inalar gases tóxicos ou mesmo ingerir alimentos contaminados ou deteriorados, além do impacto sobre a escolha e o consumo dos alimentos (Doty, 2005).

O propósito deste estudo foi avaliar o olfato em um grupo de pacientes com DW e confrontar os resultados com os disponíveis na literatura.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Os objetivos do estudo são:

- 1) avaliar o olfato nos portadores de DW, com e sem manifestação neurológica, comparando-os com um grupo-controle;
- 2) observar se há diferença na percepção do olfato entre pacientes com DW com e sem manifestação neurológica;
- 3) analisar a influência das seguintes variáveis: idade, gênero, uso do tabaco, miniexame do estado mental e grau de escolaridade, tratamento medicamentoso, escore neurológico e o tempo de duração da DW na percepção do olfato nos grupos estudados;
- 4) analisar se há alguma variável que interferiu no desempenho no teste do olfato.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Doença de Wilson

3.1.1 Histórico

Von Frerichs, em 1861, descreveu um possível caso de DW. Westphal, em 1883, apresentou o estudo de dois casos que apresentavam como manifestação predominante tremor semelhante ao da esclerose múltipla, levando-o a empregar o termo pseudosclerose para caracterizar essa nova entidade clínica. Strümpell relatou, em 1898 e 1899, mais três casos de pseudosclerose.

Os casos de Westphal e Strümpell, segundo Wilson, 1912, eram muito heterogêneos para permitir a definição de uma entidade anátomo-clínica.

Nesse mesmo ano, S. A. K. Wilson publicou sua monografia intitulada *“Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver”* (Wilson, 1912), que veio a se constituir num marco histórico no estudo da DW, na qual relatou quatro casos pessoais (três deles com exame anatomopatológico), dois referidos (mas não estudados) por Gowers e Ormerod e mais seis previamente publicados. Salientou a existência de cirrose hepática, frequentemente assintomática, e o caráter familiar de alguns casos.

Vogt, em 1929, Haurowitz, em 1930, e Glazebrook, em 1945 evidenciaram o acúmulo de cobre no fígado e gânglios da base de pacientes com DW (Scheinberg e Sternlieb, 1984).

No ano de 1948, quatro importantes trabalhos trouxeram grande avanço para o esclarecimento da natureza dismetabólica da DHL: Uzman e Denny-Brown demonstraram a ocorrência de aminoacidúria em níveis acima dos normais; Cumings provou de maneira definitiva o acúmulo de cobre no fígado e no cérebro; Mandelbrote *et al.*, estudando o metabolismo do cobre na esclerose múltipla, observaram que, no grupo-controle, constituído por

portadores de outras afecções neurológicas, um paciente com DHL apresentava aumento da excreção urinária de cobre; e Holmberg e Laurell demonstraram a existência de uma cuproproteína sérica, que foi denominada ceruloplasmina.

A partir desses relatos, a investigação se concentrou no estudo do metabolismo do cobre e do tratamento da doença. Em 1952, Scheinberg e Gitlin demonstraram baixas taxas de ceruloplasmina nos pacientes com DHL; em 1954, Bearn e Kunkel assinalaram a hipocupremia e Cartwright *et al.* evidenciaram o aumento do cobre livre, não ligado à ceruloplasmina.

As tentativas de tratamento com o uso de quelantes de cobre foram malsucedidas até a introdução da penicilamina por Walshe em 1956, a qual tornou possível o tratamento da doença até então invariavelmente fatal.

Bearn, em 1953, demonstrou o caráter genético autossômico recessivo da DW. Yamaguchi *et al.*, Tanzi *et al.*, Bull *et al.*, em 1993, realizaram, independentemente, a identificação, do gene *ATP7B* no cromossomo 13q14.1, que codifica a proteína homônima transportadora de cobre, cuja deficiência é responsável pela DW.

No período de 1946 a 1961, seis casos de DW foram avaliados no Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). O primeiro caso de DW foi identificado em 1946 e o diagnóstico foi baseado no quadro clínico e na presença de anel de Kayser-Fleischer (Barbosa *et al.*, 2009).

3.1.2 Metabolismo do cobre e a proteína ATP7B

A DW é uma moléstia de caráter autossômico recessivo, decorrente de mutações no gene *ATP7B*, levando ao depósito de cobre inicialmente nos hepatócitos e, posteriormente, em diversos órgãos e tecidos, principalmente no cérebro, rins e córnea (Walshe, 1986).

O cobre é um oligoelemento essencial ao metabolismo humano e sua deficiência pode ocorrer em diversas condições clínicas como desnutrição, absorção intestinal inadequada e síndrome nefrótica, resultando em anemia e

neutropenia. Contudo, o cobre em níveis elevados é um elemento tóxico para a célula. Explica-se, portanto, a presença no organismo, de mecanismos complexos de regulação visando a um controle estrito dos níveis de cobre (Pal, 2013).

A quantidade de cobre na dieta varia de 1 a 5 mg/dia, sendo que cerca de 2mg/dia são considerados suficientes para as necessidades do organismo (Hordyjewska *et al.*, 2014). O cobre é absorvido no estômago e intestino delgado por meio da ação da metaloredutase que atua no polo apical do enterócito. O transporte transmembrana é realizado através das proteínas *human copper transporter 1* (hCTR1) e *divalent metal transporter 1* (DMT1). A proteína adenosina trifosfatase tipo A (ATP7A), expressa no enterócito, transporta o cobre para a circulação portal, onde este metal se liga à albumina ou à histidina e é transportado para o fígado (Patil *et al.*, 2013).

No hepatócito, o cobre desliga-se das proteínas transportadoras e, por meio da hCTR 1, passa da circulação sanguínea para o interior dos hepatócitos (Ferenci, 2004). No citoplasma do hepatócito, a proteína ATOX 1 (chaperona) transportará o cobre para diversas estruturas intracelulares. Uma parte dele se ligará à apometalotioneína e formará a Cu-metalotioneína, e a outra parcela à proteína ATP7B (adenosina trifosfatase tipo B) localizada no complexo de Golgi do hepatócito (Bandmann *et al.*, 2015).

A proteína ATP7B participa do metabolismo do cobre por meio de dois mecanismos: 1) regulação do excesso de cobre pelos canais biliares e 2) ligação do cobre à apoceruloplasmina (Chen *et al.*, 2015). A Figura 1 mostra o metabolismo fisiológico do cobre.

Outra via de eliminação deste metal é a renal que representa menos de 5% do total de cobre excretado (Ala *et al.*, 2007).

Figura 1 - Metabolismo fisiológico do cobre. Entre 25 e 60% do cobre da dieta atinge a circulação em ligação com a albumina ou a histidina e é transportado para o fígado.

3.1.3 Aspectos genéticos

O gene *ATP7B*, localizado no braço longo do cromossomo 13, *locus* 13q14-21 (Tanzi *et al.*, 1993), codifica a proteína ATP7B relacionada ao transporte de metais através de membranas que está presente no fígado, no rim, na córnea, no SNC e, menos significativamente, em outros órgãos. Na DW, ocorre a mutação no gene *ATP7B*, ocasionando a produção deficiente da proteína homônima relacionada ao metabolismo de cobre (Dalvi, 2014).

A prevalência estimada da DW está entre 1:30.000 e 1:100.000, mas é consideravelmente maior em populações isoladas (Forbes *et al.*, 2014). Em recente estudo genético, Coffey *et al.* (2013) analisaram 1.000 neonatos aparentemente saudáveis e observaram prevalência de 1 em 7.000 na população do Reino Unido.

Mais de 600 mutações no gene *ATP7B* foram identificadas até hoje (www.medicalgenetics.med.ualberta.ca/wilson/index.php; Bennett; Hahn, 2011). Algumas mutações têm maior predominância em determinadas populações.

A mutação His1069Gln, caracterizada pela substituição do aminoácido histidina na posição 1069 pelo aminoácido glutamina corresponde a 50-80% dos alelos de pacientes com DW da população europeia (Bandmann *et al.*, 2015).

O primeiro estudo do genótipo de portadores de DW na América do Sul (Deguti *et al.*, 2004) avaliou 60 pacientes brasileiros; encontrou 25 mutações, 12 descritas pela primeira vez; e a mutação mais frequente foi p.A1135fs (34,8%), seguida da mutação p.L708P (14, 1%). Por outro lado, em recente estudo desenvolvido por Bem *et al.*, 2013, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina Universidade Federal do Paraná, os autores constataram que, entre as mutações no gene *ATP7B* encontradas em pacientes com DW, houve amplo predomínio da mutação His1069Gln, que tem alta prevalência na Europa Central, o que mostra que a composição étnica dos indivíduos incluídos nesta pesquisa era bastante diferente daquela realizada em São Paulo por Deguti *et al.*, 2004.

A Tabela 1 mostra as mutações do gene *ATP7B* mais comuns em diferentes populações.

Tabela 1 - Mutações do gene *ATP7B* em diferentes populações (Ferenci, 2006; Weiss, 2014, Deguti *et al.*, 2004*; Bem *et al.*, 2013**)

	Mudança do nucleotídeo do DNA	Mudança de aminoácido	Éxon	Frequência	Outras mutações comuns
Leste da Ásia	2333G→T	Arg778Leu	8	30-50%	2871delC
Europa	3207C→A	His1069Gln	14	35-45%	2299insG 1934T→G
Índia	813C→A	Cys271Stop	2	~20%	3305T→C , 2975C→T
Oriente Médio	4196A→G	Gln1399Arg	21	~30%	
Brasil*	3402delC	Ala1135Glnfs	15	30,8%	2123T→C
Brasil**	3207C→A	His1069Gln	14	37, 1%	3402delC

3.1.4 Fisiopatologia da DW

O defeito básico na DW está localizado no fígado, alterações estruturais surgem nesse órgão anos ou mesmo décadas antes que ocorra acometimento de tecidos extra-hepáticos (Barbosa *et al.*, 2013).

Conforme descrição original de Wilson (1912), o aspecto macroscópico do fígado, nas fases mais avançadas da doença, é de uma cirrose macro e micronodular, ou seja, o órgão encontra-se com tamanho reduzido e apresenta superfície nodular com nódulos de dimensões variáveis.

Scheinberg e Sternlieb (1984), com base em mais de duas centenas de casos de DW submetidos a estudo histológico do fígado, descreveram as diversas anormalidades encontradas nessa doença.

As primeiras alterações detectadas à microscopia óptica incluem a deposição nuclear de glicogênio e moderada esteatose hepática. Alguns pacientes evoluem com quadro histológico de hepatite crônica ativa, com infiltração de linfócitos e plasmócitos, necrose em “saca-bocados”, necrose em ponte e fibrose. Com a evolução da doença, gradualmente, se instala uma cirrose mista, micro e macronodular, geralmente com pouca atividade inflamatória, muitas vezes, assintomática (Ala *et al.*, 2007; Fanni *et al.*, 2014).

Embora nas formas fulminantes o quadro clínico assemelha-se ao da hepatite aguda, a análise do fígado quase sempre revela cirrose e,

ocasionalmente, regeneração nodular e alterações típicas de hepatite crônica (Pal, 2014).

A mais característica alteração encontrada no fígado de portadores de DW é o acúmulo de cobre. Esse metal distribui-se, inicialmente, de forma difusa no citoplasma do hepatócito, provavelmente ligado à metalotioneína, em uma forma não tóxica. Posteriormente, o cobre aparece em densos grânulos nos lisossomos e, nessa forma, é corado pela rodanina ou pelo ácido rubeânico, enquanto a forma associada à proteína cora-se por orceína e vitória. Contudo, a presença de depósitos anormais de cobre no fígado não é uma alteração exclusiva da DW, podendo ser encontrada na cirrose biliar primária e algumas hepatopatias que cursam com colestase (Ramraj *et al.*, 2012).

As principais modificações ultraestruturais do hepatócito ocorrem no retículo endoplasmático, mitocôndrias e núcleos. As alterações mitocondriais são muito específicas da DW e incluem pleomorfismo com aumento da densidade da matriz, alargamento dos espaços entre as membranas interna e externa, e entre as cristas. As alterações mitocondriais são mais típicas no início da doença e perdem essas características com a progressão ou após o tratamento dessa. (Raju *et al.*, 2015).

Na DW, a disfunção da ATP7B impede que o excesso de cobre seja excretado pela bile e incorporado à apoceruloplasmina, como consequência, há níveis baixos de ceruloplasmina e o cobre é acumulado no hepatócito. O acúmulo destes íons de cobre na forma livre promove um aumento na produção de radicais livres, disfunção mitocondrial, alteração da oxidação lipídica e estresse oxidativo, resultando em dano celular (Schilsky, 2011).

No fígado, a sobrecarga de cobre pode provocar hepatite, cirrose e insuficiência hepática (Dusek *et al.*, 2015).

Quando a capacidade de armazenamento hepático de cobre é esgotada, o cobre é liberado na circulação sanguínea e acarretará depósito em outros tecidos, inclusive o SNC (Woimant *et al.*, 2014).

Os mecanismos de lesão neuronal secundários ao acúmulo de cobre não são totalmente conhecidos, porém a interação do cobre com proteínas forma complexos bioinorgânicos (cuproproteínas) que possuem propriedades oxidantes e antioxidantes que poderiam alterar a função neuronal e

desencadear processo neurodegenerativo. Duas proteínas relacionadas a processos neurodegenerativos foram descritas como cuproproteínas: a precursora do amiloide, relacionada à DA, e a priônica, relacionada à doença de Creutzfeldt-Jakob (Ferenci, 2004).

No encéfalo, as estruturas mais atingidas são os gânglios da base, especialmente núcleo lenticular e núcleo caudado, que mostram atrofia simétrica, coloração amarelada ou marrom-avermelhada e consistência diminuída; o putâmen pode apresentar fissuras e depressões ou cavitações correspondentes a áreas de necrose. O córtex cerebral, a substância branca subcortical, o tálamo, o núcleo subtalâmico, a substância negra e o cerebelo podem também estar acometidos. (Raju *et al.*, 2015).

As lesões microscópicas são de caráter degenerativo e atingem as estruturas de suporte, os mecanismos de reparação e os elementos parenquimatosos do tecido, além de aumento difuso de astrócitos de aspecto normal e presença de células tipo I e II de Alzheimer e células de Opalski (Weitzman *et al.*, 2014). O mecanismo fisiopatológico da DW é esquematizado na Figura 2.

Figura 2 - Mecanismo fisiopatológico da DW. A disfunção da enzima ATP7B impede que o excesso de cobre seja excretado pela bile e incorporado à apoceruloplasmina, como consequência, há níveis baixos de ceruloplasmina e o cobre é acumulado no hepatócito.

3.1.5 Quadro clínico

O início das manifestações, geralmente, ocorre entre 10 e 30 anos de idade, sendo que os doentes procuram serviço médico por alterações psiquiátricas, hepáticas ou neurológicas, embora o envolvimento de outros órgãos possa ocorrer. A maior parte dos pacientes apresenta sintomas antes dos 50 anos, mas há descrição de casos em septuagenários (Czlonkowska *et al.*, 2008).

Crianças com menos de 10 anos de idade, geralmente, são assintomáticas, mas, quando a moléstia se apresenta nessa faixa de idade, as manifestações são hepáticas ou, excepcionalmente, ostearticulares ou, ainda, cardíacas.

As manifestações iniciais neurológicas estão presentes em cerca de 50% dos pacientes, têm instalação pouco mais tardia que as hepáticas, ocorrendo na segunda ou terceira décadas de vida, e são tipicamente distúrbios do movimento. A instalação, geralmente, é insidiosa, mas pode ser subaguda. O quadro neurológico é dominado por distonia, parkinsonismo e alterações cerebelares, ocorrendo isoladamente ou, mais frequentemente, em combinação (Dalvi, 2014).

A distonia está presente em, pelo menos, dois terços dos portadores de DW com manifestação neurológica e pode ser generalizada, segmental, multifocal ou focal. As manifestações de distonia focal podem incluir a distonia facial, a distonia de cordas vocais, torcicolo, distonia de musculatura faríngea, distonia cervical, blefaroespasma e distonia de extremidades dos membros, e, frequentemente, tornam-se generalizadas (Choudhary *et al.*, 2015).

O quadro distônico na DW, geralmente, tem rápida progressão, podendo, em poucos meses ou mesmo semanas, levar o paciente a uma condição de completa incapacidade motora.

Os sinais mais frequentemente presentes nos pacientes com DW são sinais parkinsonianos, tais como bradicinesia, rigidez muscular, hipomímia, micrografia e marcha em bloco. Entretanto uma síndrome parkinsoniana completa isolada é uma forma incomum de apresentação da doença.

A disartria é uma manifestação comum da DW e pode estar relacionada a quadro distônico, parkinsoniano ou cerebelar. Ocorre, em cerca de 90% dos casos, e, frequentemente, está associada a movimentos de língua, discinesias orofaciais e “*risus sardonicus*” (Dalvi, 2014).

O tremor é considerado uma das manifestações mais frequentes na DW e pode ser postural, de repouso, de ação, rubral e distônico. A presença do clássico tremor em “bater de asas” em combinação com disartria é forte indício de diagnóstico de DW. O tremor e a ataxia são mais frequentes em indivíduos

com doença instalada no início da terceira década de vida. (Bandmann *et al.*, 2015).

Outras manifestações neurológicas podem ocorrer na DW, como coreia e atetose em 10% dos casos (Aggarwal *et al.*, 2013), crises epiléticas (Verma *et al.*, 2012) e acometimento do tracto corticoespinal (Taly *et al.*, 2007).

Assim como vários distúrbios do movimento podem estar associados à DW, as manifestações psiquiátricas também podem ocorrer com diversas apresentações. Geralmente, essas alterações se manifestam como perda do controle emocional, o que pode resultar em explosões de raiva, episódios de choro e depressão grave com ideação suicida. Os pacientes podem eventualmente perder a inibição e demonstrar práticas exibicionistas. Delírios e alucinações podem ocorrer. Os pacientes com manifestações comportamentais no início da DW, geralmente desenvolvem manifestações neurológicas posteriormente (Zimbrea, 2014).

A cognição tende a ser menos comprometida especialmente nas fases iniciais da doença, mas os pacientes tipicamente perdem a capacidade de concentração, o que resulta em perda de desempenho no trabalho ou escola. Alguns estudos demonstram que alterações psiquiátricas, motoras e cognitivas parecem estar afetadas independentemente, o que tende a afastar que o baixo desempenho em testes de cognição seja principalmente causado por dificuldades motoras (Han *et al.*, 2014).

Ainda que geralmente não sejam graves, distúrbios cognitivos podem ser encontrados na DW em várias esferas e, pacientes submetidos a testes neuropsicológicos têm desempenho inferior aos controles, especialmente nas funções executivas. (Frota *et al.*, 2013).

O comprometimento hepático está sempre presente na DW, já que desde os primeiros anos de vida, o cobre acumula-se no fígado, que é, portanto, o primeiro órgão a ser acometido pela moléstia. A lesão hepática pode expressar-se por meio de hepatite aguda, hepatite fulminante, hepatite crônica ativa e cirrose hepática. Embora manifestações hepáticas possam ser as primeiras a surgirem, em cerca de 50% dos casos, não é incomum a lesão hepática desenvolver-se sem expressão clínica, mesmo em fases adiantadas de acometimento neurológico (Patil *et al.*, 2013).

Dentre as alterações oftalmológicas na DW, a mais comum é o anel de Kayser-Fleisher (K-F), que se forma na superfície interna do limbo corneano. Trata-se de sinal de grande valor diagnóstico, embora possa estar ausente em casos com manifestações exclusivamente hepáticas, de instalação na infância ou adolescência. Por outro lado, o anel de K-F pode ser encontrado em hepatopatias crônicas obstrutivas como a cirrose biliar primária. Mais rara que o anel de K-F é a catarata em girassol, consequente do depósito de cobre no cristalino (Dalvi *et al.*, 2014).

Quanto às manifestações osteoarticulares, geralmente relacionadas à lesão tubular renal com perdas de cálcio e fósforo, a mais comum é a osteoporose, que pode determinar fraturas espontâneas. Outros tipos de acometimento osteoarticular são: osteomalácia, osteoartrite e osteocondrite dissecante.

No quadro das alterações renais, predominam as decorrentes de lesão tubular: hiperaminoacidúria (alteração encontrada com alta frequência na DW), hiperfosfatúria, hipercalcúria, glicosúria e uricosúria. Entre as manifestações hematológicas, estão o hiperesplenismo relacionado à hipertensão portal, e a anemia hemolítica decorrente de altos níveis de cobre sérico livre. Lesões dermatológicas, sem gravidade, podem estar presentes sob a forma de hiperpigmentação nos membros inferiores, lúnula azulada e acantose nigricans (Roberts *et al.*, 2008).

Manifestações decorrentes de comprometimento cardíaco são raras, mas podem ser graves. O paciente com DW pode apresentar arritmias cardíacas, miocardiopatia e morte súbita devido a envolvimento do sistema nervoso autônomo (Rosencrantz *et al.*, 2011).

Recentemente, foram descritos distúrbios de sono em pacientes com DW representados por síndrome das pernas inquietas (Tribl *et al.*, 2014) e distúrbio comportamental do sono REM (Limongi, 2014).

Alterações hormonais como a amenorreia primária são, algumas vezes, o primeiro sintoma de DW em mulheres (Tarnacka *et al.*, 2000).

3.1.6 Diagnóstico da DW

O diagnóstico é baseado na combinação de dados clínicos e laboratoriais, mas o diagnóstico de certeza pode ser obtido por meio do teste genético.

Nem sempre é simples estabelecer o diagnóstico de DW devido a sua variedade de manifestações clínicas e raridade. Na tentativa de padronização diagnóstica, Scheinberg e Sternlieb (1984) estabeleceram critérios baseados em achados clínicos e laboratoriais e, para diagnóstico, seriam necessários, pelo menos, dois desses parâmetros (Tabela 2).

Tabela 2 - Critérios diagnósticos de Scheinberg e Sternlieb (1984).

Presença de anel de Kayser – Fleischer (K-F)
Ceruloplasmina sérica menor que 20 mg/dl
Concentração de cobre hepático maior que 250 µg/g de tecido seco
Cobre urinário basal de 24 horas maior que 100 µg/dia
Teste com cobre radioativo

Em 2001, durante o congresso internacional de DW em Leipzig, Alemanha, foi desenvolvida uma metodologia de pontuação quantitativa com dados clínicos, laboratoriais e genéticos de pacientes para diagnóstico da DW (Tabela 3).

Tabela 3 - Sistema de escore para diagnóstico de DW

	Escore diagnóstico
Anel de Kayser-Fleischer	
Presente	2
Ausente	0
Sintomas neurológicos*	
Grave	2
Moderado	1
Ausente	0
Ceruloplasmina sérica	
Normal (>200mg/l)	0
100-200 mg/l	1
< 100 mg/l	2
Anemia hemolítica	
Presente	1
Ausente	0
Cobre hepático (na ausência de colestase)	
> 5 x ULN** (>250 µg/g)	2
50-250 µg/g	1
Normal (<50 µg/g)	-1
Grânulos com rodanina positiva†	1
Cobre urinário (na ausência de hepatite aguda)	
Normal	0
1-2 x ULN	1
> 2 x ULN	2
Normal, mas > 5 x ULN após penicilamina	2
Análise de mutação	
Homozigoto	4
Heterozigoto	1
Sem mutação detectável	0

*anormalidades típicas de encéfalo na ressonância magnética;**ULN (*upper limit of normal*) acima do limite normal; † 4 ou mais=diagnóstico estabelecido, 3=diagnóstico possível, mas necessário testes, 2 ou menos=diagnóstico pouco provável. Modificado de Ferenci *et al.*, 2003

O escore de Leipzig, quando aplicado a pacientes heterozigotos cuja prevalência é 1:40 (Coffey *et al.*, 2013), pode levar a um falso resultado positivo, decorrente das alterações metabólicas que apresentam. Por exemplo: um indivíduo heterozigoto para DW pode apresentar resultados laboratoriais

como: ceruloplasmina menor que 20mg % = 1 ponto; excreção de cobre urinário de 100-200 µg/24h = 1 ponto; presença de mutação no gene *ATP7B* = 1 ponto e concentração hepática de cobre de 50-250µg/g tecido seco = 1ponto, totalizando 4 pontos no escore de Leipzig.

Em 2012, a Sociedade Europeia para o Estudo do Fígado (*European Association for the Study of the Liver – EASL*) propôs diretrizes para o diagnóstico da DW com base em revisão de literatura. (Ferenci *et al.*, 2012). As recomendações propostas são graduadas de acordo com a qualidade dos estudos em que estão baseadas.

As recomendações da EASL, com os seus respectivos comentários, são descritas a seguir.

Recomendação 1: o diagnóstico de DW deve ser considerado:

- a) para qualquer indivíduo com alteração hepática ou distúrbio de movimento de causa desconhecida.

Comentário:

Principalmente se o início das manifestações ocorrer entre a segunda e terceira década de vida.

- b) a idade apenas não deve ser base de exclusão para o diagnóstico de DW.

Comentário:

Há casos descritos de pacientes mais idosos com DW.

- c) qualquer paciente com doença hepática de causa desconhecida em combinação com transtornos neurológicos ou neuropsiquiátricos.

Comentário:

Deve-se excluir o diagnóstico de hipermanganesemia genética associada com doença crônica do fígado, distonia e parkinsonismo (Quadri *et al.*, 2012).

Recomendação 2: a pesquisa do anel K-F deve ser realizada por meio de lâmpada de fenda por oftalmologista, mas a sua ausência não exclui o diagnóstico de DW mesmo em pacientes com doença predominantemente neurológica.

Comentário:

O anel de K-F pode estar presente em outras doenças hepáticas como a cirrose biliar primária.

Recomendação 3: exames de neuroimagem, preferencialmente a ressonância magnética (RM) de encéfalo, devem fazer parte da avaliação de qualquer paciente com alterações neurológicas sugestivas de DW.

Comentários:

A combinação de alterações na RM em gânglios da base, tálamo e tronco cerebral em um contexto clínico sugestivo pode ser decisiva para o diagnóstico de DW.

Alterações de sinal no *striatum* estão presentes em cerca de 80% dos casos neurológicos (da Costa *et al.*, 2009). A presença do “sinal do panda gigante”, determinado por alterações de sinal na RM no tronco cerebral é altamente sugestiva de DW. Entretanto, este sinal está presente em apenas 15% dos portadores de DW com manifestação neurológica (Prashanth *et al.*, 2010).

Alterações de sinal na RM semelhantes à mielinólise pontina central (MPC) com padrão arredondado, bisceccionado ou trisseccionado são descritas em pacientes com DW. O padrão trisseccionado na MPC é também conhecido com sinal do tridente ou “Mercedes-Benz”. A ocorrência simultânea do “sinal do panda gigante” e do “sinal do tridente” é rara. Ambos estes sinais são característicos de DW (Parekh *et al.*, 2014).

A RM é de grande utilidade no diagnóstico diferencial entre a DW e outras condições como hipermanganessemia hereditária e neurodegenerações com acúmulo de ferro no cérebro (Quadri *et al.*, 2012; Hogarth, 2015).

Recomendação 4: baixos níveis de ceruloplasmina sérica devem ser considerados como evidência para diagnóstico de DW. Valores normais (20-40mg/dl) não necessariamente excluem o diagnóstico de DW. Níveis intermediários de ceruloplasmina exigem uma investigação mais aprofundada.

Comentários:

Cerca de 10% dos pacientes com DW têm ceruloplasmina normal e, por outro lado, de 10 a 20% dos heterozigotos podem apresentar níveis reduzidos de ceruloplasmina. Valores baixos de ceruloplasmina são encontrados em 1% dos indivíduos normais (Dalvi *et al.*, 2014).

Os níveis de ceruloplasmina podem estar reduzidos ainda nas seguintes condições: falência hepática aguda, aceruloplasminemia, síndrome de Menkes, cirrose descompensada, desnutrição grave, enteropatia ou nefropatia perdedora de proteínas, esclerose múltipla, panencefalite esclerosante subaguda, doença de Huntington, deficiência de cobre devido a suplementos alimentares contendo zinco, síndrome de MEDNIK (retardo mental, enteropatia, surdez, neuropatia, icterícia e queratoderma) e síndrome de Huppke-Brendel (Kaler, 2013; Bandmann *et al.*, 2015).

O nível de ceruloplasmina pode estar aumentado nas seguintes situações: uso de contraceptivos orais e nos processos inflamatórios agudos. (Garmizo *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2007).

A concentração do cobre sérico total, soma do cobre incorporado à ceruloplasmina (95%) e do cobre sérico livre (5%), está baixa na DW e não é considerada para diagnóstico (Walshe, 2012).

Recomendação 5: a excreção basal de cobre maior que 100 µg/24h é típica em pacientes sintomáticos.

Comentários:

A excreção urinária normal de cobre é menor que 30-40 µg/24h, valores maiores que 100 g/24h são encontrados em pacientes com hepatite autoimune, colangite esclerosante, cirrose biliar primária, além dos portadores de DW (Martins da Costa *et al.*, 1992). Entre 15 e 20% dos portadores de DW podem apresentar níveis normais de excreção urinária de cobre no início da doença

(Sanchez-Albisua, 1999). Valores maiores de 40 µg em 24 horas são sugestivos de DW em crianças assintomáticas (Nicastro *et al.*, 2010).

Pacientes com doença hepática crônica e heterozigóticos portadores da mutação para DW podem ter níveis intermediários, ou seja, de 100-200µg/24h (Mak *et al.*, 2006).

O teste de penicilamina, a excreção urinária de 5 X ULN (>1600µg/24h) após 2 tomadas de 500mg de penicilamina, pode ser útil para diagnóstico de DW em crianças (Mazumder *et al.*, 2014; Bandmann *et al.*, 2015). Vieira *et al.*, 2012, realizaram o teste de penicilamina em 50 pais de portadores de DW e observaram aumento muito maior que 5 vezes o limite superior normal da excreção urinária de cobre após a penicilamina da maior parte dos heterozigotos. Portanto, o teste de penicilamina não deve ser considerado para diagnóstico de DW em adultos.

O diagnóstico de DW na maior parte dos pacientes com manifestação neurológica é estabelecido pela dosagem sérica baixa de ceruloplasmina, aumento da excreção de cobre urinário e a presença do anel K-F (Loudianos *et al.*, 2014).

Recomendação 6: a quantificação de cobre do parênquima hepático deve ser realizada quando o diagnóstico não está estabelecido. Concentrações maiores que 250 µg/g de tecido seco são indicativas de DW.

Em indivíduos não tratados, a concentração normal de cobre no parênquima hepático (menor que 50µg/g de tecido seco) quase sempre exclui o diagnóstico de DW.

Comentários:

Valores intermediários (50-250 µg/g de tecido seco) sugerem heterozigose para DW. Pacientes com doença hepática colestásica ou hepatite autoimune também podem ter aumento da concentração de cobre hepático.

Em estágios avançados da DW, a distribuição do cobre no fígado é, frequentemente, heterogênea e a biópsia pode ser realizada em regiões com baixa concentração de cobre levando a resultado falseado (Liggi *et al.*, 2013).

Recomendação 7: análise de mutações em éxons específicos ou por sequenciação do gene inteiro é, atualmente, possível e disponível.

Comentários:

O teste genético para o gene *ATP7B* é aplicável a pacientes em que o diagnóstico não foi estabelecido e a familiares de paciente com DW (Schilsky *et al.*, 2010).

Há mais de 600 mutações identificadas, mas a alta frequência de mutações específicas em determinadas populações favorece a identificação de, pelo menos, uma mutação em 60 a 90% dos casos. Por exemplo: a mutação His1069Glu é frequente em pacientes caucasianos e da região Sul do Brasil (Bem *et al.*, 2013). Deguti *et al.*, 2004, constataram que, no estado de São Paulo, 62% das mutações são encontradas nos éxons 8 (c.3402 del C) e 15 (c.2123 T>C).

O teste genético, apesar de possibilitar o diagnóstico de certeza, não está disponível em muitos países e a demora do resultado pode retardar o diagnóstico.

Recomendação 8: o teste específico para mutações conhecidas deve ser o principal método de triagem para parentes de primeiro grau de pacientes com DW.

Comentários:

A triagem de familiares de primeiro grau de pacientes com DW deve incluir a pesquisa do anel de K-F, e a análise das concentrações de cobre urinário e ceruloplasmina (Ala *et al.*, 2007).

Os irmãos de pacientes com DW devem ser selecionados para a doença e acompanhados até a idade adulta, a menos que a DW tenha sido excluída por análise genética.

É preciso ressaltar, conforme mencionado anteriormente, que podem haver dificuldades para a diferenciação entre pacientes com DW e indivíduos heterozigotos.

3.1.7 Tratamento

O objetivo básico do tratamento da DW é promover o balanço negativo de cobre, com a finalidade de remover os depósitos anormais desse metal no organismo. Dessa forma, as estratégias de tratamento empregadas são:

- 1) reduzir a ingesta de cobre: esse procedimento isoladamente não é suficiente para alcançar um balanço negativo de cobre. A orientação aos pacientes consiste apenas em evitar uso frequente de alimentos com alto teor em cobre tais como café, feijão, castanhas, chocolate, crustáceos e fígado (Das, 2009).
- 2) aumentar a excreção de cobre: é a principal forma de tratamento. Há duas opções para se alcançar esse objetivo:
 - a) uso de quelantes como penicilamina e trietilenotetramina (ou trientina) que determinam um aumento acentuado da excreção urinária desse. É a forma mais eficiente para se promover balanço negativo de cobre e, especialmente, a primeira continua sendo a droga mais utilizada (Rosencrantz *et al.*, 2011);
 - b) emprego de metais que induzem balanço negativo de cobre, como o zinco e o molibdênio (tetratiomolibdato);
 - c) transplante de fígado indicado para casos que não respondem ao tratamento clínico.

A Penicilamina:

A penicilamina ($\beta\beta$ -dimetil-cisteína) é um efetivo quelante de cobre, zinco, mercúrio e chumbo, promovendo a excreção desses metais na urina. A administração oral dessa droga promove significativa elevação dos níveis plasmáticos de cobre livre e, conseqüentemente, da sua taxa de excreção urinária, levando a um balanço negativo desse metal, que determina a gradual remoção dos depósitos teciduais anormais.

A penicilamina liga-se ao cobre numa relação de 2 moléculas da droga para um átomo do metal, resultando na formação de complexos que são excretados na urina. Além do efeito quelante, a penicilamina induz a síntese de

metalotioneína no fígado e intestino, resultando em diminuição na absorção do cobre a partir do intestino e, provavelmente, em neutralização do efeito tóxico do cobre no fígado. Essa droga deve ser administrada longe das refeições, evitando-se sua ligação com o cobre, ferro e outros metais presentes nos alimentos, e que reduzem a sua absorção. Os picos plasmáticos e a vida média são de, aproximadamente, 7 horas. A biotransformação hepática é responsável pela maior parte da degradação da penicilamina (Patil *et al.*, 2013).

A dose de penicilamina habitualmente empregada no tratamento da DW é de 1 grama diário, dividido em 4 tomadas. O uso a longo prazo da penicilamina provoca espoliação de piridoxina, que deve ser suplementada na dose de 50 mg por dia (Bandmann *et al.*, 2015). Diante da possibilidade de efeitos colaterais, a titulação da droga deve ser lenta, iniciando-se com 1 comprimido (250mg) distante das refeições, com aumento gradual, a cada 4 a 7 dias, conforme a tolerância, até a dose de 4 tomadas por dia. Doses maiores, de até 2 gramas por dia, podem ser necessárias quando, após os primeiros meses de tratamento, não há evidências clínicas ou laboratoriais de melhora. A dose de manutenção, a longo prazo, pode ser reduzida para 750 mg por dia.

Os principais efeitos colaterais da penicilamina são: reação alérgica, piora do quadro neurológico, leucopenia, poliartrite, síndrome nefrótica, perda do paladar e elastose serpiginosa. A maioria desses efeitos colaterais é reversível, contudo, a nefropatia por imunocomplexos impõe a retirada definitiva da droga (Weiss *et al.*, 2013).

No período inicial de tratamento, perante o risco de efeitos colaterais ou piora do quadro neurológico, o paciente deve ser avaliado a intervalos que não ultrapassem uma semana.

Como parâmetros para avaliação dos resultados, são utilizados dados clínicos e laboratoriais. Os elementos de ordem clínica dependerão do quadro de anormalidades presentes em cada caso. A melhora do quadro clínico habitualmente surge após um ou dois meses de tratamento, porém, em alguns casos, ocorre piora das manifestações neurológicas ou psíquicas nas primeiras semanas de uso de penicilamina. A atenuação progressiva do anel K-F até o seu completo desaparecimento é um dado de grande valor como indicativo da eficácia do tratamento (Suvana, 2008).

Dos parâmetros laboratoriais de monitorização do tratamento, os mais importantes são os níveis de cobre sérico e urinário, que aumentam na fase inicial de uso da medicação e, posteriormente, diminuem progressivamente.

A penicilamina deve ser continuada durante a gravidez, porém a paciente deve ser alertada para a possibilidade da criança nascer com alterações de pele (*cútis laxa*), que são efeitos colaterais decorrentes da ação da droga sobre a maturação do colágeno e da elastina (Patil *et al.*, 2013).

A Trietilenotetramina (trientina):

O dicloridrato de trietilenotetramina é um quelante de cobre que pode ser empregado como alternativa no tratamento da DW, para pacientes com efeitos colaterais graves da penicilamina. Embora seu efeito cuprurético seja inferior ao da penicilamina, essa droga tem se mostrado capaz de promover balanço negativo de cobre e bons resultados clínicos. A administração é feita por via oral e a dose recomendada é de 1 a 1,5 grama por dia, divididos em 4 tomadas distantes das refeições. A toxicidade da trientina é inferior à da penicilamina, embora a experiência clínica com o seu uso seja muito menor que a já acumulada com a penicilamina (Bandmann *et al.*, 2015).

Um dos efeitos colaterais observados com o uso da trientina é a deficiência de ferro, principalmente em pacientes do gênero feminino, que pode ser corrigida com a suplementação desse metal, administrado em horários diferentes daqueles das tomadas do quelante.

Sais de zinco:

O zinco é um oligoelemento essencial cujas necessidades diárias situam-se entre 10-15 mg, variando de acordo com a idade e o gênero. O zinco é opção terapêutica para o tratamento da DW.

O mecanismo de ação do zinco sobre o metabolismo do cobre é bastante diferente do observado com o uso da penicilamina e da trientina, que atuam como quelantes. Os sais de zinco determinam um acentuado bloqueio da absorção intestinal do cobre, aumentando consideravelmente sua excreção fecal, por meio de uma indução da síntese de metalotioneína nos enterócitos (Pal, 2014).

A metalotioneína é um polipeptídeo com alto teor de cisteína (35%) que oferece sítios de ligação para metais, como o cobre, o zinco, o cádmio e o mercúrio, formando mercaptídeos sem capacidade para ultrapassarem a membrana basolateral dos enterócitos e, portanto, atingirem a corrente sanguínea. Entre esses elementos, o de maior avidez para as moléculas de metalotioneína é o cobre, de forma que os enterócitos ficam repletos deste metal e à medida que ocorre o processo normal de descamação da mucosa intestinal, há uma maciça eliminação desse pelas fezes. A metalotioneína é encontrada, ainda, em outros órgãos e tecidos, tais como o fígado e o cérebro, locais em que, possivelmente, a ação indutora de sua síntese também ocorra, contribuindo para neutralizar os efeitos tóxicos do cobre que ocorrem na DW (Pal, 2014).

Os sais de zinco são indicados especialmente nos pacientes assintomáticos (detectados devido ao acometimento de um familiar), em pacientes gestantes e pacientes com efeitos colaterais graves devidos aos quelantes (Almashhraw *et al.*, 2013).

As doses de zinco preconizadas para o tratamento da DW são: acetato de zinco na dose de 170mg 3 vezes ao dia e sulfato de zinco 220mg 3 vezes ao dia, nos intervalos das refeições (Patil *et al.*, 2013).

O tetratiomolibdato:

O tetratiomolibdato é outra droga em estudo há vários anos para o tratamento de pacientes com DW com manifestações neurológicas, como uma opção de menor risco de piora neurológica (Brewer *et al.*, 2009).

A ação depletora de cobre do tetratiomolibdato é peculiar e envolve dois mecanismos. O primeiro ocorre no lúmen intestinal, em que essa droga forma complexos com o cobre dos alimentos evitando sua absorção. A outra forma de atuação da droga se desenvolve quando é ingerida distante das refeições; nessa situação, é, rapidamente, absorvida e, no sangue, forma complexos tripartidos com a albumina e o cobre livre, neutralizando a ação tóxica deste metal. A dose recomendada é de seis tomadas diárias de 20 mg, sendo três nas refeições e outras três nos intervalos dessas (Loudianos *et al.*, 2014)

O tetratiomolibdato pode ter efeito tóxico sobre a medula óssea provocando depressão medular. Por essa razão, a proposta de uso desta droga é apenas para fase inicial do tratamento por um período curto 8 semanas, quando, então, deve ser substituído por outra menos tóxica para a fase de manutenção (Patil *et al.*, 2013).

O tetratiomolibdênio seria uma opção interessante para início de tratamento em casos neurológicos, porém, mesmo nos Estados Unidos da América, país em que droga está sendo testada, seu uso de rotina ainda não foi aprovado pela *Food and Drug Administration*.

Transplante de fígado:

O transplante de fígado está indicado para casos de hepatite fulminante e em pacientes com comprometimento hepático avançado que não melhoram com o tratamento clínico (Chen *et al.*, 2015). É, até o momento, a única forma possível de cura definitiva da doença, levando à correção do defeito hepático e regressão das manifestações da doença em outros órgãos em que o efeito tóxico do cobre ainda não provocou danos definitivos.

Monitorização do tratamento:

Os resultados do tratamento na DW devem ser avaliados com base em aspectos evolutivos do quadro clínico (sistêmico e neurológico), do anel de K-F, dos exames laboratoriais para monitorização da função hepática, dos níveis de cobre sérico e urinário, e da RM de encéfalo.

3.1.8 Prognóstico

O prognóstico da DW é, geralmente, favorável. O tratamento pode prevenir e reverter muitos dos sinais e sintomas, inclusive o anel de K-F. Contudo, se o tratamento é interrompido, pode ocorrer lesão hepática irreversível e fatal (Kaler, 2013).

3.2 Olfato

3.2.1 Função olfatória

A função olfatória é muito importante para todos os seres vivos, inclusive para o homem, apesar do olfato humano ser muito rudimentar quando comparado com o de outros animais. O olfato tem papel fundamental na ingesta alimentar, na percepção do sabor, além de agir na regulação do comportamento sexual e na função de proteção por meio da detecção de substâncias tóxicas. A percepção olfativa é realizada, primariamente, pelo nervo olfatório e, secundariamente, pelo nervo trigêmeo mediante receptores não olfatórios (Doty, 2012).

3.2.2 Bases anatômicas da função olfatória

3.2.2.1 Mucosa olfatória

O processo inicial do olfato começa no epitélio olfatório situado na parte superior das fossas nasais, que cobre a superfície inferior da lâmina crivoide, a superfície superior da parede lateral e a porção superior do septo nasal. Na mucosa olfatória, há diferentes tipos de células: **a célula olfatória ou de Schwann, a célula de sustentação e a célula basal** (Chen *et al.*, 2014).

As células olfatórias ou de Schwann são responsáveis pela detecção dos odores. Estas células, cerca de 6 milhões, **são bipolares** com prolongamento periférico dendrítico semelhante a um tufo de cílios (bulbo dendrítico) que termina sobre a mucosa e com prolongamento central axônico amielínico extremamente fino, em torno de 0, 1-0,3mm de diâmetro. Essas células têm papel de receptor, estão diretamente expostas ao meio ambiente, possuem capacidade de regeneração após algum dano e mínima metabolização xenobiótica. Os axônios das células olfatórias unem-se para formar feixes nervosos, cerca de 20 feixes, cada um revestido por camadas de dura-máter e aracnoide. Estes feixes de fibras amielínicas dos nervos olfatórios

atravessam a lâmina crivoide do osso etmoide como filetes olfatórios para atingir o bulbo olfatório. As terminações nervosas acabam fazendo sinapses com prolongamentos das células mitrais nos glomérulos do bulbo olfatório.

A célula de sustentação é uma célula epitelial colunar de suporte que nutre, sustenta e protege a célula bipolar e isola uma célula receptora olfatória de outra no neuroepitélio olfatório (Chen *et al.*, 2014).

A célula basal é uma célula pequena, localizada na extremidade basal das células de sustentação. Ela repõe as células de sustentação e as células bipolares (Figura 3).

Figura 3 - Neuroepitélio olfatório

3.2.2.2 Bulbo olfatório

O bulbo olfatório está localizado na base do lobo frontal acima da lâmina crivoide do osso etmoide e está dividido em seis camadas: camada de célula granular, camada plexiforme interna, camada de célula mitral, camada plexiforme externa, camada glomerular e camada nervo olfatório. O glomérulo olfatório é um emaranhado de sinapses entre, principalmente, os axônios das células dos receptores olfatórios e os dendritos das células mitrais e em tufo (Doty, 2012).

O desenvolvimento e a manutenção do glomérulo dependem da influência trófica das células receptoras, e, com a idade, a integridade e o número de glomérulos diminuem (Attems *et al.*, 2015).

No bulbo olfatório, há outros tipos de células: os interneurônios, as células em tufo e a célula mitral, que é a principal célula, e recebe axônios de cerca de 1.000 neurônios bipolares (Chen *et al.*, 2014). Há dois tipos de interneurônios inibitórios no bulbo olfatório que influenciam as células mitrais e as células em tufo:

- 1- as células periglomerulares ou justaglomerulares (GABAérgicas) que recebem sinapses excitatórias dos neurônios bipolares e seus axônios entram em outros glomérulos em que fazem sinapses inibitórias axodendríticas.
- 2- as células granulares (dopaminérgicas) que são células sem axônio e com sinapses dendrodentríticas com as células mitrais (Eckmeier *et al.*, 2014).

Esses 2 tipos de interneurônios inibem as células mitrais. O nível de ativação dos dois tipos de células pode ser aumentado pelas fibras centrifugas vindas do núcleo olfatório anterior contralateral. Os axônios das células mitrais e das células em tufo prosseguem ao longo do trato olfatório lateral e projetam-se para estruturas do córtex olfatório primário como o núcleo olfatório anterior, córtex piriforme, núcleo cortical anterior da amígdala, complexo

periamigdalóide e córtex entorrinal rostral (Chen *et al.*, 2014). A Figura 4 mostra as interações entre as células do bulbo olfatório.

O núcleo olfatório anterior (NOA) compreende vários grupos de células piramidais de tamanho médio similares aos neurônios do neocórtex que reforçam os impulsos recebidos das células sensoriais da mucosa olfatória. O NOA inicia-se no bulbo olfatório, estende-se por meio do trato olfatório até confluir com a substância cinzenta do hemisfério cerebral (Patel *et al.*, 2014) e envia axônios a partir da comissura anterior para estimular os neurônios inibitórios do bulbo contralateral. A excitação contralateral dos neurônios inibitórios permite a discriminação do lado (direito ou esquerdo) da estimulação olfatória. O NOA recebe projeções dopaminérgicas da substância negra compacta (Doty, 2012).

Figura 4 - Interações entre as células do sistema olfatório no bulbo olfatório

O sistema olfatório envia fibras diretamente para regiões corticais sem ter sinapses com tálamo. O trato olfatório percorre a superfície inferior do lobo frontal em direção ao trígono olfatório e divide-se em estria olfatória lateral, intermediária e medial que atravessam a substância perfurada anterior para estabelecer múltiplas conexões com estruturas do sistema límbico e córtex cerebral (Patel *et al.*, 2014).

A estria lateral, a maior, projeta vias colaterais para o córtex pré-piriforme e termina no córtex piriforme. O córtex piriforme inclui o córtex da parte mais medial da ínsula (*limen insulae*) e amígdala cortical. A projeção da amígdala para o hipotálamo anterior é responsável pelas respostas parassimpáticas (taquicardia e contrações gástricas) para odores não agradáveis.

A estria olfatória intermediária termina no tubérculo olfatório, uma área do alocórtex rostral para a substância perfurada anterior. A estria olfatória medial entra na área septal (Patel *et al.*, 2014).

3.2.2.3 Córtex olfatório e amígdala

O córtex olfatório primário compreende o córtex pré-piriforme e piriforme, codifica as representações da qualidade, identidade e familiaridade do odor, está associado com o aprendizado e lembrança dos odores, além de coordenar as informações entre olfato, gustação e visão.

O córtex olfatório secundário ocupa a parte final anterior do córtex entorrinal, que inclui o uncus, processa as informações que entram no hipocampo, e está envolvido com a memória e o aprendizado.

O córtex olfatório terciário ocupa a parte posterior do córtex orbitofrontal e está relacionado com a detecção de odores, memória de reconhecimento do odor e aprendizado associativo. A sua parte lateral recebe fibras de associação do córtex primário e secundário; a parte medial recebe do núcleo mediodorsal do tálamo, que recebe do córtex olfatório primário (Wilson *et al.*, 2014).

O córtex orbitofrontal lateral e o córtex prefrontal inferior são ativados por odores desagradáveis, e o córtex orbitofrontal medial e córtex prefrontal ventromedial são ativados por odores agradáveis (Wilson *et al.*, 2014). A Figura 5 mostra as principais aferências do sistema olfatório.

Conexões descendentes vindas do córtex amigdaliano, tubérculo olfatório e área septal entram do fascículo prosencefálico, terminam na formação reticular pontina e são responsáveis pelo efeito de despertar por estimulação olfatória (Wilson *et al.*, 2014).

A amígdala é o maior componente do sistema límbico, e está localizada no lobo temporal medial e límbico (Swanson, 2000), e acredita-se que ela responda apenas à intensidade emocional do odor, ou seja, a odor agradável ou não (Doty, 2012).

Figura 5 - Principais projeções das estruturas do sistema olfatório

3.2.2.4 Percepção do odor

Há muitas teorias que tentam explicar a percepção olfatória, dentre elas, a mais aceita é a do reconhecimento químico. O conceito de reconhecimento químico depende da interação de moléculas odoríferas com receptores especializados, altamente específicos da membrana das células olfatórias. A partícula odorífera atravessa o muco para atingir as células receptoras. As

glândulas de Bowman e as células de suporte produzem o muco em resposta, provavelmente, à estimulação odorífera (Chen *et al.*, 2014).

O muco possui várias camadas com consistências diferentes e o seu pH pode alterar a resposta dos receptores olfatórios. As proteínas contidas no muco desempenham papel importante no clearance de odores, destruição de bactérias, inativação viral, degradação de peptídeos pró-inflamação e substâncias tóxicas (Doty, 2012).

A partícula de odor liga-se ao receptor olfatório, há ativação da adenilciclase, aumento intracelular de concentrações de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), ativação de canais de nucleotídeo cíclico e despolarização neuronal (Ekberg *et al.*, 2014).

Após o estímulo odorífero, um potencial de ação no axônio é desencadeado possivelmente devido a mudanças na polaridade da membrana plasmática através do influxo de íons cátions, como o cálcio. Milhares de axônios de células que expressam o receptor do odor na mucosa nasal atravessam a lâmina crivoide do osso etmoidal e fazem sinapse nos dendritos das células mitrais no bulbo olfatório (Chen *et al.*, 2014).

As células mitrais projetam via nervo olfatório (primeiro nervo craniano) para o córtex entorrinal, bem como, regiões envolvidas com emoção e memória, como amígdala e hipocampo (Barresi, 2012), e seguem para o núcleo olfatório anterior, posteriormente para o córtex piriforme que recebe e envia conexões para diversas estruturas como: complexo amigdalóide, hipotálamo, hipocampo, gânglios da base, tálamo, ínsula, córtex orbitofrontal, córtex entorrinal, córtex periamigdalóide (Doty, 2012).

Baressi *et al.*, 2012, observaram que o córtex orbitofrontal está associado com tarefas relacionadas à semântica e à codificação dos odores. Katata *et al.*, 2009, observaram que o córtex orbitofrontal mediolateral esquerdo e o córtex orbitofrontal lateral direito são, mais frequentemente, ativados nos indivíduos que receberam estímulo olfatório não prazeroso, não agradável. O mesmo estudo notou que o giro cingular anterior direito, estrutura que se acredita estar relacionada com a memória durante a discriminação do odor, é ativada, mais frequentemente, em indivíduos que recebem o odor agradável e esta área poderia estar envolvida no processo de emoções prazerosas.

O sistema olfatório tem plasticidade que é bem observada durante a gravidez em que ocorre aumento na neurogênese. Odores novos também promovem o desenvolvimento de novos interneurônios olfatórios.

Neuroblastos localizados na zona subventricular anterior do cérebro migram rostralmente em direção ao bulbo olfatório e essa migração é expressada pela molécula neural de adesão celular (PSA-NCAM: *polysialylated neural cell adhesion molecule*). Os neuroblastos, quando alcançam o bulbo olfatório, podem se diferenciar em células granulares e periglomerulares. Essa migração de neuroblastos pode ser facilitada pelo estímulo de odor (Chen *et al.*, 2014).

As células imaturas PSA-NCAM no bulbo olfatório expressam receptores de acetilcolina. Esse neurotransmissor promove a sobrevivência de neurônios recém-formados no bulbo olfatório (Kaneko *et al.*, 2006).

3.2.3 Distúrbios do olfato

Distúrbios de olfato são frequentes e acometem ao redor de três milhões de adultos somente nos EUA. Na análise do olfato, alguns fatores como idade, gênero e tabagismo podem interferir nos resultados e a comparação entre estudos sobre disfunção do olfato é limitada devido a estas variáveis e às diferenças culturais na afinidade com odores específicos (Doty, 2012).

A perda do olfato é potencialmente perigosa, pois o paciente com essa disfunção terá dificuldades para perceber alimentos contaminados ou deteriorados e gases tóxicos. Contudo, mesmo no indivíduo anósmico, certas substâncias tóxicas, como a amônia, podem ser detectadas pelas terminações nervosas livres do ramo maxilar do nervo trigêmeo (Doty, 2012).

O olfato diminui no envelhecimento normal e a idade é um fator que tem um impacto maior que o tabagismo (Doty, 2012).

Indivíduos que trabalham com perfumes são menos propensos à perda de olfato com a idade, isto pode indicar que a exposição sistemática a odores pode ser um fator útil de proteção para retardar ou evitar a disfunção olfatória relacionada com a idade (Vennemann *et al.*, 2008).

Dentre as possíveis causas de distúrbio do olfato relacionadas com a idade, está a ossificação e fechamento do forâmen da placa crivoide, a diminuição da densidade e complexidade da inervação adrenérgica na lâmina própria da mucosa olfatória (Chen *et al.*, 2014).

Os receptores olfatórios são vulneráveis a qualquer dano, mas há um mecanismo adaptativo de regeneração por meio de células progenitoras no epitélio da mucosa nasal para manter a homeostase neuronal olfatória, o equilíbrio entre apoptose e a regeneração dos neurônios olfatórios.

O aumento da apoptose de neurônios sensoriais olfatórios e a sobrecarga na capacidade de regeneração do epitélio favorecem a perda olfatória no envelhecimento e nos casos de sinusite (Attems *et al.*, 2015; Fornazieri *et al.*, 2014).

O tabagismo também está relacionado com a disfunção olfatória (Schriever *et al.*, 2013). Outras possíveis causas são: danos cumulativos de receptores olfatórios devido a viroses de repetição e outras lesões no decorrer da vida do indivíduo, e fases precoces de doenças neurodegenerativas (Attems *et al.*, 2014).

A exposição do sistema olfatório a substâncias tóxicas, como derivados do petróleo, dióxido sulfúrico, etanol, metanol, formaldeído, metais pesados, monóxido de carbono, tetracloreto de carbono, nicotina, solventes orgânicos, cocaína, anfetaminas e a antibióticos (tetraciclina, aminoglicosídeos), podem ocasionar a perda do olfato em dias ou anos, podendo ser reversível ou permanente (Palheta Neto *et al.*, 2011). A Tabela 4 mostra as causas de distúrbio de olfato.

Tabela 4 - Causas de distúrbio de olfato

Infecção (sinusopatias virais e bacterianas)
Inflamação (rinite alérgica)
Exposição a toxinas (metanol, derivados do petróleo)
Deficiências nutricionais (deficiência de vitamina A)
Medicamentos (aminoglicosídeos, tetraciclina)
Drogas (cocaína, anfetaminas)
Iatrogênicas
Trauma (lesões em face, trauma crânio-encefálico)
Neurológicas (DP, DA, epilepsia)
Idiopáticas

Apesar da maior parte dos testes de pesquisa do olfato serem simples, não invasivos e de baixo custo, eles são pouco utilizados na prática clínica. Isto se deve, em parte, à falta de divulgação, mas também ao fato de não haver na literatura médica dados definitivos comparando diferentes testes comercialmente disponíveis atualmente.

Os testes para avaliação do odor mais utilizados são o UPSIT (Doty, 2012) e Sniffin' Sticks (SS).

Os testes de olfato são comumente baseados no desempenho exposição a múltiplos odores. A avaliação do olfato pode ser realizada com o teste de limiar, teste de discriminação e teste de identificação do odor. No teste de limiar do odor, são preparadas 16 canetas de glicolpropilene com concentrações decrescentes de concentrações de álcool feniletílico ou butanol, iniciando com a concentração a 4%. Três canetas são apresentadas ao pesquisado, 2 contendo solvente e a terceira com o odor de determinada concentração. O pesquisado deverá identificar a caneta com o odor da diluição do álcool feniletílico. O escore do teste limiar do odor é de zero a 16.

No teste de discriminação do odor, ao pesquisado, são apresentadas 16 conjuntos com 3 canetas cada, duas com solvente e uma com outro odor. O pesquisado deverá informar qual a caneta com odor diferente do solvente.

O teste de identificação do odor é o mais utilizado para a avaliação do olfato e há diversas versões, como o UPSIT (Doty, 2012) e Sniffin' Sticks (SS). No presente estudo, optou-se pelo teste de identificação SS, que é uma versão

européia de teste de avaliação do olfato, utilizado, principalmente, na Alemanha (Hummel *et al.*, 1997).

A perda do olfato é grave e ocorre com frequência em doenças neurodegenerativas como DA e DP (Mesholam *et al.*, 1998; Hawkes, 2003) e, também, no Complexo Parkinsonismo-Demência de Guam (CPDG). Outros distúrbios neurológicos podem afetar a percepção olfatória como traumatismo crânio-encefálico, epilepsia (Restrepo *et al.*, 2014) e esclerose múltipla (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2013).

Na DA e na DP, a perda olfatória é bilateral, aparece nos estágios iniciais dessas doenças e, embora seja acentuada, raramente há anosmia. Na demência com corpos de Lewy (DCL), o olfato está gravemente comprometido. Na doença de Huntington (DH) e na atrofia de múltiplos sistemas (AMS), há perda moderada da função olfatória. Por outro lado, na paralisia supranuclear progressiva (PSP), na degeneração córtico-basal (DCB) e no parkinsonismo induzido por MPTP (P-MPTP), o olfato é normal ou discretamente alterado (Doty, 2012).

A deficiência do olfato na DW foi pouco estudada até o momento, provavelmente, por se tratar de uma doença rara e devido à complexidade do sistema olfatório.

Ruiz, 1997, relatou que os pacientes com DW apresentavam dificuldade para perceber odores desagradáveis. Mueller *et al.*, 2006, analisaram 24 pacientes com DW (11 com manifestação hepática e 13 com manifestação neurológica) e em 17 indivíduos foi evidenciada disfunção do olfato.

Diante do fato de haver apenas um estudo relacionando a alteração do olfato e DW, este presente estudo propôs a selecionar um grupo de pacientes com degeneração hepato-lenticular e avaliar a sua olfação.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Estudo transversal comparando o grupo de portadores de DW com e sem manifestação neurológica, e grupo-controle.

4.1 Seleção da casuística

4.1.1 Seleção dos pacientes com DW

Os pacientes analisados estavam em acompanhamento no Ambulatório de Distúrbios de Movimento da Divisão de Neurologia do HC-FMUSP e na Divisão de Gastroenterologia e Hepatologia da mesma instituição no período de agosto de 2009 a novembro de 2012.

Os critérios de inclusão para os pacientes com DW foram:

- 1) diagnóstico de DW, com ou sem manifestação neurológica, definido pelos critérios propostos por Scheinberg e Sternlieb (1984) baseados na apresentação clínica, presença de anel de K-F, dosagem sérica de ceruloplasmina, e dosagem sérica e urinária de cobre;
- 2) ausência de prejuízo cognitivo que comprometesse a obtenção dos dados do estudo;
- 3) ausência de outras doenças neurodegenerativas;
- 4) desejo ou disponibilidade dos indivíduos em participar do estudo;
- 5) indivíduos sem sinais de infecção aguda em vias respiratórias no momento da aplicação do teste de identificação do odor; e
- 6) indivíduos sem história de trauma ou procedimento cirúrgico em face ou região nasal, e exposição a poluentes químicos e produtos de limpeza.

Os critérios de exclusão dos pacientes com DW foram:

- 1) pacientes com quadro infeccioso ou inflamatório em vias aéreas superiores no momento da aplicação do teste de identificação do odor;
- 2) indivíduos com trauma ou cirurgia em região de face;
- 3) pacientes com outras doenças neurológicas além da DW;
- 4) pacientes submetidos a transplante hepático;
- 5) pacientes com distúrbio cognitivo; e
- 6) recusa em participar do estudo.

4.1.2 Seleção dos controles

O grupo-controle foi constituído por indivíduos recrutados no ambulatório de Neurologia do HCFMUSP e na comunidade da cidade de São Paulo, São Paulo.

Os critérios de inclusão dos casos controles foram:

- 1) indivíduos saudáveis com disponibilidade em participar do estudo;
- 2) ausência de distúrbio prévio do olfato;
- 3) indivíduos sem sinais de infecção aguda em vias respiratórias no momento da aplicação do teste de identificação do odor; e
- 4) indivíduos sem história de trauma ou procedimento cirúrgico em face ou região nasal, e exposição a poluentes químicos e produtos de limpeza.

Os critérios de exclusão do grupo-controle foram:

- 1) presença de quadro infeccioso ou inflamatório em vias áreas superiores;
- 2) indivíduos com trauma ou cirurgia em região da face;

- 3) presença de distúrbio cognitivo; e
- 4) recusa em participar do estudo.

A todos os indivíduos, pacientes e controles, foi aplicado um questionário e as seguintes informações foram coletadas:

- a) idade;
- b) data de nascimento;
- c) gênero;
- d) grau de escolaridade;
- e) história de uso de tabaco (passivo ou ativo);
- f) história familiar de doença neurológica ou distúrbio psiquiátrico;
- g) presença ou ausência de sinusite crônica ou problema nasal;
- h) questionado sobre a sua percepção olfativa e do paladar;
- i) presença de outras patologias e uso de medicações;
- j) realização do MEEM (Anexo A); e
- h) tempo de duração da DW para os pacientes com e sem manifestação neurológica.

O MEEM foi utilizado, segundo os critérios de Brucki *et al.* (2003), para avaliar a presença de possíveis distúrbios cognitivos nos indivíduos analisados (pacientes com DW e controles).

Foram excluídos os indivíduos que apresentaram pontuação de MEEM menor ou igual a 24 pontos e, nos casos de indivíduos analfabetos, pontuação de MEEM menor de 20 pontos. Esse critério foi adotado no presente estudo para excluir indivíduos com déficit cognitivo que pudessem prejudicar a realização do teste de olfação.

O presente estudo foi realizado por neurologista treinado na avaliação do olfato (a autora). Todos os indivíduos foram submetidos à anamnese (Anexo B) e ao teste de identificação do odor SS-16.

Nos pacientes com DW com manifestação neurológica, foi aplicado o protocolo de avaliação da Clínica Neurológica da FMUSP para análise do quadro neurológico. A avaliação neurológica foi realizada de forma

sistematizada e quantitativa, aplicando-se uma escala de 13 itens abrangendo as manifestações mais comuns observadas na DW em nosso meio (Barbosa *et al.*, 1991). Esta escala já foi utilizada anteriormente (Machado *et al.*, 2006) e se baseia na análise dos seguintes parâmetros: 1) oligocinesia; 2) rigidez (hipertonia plástica); 3) instabilidade postural; 4) tremor; 5) distonia; 6) coreia; 7) atetose; 8) distúrbios cerebelares; 9) disartria; 10) disfagia; 11) alteração da marcha; 12) distúrbios psiquiátricos (cognitivos e comportamentais); e 13) outras alterações. A intensidade de cada uma das manifestações foi graduada de 0 a 3 (ausente, leve, moderada e grave). Assim, obteve-se uma pontuação neurológica com faixa de variação de 0 a 39 pontos.

Tendo como base esta pontuação, a severidade do quadro neurológico é graduada da seguinte forma: assintomático (zero); acometimento leve (1-5), moderado (6-10) ou grave (acima de 10). A pontuação total, após a aplicação do protocolo de avaliação da Clínica Neurológica da FMUSP aos pacientes com DW com manifestação neurológica, será denominada de pontuação ou escore neurológico.

No presente estudo, foram analisados 37 portadores de DW com manifestação neurológica, 24 portadores de DW sem manifestação neurológica e 59 indivíduos normais que formaram o grupo-controle.

Dezenove indivíduos do grupo de pacientes com DW foram excluídos do estudo: onze porque não tinham interesse em participar da pesquisa, sete porque apresentavam algum déficit cognitivo e um paciente por ter realizado transplante hepático (Figura 6).

Figura 6 - Fluxograma dos métodos

Os pacientes DW com manifestação neurológica apresentavam idades entre 19 e 58 (média $33,38 \pm 9,79$) anos, os pacientes DW sem manifestação neurológica apresentavam idades entre 13 e 53 (média $29 \pm 9,61$) anos e o grupo-controle entre 12 e 56 (média $33,81 \pm 10,67$) anos.

No grupo-controle, a escolaridade variou entre 4 a 17 (média $13,35 \pm 4,07$) anos de instrução. A variação de escolaridade nos pacientes com DW sem e com manifestação neurológica foi a mesma, ou seja, entre 5 e 16, mas a média no grupo de pacientes sem manifestação neurológica foi maior (média $11,83 \pm 2,91$) anos de instrução do que nos pacientes com DW com manifestação neurológica (média $9,94 \pm 2,88$) anos de instrução.

A variação no MEEM foi entre 24 e 30 pontos no grupo de DW com manifestação neurológica, e entre 25 e 30 pontos no grupo de DW sem manifestação neurológica. Em contrapartida, no grupo-controle, evidenciou-se variação entre 20 e 30 pontos.

Na análise do tempo de doença nos pacientes com DW com manifestação neurológica, observou-se variação entre 0, 1 e 35 anos, e nos pacientes com DW sem manifestação neurológica entre 0, 25 e 32 anos.

Todos os pacientes com DW estavam em tratamento: 47 (77%) com penicilamina, 7 (11,5%) com trientine e 7 (11,5%) com sais de zinco.

4.1.3 Análise do olfato

O teste de SS- 16 (Burghart®, Wedel, Germany) é um teste para análise da função olfatória e consiste de três subtestes:

- 1) teste de limiar: análise da percepção do odor a baixas concentrações,
- 2) teste de discriminação: distinção não verbal de diferentes odores, e
- 3) teste de identificação: habilidade de nomear o odor.

No teste de limiar do odor do SS-16, são preparadas 16 canetas de glicolpropilene com concentrações decrescentes de concentrações de álcool fenilético ou butanol iniciando com a concentração a 4%. Três canetas são apresentadas ao pesquisado, 2 contendo solvente e a terceira com o odor de determinada concentração. O pesquisado deverá identificar a caneta com o odor da diluição do álcool fenilético ou butanol. O escore do teste limiar do odor é de zero a 16.

No teste de discriminação do odor SS-16, ao pesquisado, são apresentados 16 conjuntos com 3 canetas cada, duas com solvente e uma com outro odor. O pesquisado deverá informar qual a caneta com odor diferente do solvente. O escore do teste de discriminação é de zero a 16. O teste de identificação do odor SS-16 consiste de 16 canetas numeradas e cada uma contém um odor e quatro opções de escolha. As alternativas de respostas para cada odor encontram-se escritas em folhas de papel e são apresentadas ao examinado (Anexo C). Cada caneta tem um comprimento de, aproximadamente, 14 cm e um diâmetro de 1,3 cm. Na ponta, há líquido com odor dissolvido em material de glicolpropileno. Para a avaliação do odor, a tampa é removida e a ponta da caneta é colocada a cerca de 2-3 cm de ambas as narinas do examinado e mantida por, aproximadamente, 3 segundos. O examinador, após, apresenta as opções a escolher correspondentes à caneta analisada e solicita que o examinado identifique o odor. O intervalo entre a apresentação de uma caneta e outra é de, aproximadamente, 30 segundos (Hummel *et al.*, 1997). Este procedimento é realizado sucessivamente até as

16 canetas serem analisadas. A cada resposta correta, corresponde um ponto, portanto, o resultado varia de zero a 16 pontos.

Consequentemente, para cada subteste, há uma pontuação de zero a 16 (Hummel *et al.*, 2007). O resultado do teste SS é a soma dos pontos obtidos no limiar, na discriminação e na identificação. O percentil 10 deste escore é o índice usado como guia para estimar a habilidade olfatória individual, portanto, separa indivíduos com hiposmia de normosmia (Hummel *et al.*, 2006). No presente estudo, a pontuação de 10 respostas corretas no teste de identificação do odor SS-16 foi o índice utilizado.

A avaliação da pontuação total (limiar + discriminação + identificação) é baseada em estudo realizado por Kobal *et al.* (2000) em mais de 1000 indivíduos que padronizou as diferentes categoriais de função olfatória, ou seja, anosmia pontuação total menor que 15 pontos, hiposmia severa pontuação entre 15 e 20 pontos, hiposmia moderada entre 20 e 25 pontos hiposmia discreta entre 25-30 acima de 30 pontos. Desta forma, quando todos os itens do teste SS são realizados (limiar, discriminação e identificação) e algum desses itens mostrar um desempenho abaixo dos padrões de pontuação de normalidade e os demais itens não, o escore final poderá evidenciar uma disfunção do olfato.

No presente estudo, foi realizado somente o subteste de identificação do odor SS-16 devido à pesquisadora ter experiência com o método, por este já ter sido utilizado em outros estudos (Silveira-Moriyama *et al.*, 2008; Moscovich *et al.*, 2012), a disponibilidade desse material, que é de alto custo financeiro, maior praticidade na aplicação do teste, bem como avaliar se apenas este teste é suficiente para o diagnóstico precoce e diferencial de pacientes com DW.

Fatores como diferenças culturais e odores desconhecidos para o indivíduos avaliados poderiam interferir na análise do olfato (Orhan *et al.*, 2012). Entretanto, o teste de identificação do odor SS-16 foi empregado tanto neste estudo quanto em outros na Clínica Neurológica do HCFMUSP (Silveira-Moriyama *et al.*, 2008; Moscovich *et al.*, 2012) com adaptações realizadas anteriormente como, por exemplo: a alternativa de resposta alcaçuz foi substituída por erva-doce que, culturalmente, é mais conhecida no nosso meio.

4.2 Análise estatística

O programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), em sua versão 13.0, foi utilizado para a obtenção dos resultados. O nível de significância de 5% (0,050) foi adotado para a aplicação dos testes estatísticos.

Os testes estatísticos empregados para avaliação das variáveis nos grupos do presente estudo estão detalhados a seguir:

- a) teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para analisar a distribuição dos dados em cada um dos grupos. Quanto ao valor indica significância neste teste, a distribuição está significativamente diferente da normal;
- b) teste de Kruskal-Wallis para investigar uma possível diferença entre os 3 grupos para cada uma das variáveis contínuas;
- c) teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para a testagem por pares de variáveis;
- d) teste Chi-quadrado;
- e) teste de correlação de Spearman;
- f) regressão linear múltipla.

Por se tratar de enfermidade rara, não se aplicaram cálculos estatísticos como cálculo amostral para determinação do número de casos (n) na população geral.

Os dados foram armazenados em registros escritos e em computadores pessoais, em programas de Excel e Windows 2007, em banco de dados para análises posteriores por tempo indeterminado. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas FMUSP, Protocolo número 1070/08 (Anexo D); e todos os pacientes e controles incluídos no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo E).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Na avaliação do teste de identificação SS-16, foi observado que o escore-SS-16 variou entre 5 e 16 pontos no grupo DW com manifestação neurológica, no grupo DW, sem manifestação neurológica entre 7 e 15 pontos e, no grupo-controle, demonstrou entre 7 e 16 pontos.

O paladar foi avaliado subjetivamente e apenas um indivíduo do grupo-controle relatou diminuição desta função sensorial e, no teste de identificação SS-16, obteve 13 respostas corretas, portanto, valor acima da média de resultado de SS dos participantes do estudo.

5.1 Análise univariada das variáveis contínuas

5.1.1 Análise da distribuição dos dados nas variáveis contínuas

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para analisar a distribuição dos dados em cada um dos grupos. A Tabela 5 mostra a distribuição dos dados dos pacientes com DW e do grupo-controle, e os valores de “p” para estas variáveis.

Tabela 5 - Distribuição dos dados dos pacientes com DW e controle

Variáveis	DW com manifestação nerológica n = 37	DW sem manifestação nerológica n = 24	Controle n = 59
Gênero n feminino (%)	16 (43, 24%)	11 (45,83%)	24 (40,67%)
Idade média ± dp (anos)	33,38 ± 9,79 p = 0,015	29 ± 9,61 p = 0,749	33,81 ± 10,67 p = 0,046
escolaridade média ± dp (anos)	9,94 ± 2,88 p = 0,039	11,83 ± 2,91 p = 0,085	13,35 ± 4,07 p < 0,001
MEEM média ± dp (pontos)	28 ± 1,65 p = 0,004	29, 20 ± 1,44 p < 0,001	28,68 ± 2,54 p < 0,001
duração da doença média ± dp (anos)	11,68 ± 8, 12 p = 0,024	10,71 ± 7,81 p = 0,089	NA
escore neurológico média ± dp (pontos)	8,02 ± 4,92 p = 0,067	NA	NA
escore SS média ± dp (pontos)	12,03 ± 2, 21 p < 0,001	12, 15 ± 2,07 p = 0,053	12,70 ± 2,03 p = 0,001

NA: não aplica; n: número de indivíduos; dp: desvio-padrão; MEEM: miniexame do estado mental; SS: Sniffin' Sticks;
p: valor de significância teste de Shapiro-Wilk.

5.1.2 Comparações univariadas das variáveis contínuas entre os grupos

Para investigar uma possível diferença entre os 3 grupos (DW com manifestação neurológica, DW sem manifestação neurológica e controle) para cada uma das variáveis contínuas, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, que revelou uma diferença significativa na distribuição das variáveis entre os grupos para escolaridade ($p < 0.001$), escore no MEEM ($p < 0.001$), escore neurológico ($p < 0.001$), duração da doença ($p < 0.001$), e uma tendência a significância para a diferença entre grupos no escore do SS-16 ($p = 0.092$). Não houve diferença significativa na distribuição da idade e gênero entre os grupos.

Para as variáveis em que foi encontrada uma diferença, foi realizada a análise por pares de variáveis por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney, usando-se uma correção para várias comparações multiplicando-se o valor de “p” no teste de Mann-Whitney pelo número de comparações. A Tabela 6 mostra os resultados desta análise.

Tabela 6 - Análise por pares das variáveis

Variável	Comparação DW com manifestação hepática vs DW com manifestação neurológica	Comparação DW com manifestação neurológica vs controle	Comparação DW com manifestação hepática vs controle
	p*	p *	p *
Escolaridade (anos)	p=0,006	p<0.001	p=0,072
Escore de MEEM (0-30 pontos)	p=0,003	p=0.001	p=0.99
Escore neurológico (0-39 pontos)	p<0.001	NA	NA
Duração da doença (anos)	p=0,548	NA	NA
Escore de SS (0-16 pontos)	p>0.99	p=0,099	p=0,717

NA: não aplica; MEEM: miniexame do estado mental; SS: Sniffin' Sticks. Teste de não paramétrico de Mann-Whitney; p*= p corrigido

Na comparação do MEEM entre o grupo de pacientes com DW com manifestação neurológica e o grupo DW sem manifestação neurológica, foi evidenciada diferença significativa ($p<0,003$), bem como, na comparação entre pacientes com DW com manifestação neurológica e grupo-controle ($p<0,001$).

As figuras de número 7, 8, 9 e 10 mostram uma representação gráfica da distribuição dos dados e da diferença entre os grupos para as variáveis contínuas

Figura 7 - Representação gráfica da variável idade entre os 3 grupos: controle, DW com manifestação neurológica e DW com manifestação hepática. A mediana (linha horizontal) está dentro da caixa que contém o centro de 50% das observações e a barra de erro contém o centro de 95% das observações ordenadas

Figura 8 - Representação gráfica da variável escolaridade entre os 3 grupos: controle, DW com manifestação neurológica e DW com manifestação hepática. A mediana (linha horizontal) está dentro da caixa que contém o centro de 50% das observações e a barra de erro contém o centro de 95% das observações ordenadas

Figura 9 - Representação gráfica da variável MEEM entre os 3 grupos: controle, DW com manifestação neurológica e DW com manifestação hepática. A mediana (linha horizontal) está dentro da caixa que contém o centro de 50% das observações e a barra de erro contém o centro de 95% das observações ordenadas

Figura 10 - Representação gráfica da variável escore SS-16 entre os 3 grupos: controle, DW com manifestação neurológica e DW com manifestação hepática. A mediana (linha horizontal) está dentro da caixa que contém o centro de 50% das observações e a barra de erro contém o centro de 95% das observações ordenadas

5.2 Análise univariada das variáveis nominais

As variáveis nominais foram comparadas entre os grupos usando o teste de Chi-quadrado. A Tabela 7 mostra a distribuição destas variáveis entre os grupos e o resultado das comparações

Na análise do gênero, tabagismo e percepção do olfato nos 3 grupos, não se observou diferença significativa.

A análise subjetiva na percepção do olfato foi observada em um controle e em seis pacientes com DW (2 do grupo de pacientes sem manifestação neurológica e 4 com manifestação neurológica), mas apenas dois indivíduos com DW com manifestação neurológica apresentaram escore do exame de identificação do olfato SS igual a 11 pontos, portanto, abaixo da média do grupo-controle

Tabela 7 - Análise das variáveis nominais

	DW com manifestação neurológica	DW com manifestação hepática	Controle	Chi-quadrado
Gênero n (% feminino)	16 (43, 2%)	11 (45,8%)	24 (40,7%)	p = 0.906
Tabagismo n (% de tabagista)	4 (10,8%)	1 (4, 2%)	2 (3,4%)	p = 0.29
Presença de queixa do olfato n (% sim)	4 (10,8%)	2 (8,3%)	1 (1,7%)	p = 0.15

5.3 Análises dos fatores que influenciam o olfato

5.3.1 Gênero

A distribuição dos escores do SS-16 segundo o gênero estão representadas na Figura 11. O teste de Mann-Whitney não relevou associação entre olfato e gênero (p=0,85).

Figura 11 - Distribuição do escore SS-16 segundo a variável gênero nos 3 grupos. A mediana (linha horizontal) está dentro da caixa que contém o centro de 50% das observações e a barra de erro contém o centro de 95% das observações ordenadas.

5.3.2 Tabagismo

A distribuição dos escores do SS-16 segundo tabagismo estão representadas na Figura 12. O teste de Mann-Whitney não relevou associação entre olfato e tabagismo ($p=0.601$).

Figura 12 - Distribuição do escore SS-16 segundo a variável tabagismo nos 3 grupos. A mediana (linha horizontal) está dentro da caixa que contém o centro de 50% das observações e a barra de erro contém o centro de 95% das observações ordenadas

5.3.3 Idade

A distribuição dos escores do SS-16 segundo a idade está representada na Figura 13. O teste de correlação de Pearson, assim como o de Spearman, não revelou associação entre olfato e idade ($p=0,73$ para Pearson, $p=0,74$ para Spearman).

Figura 13 - Distribuição do escore SS-16 segundo a variável idade nos 3 grupos

5.3.4 Desempenho cognitivo

A distribuição dos escores do SS-16 segundo o escore no MEEM está representada na Figura 14. O teste de correlação de Pearson, assim como o de Spearman, revelou associação entre olfato e escore no MEEM ($p=0.005$ e $R=0.254$ para Pearson, $p=0.001$, e $R=0.304$ para Spearman).

Figura 14 - Distribuição do escore SS-16 segundo a variável MEEM

5.3.5 Escolaridade

A distribuição dos escores do SS-16 segundo o grau de escolaridade está representada na Figura 15. O teste de correlação de Pearson, assim como o de Spearman, revelaram associação entre olfato e anos de escolaridade ($p=0.006$ e $R=0.249$ para Pearson; e $p=0.002$ e $R=0.279$ para Spearman).

Figura 15 - Distribuição do escore SS-16 de acordo com a escolaridade

5.3.6 Fatores que potencialmente influenciam o olfato

5.3.6.1 Relação entre olfato e duração da doença

A distribuição dos escores do SS-16 segundo duração da doença no grupo de pacientes com DW (com e sem manifestação neurológica, $N=61$) está representada na Figura 16. O teste de correlação de Pearson, assim como o de Spearman, não revelaram associação entre olfato e idade ($p=0.109$ para Pearson, $p=0.226$ para Spearman).

Figura 16 - Distribuição do escore SS-16 de acordo com o tempo de doença

5.3.6.1 *Relação entre olfato e escore neurológico*

O teste de correlação de Pearson, assim como o de Spearman, não revelaram associação entre olfato e o escore neurológico ($p=0.194$ para Pearson, $p=0.261$ para Spearman) no grupo de pacientes com DW com manifestação neurológica.

5.4 **Análise multivariada do olfato nos três grupos**

Para avaliar simultaneamente a influência dos vários fatores sobre o desempenho na percepção olfativa, foi realizada uma regressão linear múltipla, usando o escore no SS-16, como variável dependente, e, como variáveis independentes, os fatores: gênero, idade, tabagismo, escore no MEEM e grau de escolaridade (anos de instrução).

O modelo da regressão explicou significativamente as variações nos dados (p para ANOVA do modelo = 0.027), e o fator que influenciou significativamente o escore no SS-16 foi somente o MEEM ($p=0.03$, intervalo

de confiança a 95% para $\beta = 0.023 - 0.439$), enquanto que os outros não foram significativos ($p > 0.17$ para todos, exceto escolaridade $p = 0.094$, intervalo de confiança a 95% para $\beta = 0.16 - 0.96$). As premissas para a regressão foram checadas por meio da inspeção visual dos gráficos dos resíduos.

5.5 Sensibilidade e especificidade

No presente estudo, foi realizada análise da sensibilidade e especificidade do teste de identificação do odor SS-16, e foram observados baixos índices de correlação. Na Tabela 8, são mostrados os resultados desta avaliação.

Tabela 8 - Correlação sensibilidade e especificidade do teste SS16

Valores de SS	Sensibilidade	Especificidade
<4,00	0,0	100,0
<5,50	1,6	100,0
<6,50	3,3	100,0
<7,50	4,9	98,3
<9,00	8, 2	98,3
<10,50	14,8	84,7
<11,50	29,5	79,7
<12,50	54, 1	64,4
<13,50	77,0	42,4
<14,50	91,8	15,3
<15,50	96,7	1,7
<17,00	100,0	0,0

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A avaliação do olfato foi negligenciada na prática médica no passado, mas sabe-se, atualmente, que o comprometimento desta função sensorial pode ser uma manifestação precoce de algumas doenças neurodegenerativas e, portanto, a detecção deste tipo de alteração neurológica pode contribuir para o diagnóstico precoce destas afecções. As vias olfatórias estão relacionadas com diversos circuitos neuronais subcorticais e corticais, e representam importante linha de estudo neurofisiológico (Doty, 2012).

Conforme mencionado anteriormente, vários estudos evidenciam a presença de déficit olfatório em indivíduos com doenças neurológicas como a DP (Godoy *et al.*, 2015), mas há poucos relatos sobre o distúrbio do olfato em doenças metabólicas como a DW.

No presente estudo, o olfato foi analisado em 61 pacientes com DW e 59 controles. Sete indivíduos, dos quais 4 pertenciam ao grupo de pacientes com DW com manifestação neurológica, 2 ao grupo de pacientes com DW sem manifestação neurológica e um ao grupo-controle referiram diminuição subjetiva do olfato. Entretanto, na avaliação com o teste utilizado, destes 7 indivíduos apenas 1 indivíduo do grupo com DW sem manifestação neurológica e 2 do grupo DW com manifestação neurológica apresentaram objetivamente diminuição do olfato. Na comparação estatística entre o grupo de pacientes e o grupo-controle, não houve diferença entre os dois grupos quanto ao desempenho no teste de identificação do odor SS-16. Na comparação entre os dois subgrupos de pacientes com DW com e sem manifestação neurológica, também não houve diferença significativa no teste de identificação do odor SS-16.

Na análise dos resultados do presente estudo, alguns fatores que poderiam influenciar a função olfatória, como idade, gênero, tabagismo, tratamento medicamentoso, grau de escolaridade, MEEM, escore neurológico e duração da DW, devem ser discutidos.

O melhor desempenho da percepção do odor ocorre entre 20 e 40 anos, e, depois, começa a declinar (Doty, 2012).

Múltiplos fatores podem contribuir para a disfunção do olfato relacionada à idade: perda de células receptoras na mucosa nasal, substituição do epitélio olfatório pelo respiratório, calcificação da lâmina crivoide, diminuição dos glomérulos e das células mitrais no bulbo olfatório, e alterações estruturais e funcionais das áreas do córtex olfatório. A redução da percepção do olfato também está associada com a diminuição das habilidades cognitivas e declínio da memória (Mullol *et al.*, 2012; Attems *et al.*, 2015).

A maior parte dos indivíduos avaliados no presente estudo estava na faixa etária de melhor desempenho da percepção de odor, ou seja, 83,6% dos pacientes com DW e 71% dos indivíduos do grupo-controle encontravam-se entre 20 e 40 anos de idade. A idade média do grupo de pacientes com DW foi de $31,54 \pm 9,82$ anos e, no grupo-controle, de $33,81 \pm 10,67$ anos. Na análise estatística do presente estudo, a idade não interferiu significativamente na percepção do olfato.

As diferenças anatômicas e metabólicas existentes entre os gêneros podem contribuir para um melhor desempenho do sexo feminino na avaliação do olfato em indivíduos saudáveis (Frasnelli *et al.*, 2010) e em portadores de doenças neurodegenerativas (Sharer *et al.*, 2014).

Garcia-Falgueras *et al.* (2007) demonstraram que a melhor percepção do olfato no gênero feminino estaria relacionada com as diferenças estruturais nas áreas envolvidas com o olfato. No gênero masculino, observa-se maior concentração de substância negra no córtex entorinal (área 28 de Brodmann), pálido ventral direito, córtex insular dorsal esquerdo e córtex orbitofrontal (área 25 de Brodmann), em contrapartida, no gênero feminino, é observada a maior proporção de substância cinzenta no córtex orbifrontal (áreas 10, 11 e 25 de Brodmann) e córtex temporomedial (hipocampo bilateralmente e amígdala direita) e córtex insular basal esquerdo, portanto, regiões envolvidas mais diretamente com a identificação do odor. Yousem *et al.* (1999) demonstraram que o cérebro do gênero feminino era mais ativado principalmente nas regiões frontal inferior direita e esquerda, e áreas perisilvianas, do que no gênero masculino, regiões envolvidas na identificação do odor.

Além das diferenças anatômicas, Bengtsson *et al.* (2001) evidenciaram diferenças relacionadas ao metabolismo da glicose que são observadas no estudo com PET (*Positron Emission Tomography*). Essas diferenças podem ser explicadas pela ação de hormônios sexuais no desenvolvimento e metabolismo do cérebro. A testosterona e o estrógeno estão envolvidos no desenvolvimento do cérebro, e, por meio da ação de receptores, andrógenos e estrogênicos, respectivamente, localizados em diferentes regiões no SNC, produzem diferenças estruturais e metabólicas. (Zaidi *et al.*, 2010). Os hormônios sexuais podem interferir nas circuitárias neurais em estruturas envolvidas com o olfato. Os andrógenos podem deprimir e os estrógenos favorecer a um desempenho olfatório melhor (Doty, 2010).

No presente estudo, não foi observada diferença significativa no desempenho do olfato entre os gêneros.

O tabagismo é outro fator que pode interferir nos resultados da análise do olfato. A exposição ao tabaco está relacionada com a atrofia do bulbo olfatório, portanto, favorece a disfunção do olfato (Schriever *et al.*, 2013). No nosso estudo, o tabagismo, tanto passivo quanto ativo, não influenciou significativamente ($p=0,29$) na percepção do olfato.

Com relação ao tratamento medicamentoso da DW com penicilamina e trientina, não há evidência na literatura de que essas medicações possam interferir no olfato. Há estudos evidenciando que o uso prolongado da penicilamina pode ocasionar diminuição do paladar (Weiss *et al.*, 2013). Na análise subjetiva sobre o paladar, apenas um indivíduo do grupo-controle referiu diminuição na percepção desta função sensorial, mas sem alteração na análise objetiva com o teste de identificação SS-16. Os sais de zinco também são utilizados no tratamento de DW, mas apenas a deficiência deste metal pode ocasionar o distúrbio olfatório (Hagmeyer *et al.*, 2015). No presente estudo, o tratamento medicamentoso não interferiu estatisticamente na percepção do olfato.

O MEEM, desde a sua publicação inicial (Folstein *et al.*, 1975), tornou-se importante instrumento tanto clínico, para a detecção de perdas cognitivas, como de pesquisa, sendo empregado em vários estudos epidemiológicos populacionais. Os escores totais do MEEM são influenciados pela

escolaridade. Brucki *et al.* (2003) sugeriram os seguintes escores medianos de escolaridade: analfabetos: 20; de 1 a 4 anos, 25; de 5 a 8 anos, 26; de 9 a 11 anos, 28; e, para indivíduos com escolaridade superior a 11 anos, 29 pontos.

No grupo de pacientes com DW com manifestação neurológica, a média do MEEM foi de $28 \pm 1,65$, no grupo de pacientes com DW sem manifestação hepática, a média foi de 29, $20 \pm 1,44$ e, no grupo-controle, a média foi de $28,68 \pm 2,54$ pontos. Na análise do grau de escolaridade, foi observada que, no grupo de pacientes com DW com manifestação neurológica, foi de $9,94 \pm 2,88$ anos de instrução, no grupo de DW sem manifestação neurológica, de $11,83 \pm 2,91$ anos de instrução, e, no grupo-controle média, de $13,35 \pm 4,07$ anos de instrução. No teste de correlação de Pearson e o de Spearman, revelaram associação entre o olfato e o escore do MEEM ($p=0,005$, $R=0,254$ Pearson; $p=0,001$ e $R=0,304$ Spearman) e o grau de escolaridade ($p=0,006$, $R=0,249$ para Pearson, $p=0,002$ e $R=0,279$ para Spearman) nos grupos analisados (pacientes com DW e grupo-controle). Na análise de regressão linear múltipla, foi observado que somente o MEEM influenciou significativamente o escore no SS-16 ($p=0,03$, intervalo de confiança a 95% para $\beta = 0,023 - 0,439$).

O grupo de pacientes com DW com manifestação neurológica apresentou o escore de MEEM inferior aos indivíduos dos outros grupos provavelmente devido às consequências do depósito de cobre em nível de SNC. Os pacientes com DW com manifestação neurológica podem apresentar quadros psiquiátricos e manifestações comportamentais (Zimbrian, 2014) que poderiam interferir no desempenho escolar.

A correlação entre MEEM e o escore de testes de identificação do odor têm sido objeto de estudos. Streit *et al.* (2015) observaram que indivíduos com MEEM normal, mas, com alteração no teste de identificação SS, o déficit olfatório poderia ser indicativo de distúrbio cognitivo leve. Velazquez-Perez *et al.* (2006) observaram que não havia diferença significativa nos escores do teste de identificação de odor UPSIT entre o grupo de pacientes com ataxia espinocerebelar tipo 2 e o grupo-controle quando os indivíduos demenciados foram excluídos por meio do MEEM.

O escore neurológico interferiu significativamente na identificação do odor SS-16 no grupo de pacientes com DW com manifestação neurológica

comparando com o grupo de pacientes com DW sem manifestação neurológica ($p < 0,001$). O depósito de cobre em áreas envolvidas na percepção do odor (Bandmann *et al.*, 2015), em pacientes com DW com manifestação neurológica, poderia contribuir para a disfunção olfatória.

O tempo médio de duração da DW no grupo de pacientes sem manifestação neurológica foi de $10,71 \pm 7,81$ e, no grupo de pacientes com manifestação neurológica, foi de $11,68 \pm 8,12$. Na análise estatística, não houve diferença estatística significativa na duração da DW e o olfato ($p = 0,548$), portanto, não interferiu na percepção do odor. O tempo de duração da DW poderia interferir, principalmente, nos pacientes não tratados ou com uso irregular da medicação, devido ao *stress* oxidativo ocasionado pela toxicidade do cobre e formação de radicais livres (Gromadzka *et al.*, 2014).

Até o momento, o único estudo publicado com série de casos sobre o olfato em pacientes com DW é o de Mueller *et al.* (2006). Estes autores analisaram 24 indivíduos com DW (11 sem manifestação neurológica e 13 com manifestação neurológica), portanto, número significativamente bem menor que o do nosso estudo, em que foram avaliados 61 pacientes (24 sem e 37 com manifestação neurológica) e não havia grupo-controle. Oito dos 24 pacientes avaliados referiram diminuição subjetiva do olfato, mas os autores não mencionaram a que grupo esses indivíduos pertenciam. Na avaliação objetiva da percepção do odor, esses autores realizaram o teste completo de SS-16 e na comparação entre o grupo de pacientes com DW com manifestação neurológica e o grupo de DW sem manifestação neurológica observaram que, no teste de limiar, houve diferença significativa, tendência à significância no teste de discriminação do odor e não houve diferença significativa no teste de identificação do odor entre esses grupos.

No estudo de Muller *et al.* (2006), como já mencionado, não havia um grupo-controle comparativo, bem como não havia avaliação das variáveis: MEEM, grau de escolaridade e uso de tabaco. Esses autores observaram que as variáveis idade, gênero, duração da doença e tratamento medicamentoso não interferiram na percepção do odor, dados compatíveis com os do nosso estudo.

No estudo de Muller *et al.* (2006), foi realizado o teste completo de identificação de odor SS-16 ao passo que, no nosso estudo, foi utilizado apenas o teste de identificação do olfato. Portanto, algumas considerações adicionais são pertinentes quanto à comparação do teste completo com um subteste de identificação, ainda que este tópico não tenha sido abordado na metodologia deste estudo. Jackman *et al.* (2005) analisaram o olfato em doenças, como a DP, e observaram alta especificidade e sensibilidade ao teste completo de SS-16 odor, bem como nos 3 subtestes do SS-16 (limiar, discriminação e identificação), indicando que a avaliação do olfato poderia ser reduzida a apenas um subteste, método utilizado no nosso estudo. A opção pela utilização apenas do subteste de identificação do odor foi também adotada em outros estudos a propósito da avaliação de outras doenças, como tremor essencial, ataxias e PSP (REF).

Lötsch *et al.* (2008) observaram que, na avaliação do odor com os subtestes SS-16 isoladamente em indivíduos saudáveis, a sensibilidade ao teste de identificação pode ser menor de 66%, mas a especificidade é de 92%. Contudo, quando a avaliação do olfato foi realizada com cada par de subtestes, a sensibilidade permaneceu abaixo de 90% (86% para limiar e discriminação, 84% para limiar e identificação, e 78% para discriminação e identificação) e a especificidade diminuiu para 84%. Para esses autores, portanto, a realização de apenas um dos subtestes de identificação de odor SS-16 pode não detectar um discreto déficit de olfato em um indivíduo.

No nosso estudo, na análise da especificidade e sensibilidade do teste de identificação do odor SS-16, foram observados valores baixos de correlação, logo, o teste utilizado para avaliação do olfato em pacientes com DW (com ou sem manifestação) não poderá ser utilizado instrumento de auxílio diagnóstico de DW.

No presente estudo, na análise do olfato com o teste de identificação do odor SS-16, a comparação entre os grupos de pacientes com DW (com e sem manifestação neurológica) e o grupo-controle não foi observado déficit olfatório, mas alguns indivíduos avaliados apresentaram diminuição discreta da percepção do odor.

Muller *et al.* (2006) identificaram 17 pacientes com DW com disfunção do olfato, sendo 5 do grupo de DW sem manifestação neurológica e 12 dos pacientes com manifestação neurológica. Ainda neste estudo, no grupo de pacientes com DW sem manifestação neurológica, foi demonstrado melhor desempenho na avaliação do olfato e número menor de indivíduos com disfunção olfatória que o grupo de pacientes com DW com manifestação neurológica.

Todavia, em nosso estudo, alguns pacientes com DW, tanto com a forma hepática (1 caso) como com a forma neurológica (4 casos), apresentaram diminuição do olfato. Em relação à disfunção olfatória evidenciada nestes pacientes, na hipótese destas alterações estarem relacionadas à doença, algumas considerações são pertinentes.

Na DW, a disfunção da enzima ATP7B ocasiona acúmulo de cobre e produção de radicais livres no SNC desencadeando processos de neurodegeneração em estruturas envolvidas no olfato (Bandmann *et al.*, 2015).

A lesão oxidativa no DNA no SNC ocorre com acúmulo menor de cobre que a quantidade necessária para danificar o DNA no fígado (Hayashi *et al.*, 2006). A maior susceptibilidade de determinadas regiões do cérebro ao dano oxidativo pode, também, ser decorrente da menor capacidade de resposta da metalotioneína neuronal ao excesso de cobre e a mecanismos oxidantes de defesa menos eficazes (Brewer, 2001).

Além disso, a ATP7B é expressada no bulbo olfatório, no cerebelo, no *striatum*, na substância negra e no córtex anterior do cíngulo (Davies *et al.*, 2013). A deficiência desta proteína nessas estruturas envolvidas no olfato poderia ocasionar a disfunção do olfato nos pacientes com DW.

O depósito de cobre e a presença de cuproproteínas podem desencadear o acúmulo de inclusões da proteína tau no NOA, na amígdala e no córtex cerebral (Wilson *et al.*, 2011). O acúmulo maior da proteína tau no NOA, como ocorre na DP, AD e DCL, pode favorecer um déficit olfatório mais grave, contudo, nas patologias em que a presença da proteína tau é mínima ou ausente, como na PSP e degeneração corticobasal, a deficiência do olfato é discreta (Hüttenbrink *et al.*, 2013). No presente estudo, o déficit do olfato observado nos pacientes com DW foi discreto, sugerindo, provavelmente, que

o acúmulo de cobre ocasione um déficit olfatório semelhante a patologias neurodegenerativas como PSP.

Outras estruturas do SNC relacionadas ao olfato podem estar comprometidas na DW e ocasionar o déficit olfatório. Fonoff *et al.*, 2010, descreveram o caso clínico de paciente com DP que, após a implantação de marca-passo cerebral no núcleo subtalâmico, apresentou melhora na percepção do olfato e, na análise com PET, evidenciaram a ativação do complexo amigdalóide, hipocampo, córtex orbitofrontal, *striatum*, tálamo (núcleo *oralis ventralis* anterior e posterior, *nucleus parataenialis*), tronco encefálico, cerebelo, *nucleus accumbens* e giro reto esquerdo. Estas regiões relacionadas poderiam estar comprometidas também na DW e ocasionar o déficit olfatório.

O depósito de cobre no *striatum* e no tronco encefálico pode comprometer o olfato, bem como, lesões no tálamo poderiam interromper a habilidade na identificação de odores e a atenção seletiva a esses nos pacientes com DW (Law & Smith, 2012).

Mueller *et al.* (2006) propuseram que o depósito de cobre nos gânglios da base e a perda neuronal seja o substrato patológico para a disfunção sensorial.

Na DW, há depósito de cobre na substância cinzenta cortical e substância branca, além de alterações nos lobos frontal e parietal, e discreta atrofia de córtex cerebral (Bai *et al.*, 2014). Essas alterações no córtex cerebral poderiam contribuir para uma disfunção olfatória discreta comparada com a disfunção do olfato na DP em que se observa atrofia da substância cinzenta do córtex piriforme, córtex orbitofrontal e amígdala, além de maior densidade de corpos de Lewy no núcleo olfatório anterior e amígdala (Broski *et al.*, 2014), portanto, um acometimento mais importante de estruturas olfatórias na DP e, consequentemente, uma disfunção olfatória mais grave.

Outra estrutura envolvida no sistema olfatório é o cerebelo que, por meio da ativação odor-induzida, participa de um mecanismo de retroalimentação, monitorizando a entrada sensorial (concentração de odores) e regulando a saída motora, ou seja, a intensidade para cheirar e farejar (Moscovich *et al.*,

2011). Nos pacientes com DW, o depósito de cobre no cerebelo poderia contribuir para o déficit olfatório.

As células micrógliais (células gliais de origem mesodérmica e efetoras primárias da resposta imune inata) existem em estado de repouso, contudo, quando ocorre uma lesão como trauma, isquemia ou exposição xenobiótica, elas são ativadas e proliferam. A micróglia ativada expressa genes relacionados à inflamação e liberam substâncias como citocinas moléculas de adesão e radicais livres envolvidos na eliminação de patógenos (Lehnardt, 2010).

Lalancette-Hebert *et al.*(2009) evidenciaram que lesão isquêmica no cérebro pode ativar a micróglia não somente no local do insulto isquêmico, mas, também, no bulbo olfatório. A ativação microglial bulbar pode ocorrer várias horas antes da ativação microglial do local do insulto isquêmico e persistir por meses. Essas observações evidenciadas neste estudo fizeram com que os autores propusessem que a micróglia do bulbo olfatório fosse um sensor de inflamação no cérebro. Na DW, o processo neurodegenerativo poderia favorecer a ativação da micróglia no bulbo olfatório e contribuir para a disfunção olfatória.

O epitélio olfatório possui um sistema imune que pode influenciar no olfato. Perricone *et al.* (2013) observaram, em doenças autoimunes com acometimento neurológico e depressão, a presença de anticorpos em neurônios do hipocampo, córtex cingulado e córtex piriforme, amígdala e regiões do sistema límbico, ou seja, em estruturas relacionadas ao sistema olfatório.

Interações imunológicas no SNC poderiam desencadear processos inflamatórios com o aumento dos níveis de citocinas e contribuir na patogênese de doenças neurodegenerativas, como DP e AD (Williams *et al.*, 2014), e ocasionar a disfunção olfatória. Provavelmente o acúmulo de substâncias tóxicas, a ativação de complemento e autoanticorpos, a perda do equilíbrio entre apoptose e regeneração neuronal seriam consequências da desregulação do sistema imune e poderiam ocasionar a disfunção olfatória (Proft *et al.*, 2014).

O depósito de cobre no fígado nos pacientes com DW leva a alterações metabólicas, acúmulo de metais, acúmulo de substâncias neurotóxicas (amônia e manganês) e alterações de neurotransmissores no SNC, que podem contribuir para o surgimento da disfunção olfatória.

Nos pacientes com DW, a elevação da concentração de amônia em nível cerebral aumenta a síntese de glutamato, que, por sua vez, é transformado em glutamina nos astrócitos. O excesso de glutamina é liberado no espaço extracelular e retransformado em glutamato nos neurônios. A glutamina é considerada o produto final de depuração no cérebro para substâncias tóxicas. Na vigência de excesso de amônia, ocorre aumento da síntese e liberação de glutamato no espaço extracelular, que é tóxico para os neurônios (Ferenci *et al.*, 2015).

A amônia reduz a ação da glutamato descarboxilase, enzima que sintetiza o GABA, há aumento da expressão dos receptores GABA, que, por sua vez, aumenta o tônus GABAérgico, desencadeando inibição neuronal. Esse mecanismo pode explicar como a amônia altera a neurotransmissão inibitória GABAérgica e interferir nas células granulares no bulbo olfatório, inibindo a função olfatória (Butterworth, 2015).

Anderson *et al.*, 2008, observaram que o depósito de manganês no *striatum* também pode ocasionar o aumento dos níveis do neurotransmissor GABA.

A alteração na homeostase de metais, como o cobre, ferro e manganês, pode levar à neurodegeneração por meio de vários mecanismos, como o *stress* oxidativo induzido pela formação de radicais livre, processo inflamatório que ocasiona a ativação de células da microglia, diminuição da produção de metaloproteína, formação e agregação de α -sinucleína (Dusek *et al.*, 2015).

Kobtan *et al.* (2015) notaram que o manganês está em excesso nos pacientes com hepatopatia. Em portadores de DW forma hepática, Zimny *et al.* (2013) observaram, em estudos com RM de encéfalo, a presença de hiperintensidade em T1 no globo pálido, sugerindo acúmulo de manganês.

A disfunção do olfato em portadores de hepatopatia aguda e crônica pode ocorrer por deficiência de nutrientes que participam da manutenção de estruturas envolvidas com o olfato (Lee *et al.*, 2013). O sistema olfatório

periférico pode ter o seu processo de regeneração e reparação comprometido na vigência da deficiência de vitamina A (Reden *et al.*, 2012) e ocasionar a disfunção olfatória.

Como perspectiva, estudos futuros poderão ser importantes na análise do olfato nos pacientes com DW, talvez para melhor compreensão da circuitária olfatória ou, até mesmo, no diagnóstico precoce ou diferencial.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Da análise dos resultados do teste de identificação do odor em pacientes com DW, pôde-se concluir que:

- 1)** não se constatou diferença significativa entre o grupo de pacientes com DW e o grupo-controle;
- 2)** não se observou diferença significativa entre os subgrupos de portadores de DW, ou seja, sem ou com manifestação neurológica;
- 3)** a idade, o gênero, o tabaco, o tempo de duração da DW e o tratamento medicamentoso não interferiram na percepção do olfato;
- 4)** o MEEM, o grau de escolaridade e o escore neurológico interferiram na percepção do olfato no teste de identificação do SS-16.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO A - Miniexame do estado mental

MINI-EXAME DO ESTADO MENTAL (Folstein, Folstein & McHugh, 1.975)	
Paciente:	_____
Data da Avaliação: ____/____/____	Avaliador: _____
ORIENTAÇÃO	
• Dia da semana (1 ponto)	()
• Dia do mês (1 ponto)	()
• Mês (1 ponto)	()
• Ano (1 ponto)	()
• Hora aproximada (1 ponto)	()
• Local específico (apartamento ou setor) (1 ponto)	()
• Instituição (residência, hospital, clínica) (1 ponto)	()
• Bairro ou rua próxima (1 ponto)	()
• Cidade (1 ponto)	()
• Estado (1 ponto)	()
MEMÓRIA IMEDIATA	
• Fale 3 palavras não relacionadas. Posteriormente pergunte ao paciente pelas 3 palavras. Dê 1 ponto para cada resposta correta	()
Depois repita as palavras e certifique-se de que o paciente as aprendeu, pois mais adiante você irá perguntá-las novamente.	
ATENÇÃO E CÁLCULO	
• (100 - 7) sucessivos, 5 vezes sucessivamente (1 ponto para cada cálculo correto)	()
(alternativamente, soletrar MUNDO de trás para frente)	
EVOCAÇÃO	
• Pergunte pelas 3 palavras ditas anteriormente (1 ponto por palavra)	()
LINGUAGEM	
• Nomear um relógio e uma caneta (2 pontos)	()
• Repetir "nem aqui, nem ali, nem lá" (1 ponto)	()
• Comando: "pegue este papel com a mão direita dobre ao meio e coloque no chão (3 pts)	()
• Ler e obedecer: "feche os olhos" (1 ponto)	()
• Escrever uma frase (1 ponto)	()
• Copiar um desenho (1 ponto)	()
ESCORE: (____/30)

8.2 ANEXO B - Ficha de anamnese da percepção olfatória**ANAMNESE DA PERCEPÇÃO DO OLFATO**

Nome: _____

Idade: _____ Gênero: _____ Escolaridade: _____ MEEM _____

Percebe cheiro/ odor () sim () não: Há quanto tempo? _____

Tabagista: () não () sim

Há quanto tempo fuma? _____ Quantos cigarros/dia? _____

Ex-tabagista () não () sim

Há quanto tempo parou de fumar? _____

Quanto fumava por dia? _____

Tem outras doenças além da DW? () não () sim, qual (is)? _____

Toma alguma medicação? () não () sim, qual (is)? _____

Você ou alguém da família tem alguma doença psiquiátrica ou/ e neurológica?

() não () sim Qual? _____

8.3 - ANEXO C - Alternativas de respostas para cada odor

Anexo 4 – Folha com alternativas de respostas do SS-16 (1-4): página 1.

1

• LARANJA	• MORANGO
• AMORA	• ABACAXI

2

• FUMAÇA	• COURO
• COLA	• GRAMA

3

• MEL	• CHOCOLATE
• BAUNILHA	• CANELA

4

• CEBOLINHA	• PINHO-SOL
• MENTA	• CEBOLA

FOLHA COM ALTERNATIVAS DE RESPOSTAS DO SS-16 (5-8): PÁGINA 2.

5

- COCO
- NOZES
- BANANA
- CEREJA

6

- PESSEGO
- LIMÃO GALEGO
- MAÇÃ
- LARANJA LIMA

7

- ALÇAÇUZ
- MENTA
- CEREJA
- BOLACHA

8

- MOSTARDA
 - BALA HALLS
 - BORRACHA
 - SOLVENTE DE TINTA
-

FOLHA COM AS ALTERNATIVAS DE RESPOSTAS DO ss-16 (9-12): PÁGINA 3.

9

• CEBOLA

• ALHO

• REPOLHO

• CENOURA

10

• CIGARRO

• VINHO

• CAFÉ

• FUMAÇA

11

• MELÃO

• LARANJA

• PESSEGO

• MAÇA

12

• CRAVO

• CANELA

FOLHA COM AS ALTERNATIVAS DE RESPOSTAS DO SS-16 (13-16): PÁGINA 4.

13

• PERA

• PESSEGO

• AMEIXA

• ABACAXI

14

• CAMOMILA

• ROSA

• FRAMBOESA

• CEREJA

15

• ANIZ

• MEL

• PINGA

• PINHO-SOL

16

• PÃO

• QUEIJO

• PEIXE

• PRESUNTO

8.4 - ANEXO D - Aprovação do projeto pela Comissão de Ética do HCFMUSP

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25/03/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1070/08**, intitulado: "**Doença de Wilson: aspectos clínicos das manifestações neurológicas, da fala e do olfato**" apresentado pelo Departamento de **NEUROLOGIA**, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Egberto Reis Barbosa**

Pesquisadores Executantes: **Alexandre Aluizio da Costa Machado**

Margarete de Jesus Carvalho

Alice Estevo Dias

CAPPesq, 25 de Março de 2009

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

tms

8.5 - ANEXO E - Termo de consentimento livre e esclarecido

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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 :

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Egberto Reis Barbosa (Orientador).

PESQUISADORES: Alexandre Machado¹, Alice Estevo Dias², Margarete de Jesus Carvalho

CARGO/FUNÇÃO¹: Médico INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRM

CARGO/FUNÇÃO²: Fonoaudióloga INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRFa. 9014

CARGO/FUNÇÃO³: Médica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRM: 68952-SP

UNIDADE DO HCFMUSP: Ambulatório de Distúrbios do Movimento do Departamento de Neurologia.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	X	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO ☐		RISCO MAIOR	☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 4 anos.

1 – Desenho do estudo e objetivos:

As informações abaixo estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo. A doença de Wilson é uma doença rara, difícil de ser descoberta, e os sintomas das pessoas são muito variáveis. É importante que o médico conheça os sintomas desta moléstia para sempre suspeitar dela quando ver um paciente com sintomas da doença. Quanto antes for descoberta a doença mais fácil é o tratamento e menor são as chances de sequelas. O objetivo deste estudo é conhecer melhor os sintomas da doença, especialmente os da fala e do olfato, para não deixar de investigar com exames complementares pessoas que possam ter doença de Wilson e assim fazer um diagnóstico rápido. O estudo ajudará também no melhor entendimento da doença contribuindo para aperfeiçoar o tratamento dos pacientes.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros:

Você será examinado no mesmo dia por dois médicos neurologistas e uma fonoaudióloga aqui mesmo no hospital. Usaremos as informações que colhemos dos

pacientes e o exame físico para descrever o quadro neurológico de cada um. O exame físico será realizado pelo médico e consiste em testes simples para avaliar as funções neurológicas e não implicam em usar aparelho algum ou tomar medicações. Não modificaremos as formas de atendimento e decisão das condutas a serem tomadas. Depois desse exame médico, uma fonoaudióloga verificará se você usa a fala para se comunicar e analisará como você fala, para isso você irá gravar uma pequena amostra da sua voz em um microcomputador. Isso acontecerá de modo muito rápido, mais ou menos 5 segundos e também será fácil de fazer, sem nenhum desconforto. Quando esses exames terminarem, uma outra médica irá avaliar o seu olfato....

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço; exames radiológicos: Não se aplica a este estudo.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3

Esses exames são feitos há muito tempo e não oferecem nenhum risco para a sua saúde geral.

5 – Benefícios para o participante:

Faremos uma revisão da evolução da sua doença, o que poderá contribuir no acompanhamento e decisão do seu tratamento. Pensando nas outras pessoas que também têm essa doença, a sua participação será muito importante para o conhecimento da doença, podendo beneficiar as formas de diagnóstico e tratamento da moléstia para os novos casos que forem diagnosticados. No caso de concordar em participar desta pesquisa, será informado com detalhes sobre o seu estado geral de saúde, da fala e do olfato, será também orientado sobre como vencer as dificuldades e, se for preciso, encaminhado para tratamento específico.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar:

Não existem.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Egberto Reis Barbosa, que pode ser encontrado no endereço: Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar nº 255, 5º andar – telefone 3069-6000. Se você 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 – 5º andar – tel.: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 –
E-mail: cappesq@hcnet.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

O paciente tem direito de não querer participar do estudo podendo fazer isto a qualquer momento não havendo prejuízo do seu acompanhamento médico.

09 – Direito de confidencialidade:

A identificação dos pacientes no estudo será feita por abreviaturas. Não haverá qualquer informação que revele a identidade da pessoa. Tem também nossa garantia de que os resultados são sigilosos e serão somente utilizados com finalidades bem aceitas pelas normas de ética científica mundiais.

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:

Você não terá nenhuma despesa para participar deste estudo. Ou seja, você não irá pagar nada em qualquer fase do estudo, incluindo todos os exames e consultas. Você também não receberá nenhuma compensação financeira relacionada à sua participação.

12 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Sendo uma pesquisa baseada em avaliação clínica, não existem riscos inerentes ao procedimento. Qualquer prejuízo causado ao atendimento do paciente deverá ser indenizado. A equipe do ambulatório está a disposição para qualquer intercorrência.

13 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "....." Eu discuti com o Dr. Egberto Reis Barbosa 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.

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

- Aggarwal A, Bhatt M. Update on Wilson disease. *Int Rev Neurobiol*. 2013;110:313–48.
- Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, Schilsky ML. Wilson's disease. *Lancet*. 2007;3:397-408.
- Almashhrawi AA, Ahmed KT, Rahman RN, Hammoud GM, Ibdah JA. Liver diseases in pregnancy: diseases not unique to pregnancy. *World J Gastroenterol*. 2013;19:7630-8.
- Anderson JG, Fordahl SC, Cooney PT, Weaver TL, Colyer CL, Erikson KM. Manganese exposure alters extracellular GABA, GABA receptor and transporter protein and mRNA levels in the developing rat brain. *Neurotoxicology*. 2008; 29:1044–53.
- Attems J, Walker L, Jellinger KA. Olfaction and aging: a mini-review. *Gerontology*. 2015;61:1-6.
- Attems J, Walker L, Jellinger KA. Olfactory bulb involvement in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol*. 2014;127:459-75.
- Bai X, Wang G, Wu L, Wu L, Liu Y, Cui L, *et al*. Deep-gray nuclei susceptibility-weighted imaging filtered phase shift in patients with Wilson's disease. *Pediatr Res*. 2014;75:436-42.
- Bandmann O, Weiss KH, Kaler SG. Wilson's disease and other neurological copper disorders. *Lancet Neurol*. 2015;14:103-13.
- Barbosa ER, Machado AA, Cançado EL, Cançado EL, Deguti MM, Scaff M. Wilson's disease: a case report and a historical review. *Arq Neuropsiquiatr*. 2009;67:539-43.
- Barbosa ER, Machado AAC. Doença de Wilson. In Melo-Souza SE. *Tratamento das Doenças Neurológicas*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan; 2013. p. 928-30.
- Barbosa ER, Scaff M, Canelas HM. Hepatolenticular degeneration: evaluation of neurological course in 76 treated cases. *Arq Neuropsiquiatr*. 1990;49:399-404.
- Baresi M, Ciurleo R, Giacoppo S, Foti Cuzzola V, Celi D, Bramanti P, Marino S. Evaluation of olfactory dysfunction in neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci*. 2012;323:16–24.

Bearn AG, Kunkel HG. Abnormalities of copper metabolism in Wilson's disease and their relationship to the aminoaciduria. *J Clin Invest.* 1954;33:400-9.

Bearn, AG. Genetic and biochemical aspects of Wilson's disease. *Am J Med.* 1953;15:442-9.

Bem RS, Raskin S, Muzzillo DA, Deguti MM, Cançado EL, Araújo TF, *et al.* Wilson's disease in Southern Brazil: genotype-phenotype correlation and description of two novel mutations in ATP7B gene. *Arq Neuropsiquiatr.* 2013;71:503-7.

Bengtsson S, Berglund H, Gulyas B, Cohen E, Savic I. Brain activation during odor perception in males and females. *Neuroreport.* 2001;12:2027–33.

Bennett J, Hahn SH. Clinical molecular diagnosis of Wilson's disease. *Semin Liver Dis.* 2011;31:233-8.

Brewer GJ, Askari F, Dick RB, Sitterly J, Fink JK, Carlson M, *et al.* Treatment of Wilson's disease with tetrathiomolybdate: V. Control of free copper by tetrathiomolybdate and a comparison with trientine. *Transl Res.* 2009;154:70–7.

Brewer GJ, Fink JK, Hedera P. Diagnosis and treatment of Wilson's disease. *Semin Neurol.* 1999;19:261-70. Review.

Broski SM, Hunt CH, Johnson GB, Morreale RF, Lowe VJ, Peller PJ. Structural and functional imaging in parkinsonian syndromes. *Radiographics.* 2014;34:1273-92.

Brucki SM, Nitrini R, Caramelli P, Bertolucci PH, Okamoto IH. Suggestions for utilization of the mini-mental state examination in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* 2003;61:777–81.

Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet.* 1993;5:327-37.

Butterworth RF. Pathogenesis of hepatic encephalopathy and brain edema in acute liver failure. *J Clin Exp Hepatol.* 2015;5(Suppl 1):S96-S103.

Cartwright GE, Hodges RE, Gubler CJ, Mahoney JP, Daum K, Wintrobe MM, *et al.* Studies on copper metabolism. XIII. Hepatolenticular degeneration. *J Clin Invest.* 1954;33:1487-501.

Chen C, Shen B, Xiao JJ, Wu R, Duff Canning SJ, Wang XP. Currently Clinical Views on Genetics of Wilson's Disease. *Chin Med J.* 2015;128:1826-30.

Choudhary N, Joshi L, Duggal A, Puri V, Khwaja GA. Isolated lingual involvement in Wilson's disease *J Neurosci Rural Pract.* 2015;6:431-3.

Coffey AJ, Durkie M, Hague S, McLay K, Emmerson J, Lo C, *et al.* A genetic study of Wilson's disease in the United Kingdom. *Brain.* 2013;136:1476–87.

Czlonkowska A, Rodo M, Gromadzka G. Late onset Wilson's disease: therapeutic implications. *Mov Disord.* 2008;23:896-8.

Czlonkowska A, Tarnacka B, Litwin T, Gajda J, Rodo M. Wilson's disease - cause of mortality in 164 patients during 1992–2003 observation period. *J Neurol.* 2005;252:698–703.

da Costa MD, Spitz M, Bacheschi LA, Leite CC, Lucato LT, Barbosa ER. Wilson's disease: two treatment modalities. Correlations to pretreatment and posttreatment brain MRI. *Neuroradiology.* 2009;51:627-33.

Dalvi A. Wilson's disease: neurological and psychiatric manifestations. *Dis Mon.* 2014;60:460-4.

Das SK, Ray K. Wilson's disease: an update. *Nat Clin Pract Neurol.* 2006;2:482-93.

Davies KM, Hare DJ, Cottam V, Chen N, Hilgers L, Halliday G, *et al.* Localization of copper and copper transporters in the human brain. *Metallomics.* 2013;5:43–51.

Deguti, MM, Genschel J, Cancado EL, , Barbosa ER, Bochow B, Mucenic M, *et al.* Wilson disease: novel mutations in the ATP7B gene and clinical correlation in Brazilian patients. *Hum Mutat.* 2004;23:398.

Devanand DP, Lee S, Manly J. Olfactory deficits predict cognitive decline and Alzheimer dementia in an urban community. *Neurology.* 2015;84:182-9.

Doty RL. Clinical Studies of Olfaction. *Chem. Senses.* 2005;30(suppl1):i207-i209.

Doty RL. Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. *Neurobiol Dis.* 2012;46:527-52.

Dusek P, Litwin T, Czlonkowska A. Wilson disease and other neurodegenerations with metal accumulations. *Neurol Clin.* 2015;33:175-204.

Eckmeier D, Shea SD. Noradrenergic plasticity of olfactory sensory neuron inputs to the main olfactory bulb. *J Neurosci.* 2014;34:15234-43.

Ekberg JA, St John JA. Crucial roles for olfactory ensheathing cells and olfactory mucosal cells in the repair of damaged neural tracts. *Anat Rec (Hoboken).* 2014;297:121-8.

European Association for the Study of Liver (EASL) Clinical Practice Guidelines: Wilson's Disease. *J Hepatol.* 2012.

Fanni D, Fanos V, Gerosa C, Piras M, Dessi A, Atzei A, *et al.* Effects of iron and copper overload on the human liver: an ultrastructural study. *Curr Med Chem.* 2014;21:3768-74.

Ferenci P, Czlonkowska A, Stremmel W, *et al.* EASL clinical practice guidelines: Wilson's disease. *J Hepatol.* 2012;56:671–85.

Ferenci P, Czlonkowska A, Stremmel W, Houwen R, Rosenberg W, Schilsky M, *et al.* Encephalopathy in Wilson disease: copper toxicity or liver failure ? *J Clin Exp Hepatol.* 2015;5(Suppl 1):S88-95.

Ferenci P. Pathophysiology and clinical features of Wilson's disease. *Metab Brain Dis.* 2004;19:229-39.

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. Mini-Mental State: a practical method for grading the cognitive state of patients for clinician. *J Psychiatr Res.* 1975;12:189-98.

Fonoff ET, de Oliveira YS, Driollet S, Garrido GJ, de Andrade DC, Sallem F, *et al.* Pet findings in reversible improvement of olfactory dysfunction after STN stimulation in a Parkinson's disease patient. *Mov Disord.* 2010;25:2466-8.

Forbes N, Goodwin S, Woodward K, Morgan DG, Brady L, Coulthart MB, *et al.* Evidence for synergistic effects of PRNP and ATP7B mutations in severe neuropsychiatric deterioration. *BMC Med Genet.* 2014;20:15-22.

Fornazieri MA, dos Santos CA, Bezerra TF, Pinna Fde R, Voegels RL, Doty RL. Development of normative data for the Brazilian adaptation of the University of Pennsylvania Smell Identification Test. *Chem Senses.* 2015;40:141-9.

Frota NA, Barbosa ER, Porto CSA, Lucato LT, Ono CR, Buchpiguel CA, *et al.* Cognitive impairment and magnetic resonance imaging correlations in Wilson's disease. *Acta Neurol Scand.* 2013;127:391-8.

Garcia-Falgueras A, Junque C, Gimenez M, Caldú X, Segovia S, Guillamon A. Sex differences in the human olfactory system. *Brain Res.* 2006;1116:103–11.

Garcia-Gonzalez D, Murcia-Belmonte V, Clemente D, De Castro F. Olfactory system and demyelination. *Anat Rec (Hoboken).* 2013;296:1424-34.

Garmizo G, Frauens BJ. Corneal copper deposition secondary to oral contraceptives. *Optom Vis Sci.* 2008;85:E802-7.

Godoy MDCL, Voegels RL, Pinna FR, Imamura R, Farfel JM. *Olfaction in Neurologic and Neurodegenerative Diseases: A Literature Review* Int Arch Otorhinolaryngol. 2015;19:176-9.

Gowers WR. Tetanoid chorea. In: *A manual of diseases of the nervous system.* Vol II. J. & A. Churchill, London; 1888. pp 656.

Gromadzka G, Karpińska A, Przybyłkowski A, Litwin T, Wierchowska-Ciok A, Dzieżyc K, *et al.* Treatment with D-penicillamine or zinc sulphate affects copper metabolism and improves but not normalizes antioxidant capacity parameters in Wilson disease. *Biometals.* 2014;27:207-15.

Hagmeyer S, Haderspeck JC, Grabrucker AM. Behavioral impairments in animal models for zinc deficiency. *Front Behav Neurosci*. 2015;8:443.

Han Y, Zhang F, Tian Y, Hu P, Li B, Wang K. Selective impairment of attentional networks of alerting in Wilson's disease. *PLoS One*. 2014 Jun 20;9(6):e100454.

Hawkes CH. Olfaction in neurodegenerative disorder. *Mov Disord*. 2003;18:364-372.

Hayashi M, Fuse S, Endoh D, Horiguchi N, Nakayama K, Kon Y, et al. Accumulation of copper induces DNA strand breaks in brain cells of Long-Evans Cinnamon (LEC) rats, an animal model for human Wilson Disease. *Exp Anim*. 2006;55:419-26.

Hogarth P. Neurodegeneration with brain iron accumulation: diagnosis and management. *J Mov Disord*. 2015;8:1-13.

Holmberg CG, Laurell CB. Oxidase reactions in human plasma caused by coeruloplasmin. *Scand J Clin Lab Invest*. 1951;3:103-7.

Hordyjewska A, Popiolek L, Kocot J. The many "faces" of copper in medicine and treatment. *Biometals*. 2014;27:611-21.

Hummel T, Fließbach K, Abele M, Okulla T, Reden J, Reichmann H et al. Olfactory FMRI in patients with Parkinson's disease. *Front Integr Neurosci*. 2010;4:125. Hüttenbrink KB, Hummel T, Berg D, Gasser T, Hähner A. Olfactory dysfunction: common in later life and early warning of neurodegenerative disease. *Dtsch Arztebl Int*. 2013;110:1-7.

Hummel T, Kobal G, Gudziol H, Mackay-Sim A. Normative data for the "Sniffin' Sticks" including tests of odor identification, odor discrimination, and olfactory thresholds: an upgrade based on a group of more than 3,000 subjects. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2007;264:237-43.

Hummel T, Sekinger B, Wolf SR, Pauli E, Kobal G. 'Sniffin sticks': olfactory performance assessed by the combined testing of odor identification, odor discrimination and olfactory threshold. *Chem Senses*. 1997;22:39-52.

Hüttenbrink KB, Hummel T, Berg D, Gasser T, Hähner A. Olfactory dysfunction: common in later life and early warning of neurodegenerative disease. *Dtsch Arztebl Int*. 2013;110:1-7.

Jackman AH, Doty RL. Utility of a three-item smell identification test in detecting olfactory dysfunction. *Laryngoscope*. 2005;115:2209-12.

Kaler SG. Inborn errors of copper metabolism. *Handb Clin Neurol*. 2013;113:1745-54.

Kaneko N, Okano H, Sawamoto K. Role of the cholinergic system in regulating survival of newborn neurons in the adult mouse dentate gyrus and olfactory bulb. *Genes Cells*. 2006;11:1145–59.

Kobal G, Klimek L, Wolfensberger M, Gudziol H, Temmel A, Owen CM, *et al*. Multicenter investigation of 1,036 subjects using a standardized method for the assessment of olfactory function combining tests of odor identification, odor discrimination, and olfactory thresholds. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2000;257:205–11.

Kobtan AA, El-Kalla FS, Soliman HH, Zakaria SS, Goda MA. Higher grades and repeated recurrence of hepatic encephalopathy may be related to high serum manganese levels. *Biol Trace Elem Res*. 2015 Jul 2.

Lalancette-Hebert M, Phaneuf D, Soucy G, Weng YC, Kriz J. Live imaging of Toll-like receptor 2 response in cerebral ischaemia reveals a role of olfactory bulb microglia as modulators of inflammation. *Brain*. 2009;132:940–54.

Law LM, Smith DM. The anterior thalamus is critical for overcoming interference in a context-dependent odor discrimination task. *Behav Neurosci*. 2012;126:710-9.

Lee KH, Yun SJ, Nam KN, Gho YS, Lee EH. Activation of microglial cells by ceruloplasmin. *Brain Res*. 2007;1171:1-8.

Lee WH, Wee JH, Kim DK, Rhee CS, Lee CH, Ahn S, *et al*. Prevalence of subjective olfactory dysfunction and its risk factors: korean national health and nutrition examination survey. *PLoS One*. 2013.

Lehnardt S. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia*. 2010;58:253–63.

Liggi M, Mais C, Demurtas M, Sorbello O, Demelia E, Civolani A, *et al*. Uneven distribution of hepatic copper concentration and diagnostic value of double-sample biopsy in Wilson's disease. *Scand J Gastroenterol*. 2013;48:1452-8.

Limongi JC. REM sleep behavior disorder, neurodegeneration and Wilson's disease. *Arq Neuropsiquiatr*. 2014;72:649-50.

Lötsch J, Reichmann H, Hummel T. Different odor tests contribute differently to the evaluation of olfactory loss. *Chem Senses*. 2008 Jan;33: 17-21.

Loudianos G, Lepori MB, Mameli E, Dessì V, Zappu A. Wilson's disease. *Prilozi*. 2014;35:93-8.

Mak CM, Tam S, Fan ST, Liu CL, Lam CW. Wilson's disease: a patient undiagnosed for 18 years. *Hong Kong Med J*. 2006;12:154-8.

Mandelbrote BM, Stanier MW, Thompson RHS. Studies on copper metabolism in demyelinating diseases of the central nervous system. *Brain*. 1948;71:212-28.

Martins da Costa C, Baldwin D, Portmann B, Lolin Y, Mowat AP, Mieli-Vergani G. Value of urinary copper excretion after penicillamine challenge in the diagnosis of Wilson's disease. *Hepatology*. 1992;15:609–15.

Mazumder MW, Karim MB, Rukunuzzaman M. Penicillamine challenge test in the diagnosis of Wilson's disease. *Mymensingh Med J*. 2014;23:489-95.

Meshulam RI, Moberg PJ, Mahr RN, Doty RL. Olfaction in neurodegenerative disease: a meta-analysis of olfactory functioning in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Arch. Neurol*. 1998;55:84-90.

Moscovich M, Munhoz RP, Teive HA, Raskin S, Carvalho Mde J, Barbosa ER, *et al*. Olfactory impairment in familial ataxias. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012;83:970-4.

Mueller A, Reuner U, Landis B, Kitzler H, Reichmann H, Hummel T. Extrapyramidal Symptoms in Wilson' disease are associated with olfactory dysfunction. *Mov disord*. 2006;21:1311-6.

Mullol J, Alobid I, Mariño-Sánchez F, Quintó L, de Haro J, Bernal-Sprekelsen M, *et al*. Furthering the understanding of olfaction, prevalence of loss of smell and risk factors: a population-based survey (OLFACAT study). *BMJ Open*. 2012;2(6).

Nicastro E, Ranucci G, Vajro P, Vegnente A, Iorio R. Re-evaluation of the diagnostic criteria for Wilson disease in children with mild liver disease. *Hepatology*. 2010;52:1948–56.

Orhan KS, Karabulut B, Keleş N, Değer K. Evaluation of factors concerning the olfaction using the Sniffin' Sticks test. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012;146:240-6.

Pal A. Copper toxicity induced hepatocerebral and neurodegenerative diseases: an urgent need for prognostic biomarkers. *Neurotoxicology*. 2014;40:97-101.

Palheta Neto,FX, Targino, MN; Peixoto, VS, Alcântara FB; Jesus CC; Araújo DC, *et al*. Anormalidades sensoriais: olfato e paladar. *Arquivos Int. Otorrinolaringol*. São Paulo. 2011;15(3).

Parekh JR, Agrawal PR. Wilson's disease: 'face of giant panda' and 'trident' signs together. *Oxf Med Case Reports*. 2014;2014:16-7.

Paschen L, Schmidt N, Wolff S, Cnyrim C, van Eimeren T, Zeuner KE, *et al*. The olfactory bulb volume in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Eur J Neurol*. 2015;22:1068-73.

Patil M, Sheth KA, Krishnamurthy AC, Devarbhavi H. A review and current perspective on Wilson disease. *J Clin Exp Hepatol*. 2013;3:321-36.

Perricone C, Shoenfeld N, Agmon-Levin N, de Carolis C, Perricone R, Shoenfeld Y. Smell and autoimmunity: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013;45:87-96.

Prashanth LK, Sinha S, Taly AB, Vasudev MK. Do MRI features distinguish Wilson's disease from other early onset extrapyramidal disorders? An analysis of 100 cases. *Mov Disord*. 2010;25:672-8.

Proft F, Steinbach S, Dechant C. Gustatory and olfactory function in patients with granulomatosis with polyangiitis (Wegener's). *Scand J Rheumatol*. 2014;43:512-8.

Quadri M, Federico A, Zhao T, Breedveld GJ, Battisti C, Delnooz C, et al. Mutations in SLC30A10 cause parkinsonism and dystonia with hypermanganesemia, polycythemia, and chronic liver disease. *Am J Hum Genet*. 2012;90:467-77.

Raju K, Bangalore GN, Thuruvekere SN, Pathavanalli VN. Wilson's disease: A Clinical autopsy case report with review of literature. *J Nat Sci Biol Med*. 2015;6:248-52.

Ramraj R, Finegold MJ, Karpen SJ. Progressive familial intrahepatic cholestasis type 3: overlapping presentation with Wilson disease. *Clin Pediatr (Phila)*. 2012;51:689-91.

Reden J, Lill K, Zahnert T, Hummel T. Olfactory function in patients with postinfectious and posttraumatic smell disorders before and after treatment with vitamin A: a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Laryngoscope*. 2012;122:1906-9.

Restrepo D, Hellier JL, Salcedo E. Complex metabolically demanding sensory processing in the olfactory system: implications for epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2014;38:37-42.

Roberts EA, Schilsky ML. Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update. *Hepatology*. 2008;47:2089-111.

Rosencrantz R, Schilsky M. Wilson Disease: Pathogenesis and Clinical Considerations in Diagnosis and Treatment. *Semin Liver Dis*. 2011;31:245-5.

Ruiz DV. Wilson's disease and skunks?? The copper connection. *Wilson's Disease Association Newsletter*; 1997.

Sánchez-Albisua I, Garde T, Hierro L, Camarena C, Frauca E, de la Vega A, et al. A high index of suspicion: the key to an early diagnosis of Wilson's disease in childhood. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999;28:186-90.

Scheinberg IH, Gitlin D. Deficiency of ceruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). *Science*. 1952;116:484-5.

Scheinberg IH, Jaffe ME, Sternlieb I. The use of trientine in preventing the effects of interrupting penicillamine therapy in Wilson's disease. *N Engl J Med*. 1987;317:209-13.

Scheinberg IH, Sternlieb I. Diagnosis. In Scheinberg IH, Sternlieb I (eds). Wilson's disease. *Philadelphia, Saunders*. 1984;114-25.

Schilsky ML Acute liver failure and liver assist devices. *Transplant Proc*. 2011;43:879-83.

Schilsky ML, Ala A. Genetic testing for Wilson disease: availability and utility. *Curr Gastroenterol Rep*. 2010;12:57-61.

Schriever VA, Reither N, Gerber J, Iannilli E, Hummel T. Olfactory bulb volume in smokers. *Exp Brain Res*. 2013;225:153-7.

Sharer JD, Leon-Sarmiento FE, Morley JF, Weintraub D, Doty RL. Olfactory dysfunction in Parkinson's disease: Positive effect of cigarette smoking. *Mov Disord*. 2015;30:859-62.

Silveira-Moriyama L, Carvalho Mde J, Katzenschlager R, Petrie A, Ranvaud R, Barbosa ER, *et al*. The use of smell identification tests in the diagnosis of Parkinson's disease in Brazil. *Mov Disord*. 2008;23:2328-34.

Strümpell A. Über die Westphal'sche Pseudosklerose und über diffuse Hirnsklerose, insbesondere bei Kindern. *Dt Z Nervheilk*. 1898;12:116-49.

Suvarna JC. Kayser-Fleischer ring. *J Postgrad Med*. 2008;54:238-40.

Swanson LW. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. (Review). *Brain Res*. 2000;886:113-64.

Taly AB, Meenakshi-Sundaram S, Sinha S, Swamy HS, Arunodaya GR. Wilson disease: description of 282 patients evaluated over 3 decades. *Medicine (Baltimore)*. 2007;86:112-21.

Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, *et al*. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet*. 1993;5:344-50.

Tarnacka B, Rodo M, Cichy S, Członkowska A. Procreation ability in Wilson's disease. *Acta Neurol Scand*. 2000;101:395-8.

Tribl GG, Bor-Seng-Shu E, Trindade MC, Lucato LT, Teixeira MJ, Barbosa ER. Restless Legs Syndrome in neurological WD. *Sleep*. 2014. FALTA completar.

Uzman L, Denny-Brown D. Amino-aciduria in hepato-lenticular degeneration (Wilson's disease). *Am J Med Sci*. 1948;215:599-611.

Vennemann MM, Hummel T, Berger K. The association between smoking and smell and taste impairment in the general population. *J Neurol*. 2008;255:1121-6.

Verma R, Patil TB, Lalla RS. Acute extrapyramidal syndrome and seizures as heralding manifestation of Wilson disease. *Neurol India*. 2012;60:363–4.

Vieira J, Oliveira PV, Juliano Y, Warde KR, Deguti MM, Barbosa ER, *et al*. Urinary copper excretion before and after oral intake of d-penicillamine in parents of patients with Wilson's disease. *Dig Liver Dis*. 2012;44:323-7.

Walshe JM. Serum 'free' copper in Wilson disease *QJM*. 2012;105:419-23.

Walshe JM. Wilson's Disease. In: Vinken PJ *et al* (eds). *Extrapyramidal Disorders*. New York, Elsevier; 1986. p. 223-38.

Walshe JM. Wilson's disease: new oral therapy. *Lancet* 1956;270:25-26.

Weiss KH, Thurik F, Gotthardt DN, Schäfer M, Teufel U, Wiegand F, *et al*. Efficacy and safety of oral chelators in treatment of patients with Wilson disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11:1028–35.

Weitzman E, Pappo O, Weiss P, Frydman M, Haviv-Yadid Y, Ben Ari Z. Late onset fulminant Wilson's disease: a case report and review of the literature. *World J Gastroenterol*. 2014;20:17656-60.

Westphal C. Über eine dem Bilde der cerebrospinalen grauen Degeneration ähnliche Erkrankung des centralen Nervensystems ohne anatomische Befund nebst einigen Bemerkungen über paradoxe Contraction. *Arch Psychiat Nervenkrh*. 1883;14:87-134.

Williams CJ, Dexter DT. Neuroprotective and symptomatic effects of targeting group III mGlu receptors in neurodegenerative disease. *J Neurochem*. 2014;129:4-20.

Wilson DA, Xu W, Sadrian B, Courtiol E, Cohen Y, Barnes DC. Cortical odor processing in health and disease. *Prog Brain Res*. 2014;208:275-305.

Wilson SAK. Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain*. 1912;34:295-509.

Wilson, RS, Yu, L, Schneider, JA, Arnold SE, Buchman AS, Bennett DA. Lewy bodies and olfactory dysfunction in old age. *Chem. Senses*. 2011;36:367–73.

Woimant F, Trocello JM. Disorders of heavy metals. *Handb Clin Neurol*. 2014;120:851-64.

Wolz M, Hähner A, Meixner L, Löhle M, Reichmann H, Hummel T, Storch A. Accurate detection of Parkinson's disease in tremor syndromes using olfactory testing. *Eur Neurol*. 2014;72:1-6.

Yamaguchi Y, Heiny ME, Gitlin JD. Isolation and characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;197:271-7.

Yousem DM, Maldjian JA, Siddiqi F, Hummel T, Alsop DC, Geckle RJ, *et al*. Gender effects on odor-stimulated functional magnetic resonance imaging. *Brain Res*. 1999;818:480–7.

Zimbrea PC, Schilsky ML. Psychiatric aspects of Wilson disease: a review. *Gen Hosp Psychiatry*. 2014;36:53-62.

Zimny A, Zińska L, Bladowska J, Neska-Matuszewska M, Sęsiadek M. Intracranial lesions with high signal intensity on T1-weighted MR images - review of pathologies. *Pol J Radiol*. 2013;78:36-46.

Zucco GM, Amodio P, Gatta A. Olfactory deficits in patients affected by minimal hepatic encephalopathy: a pilot study. *Chem Senses*. 2006;31:273-8.