THIAGO FERREIRA DE ARAÚJO

**Importância da detecção de mutações do gene
ATP7B para o diagnóstico da doença de Wilson**

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luiz Rachid Cançado

São Paulo

2014

THIAGO FERREIRA DE ARAÚJO

**Importância da detecção de mutações do gene
ATP7B para o diagnóstico da doença de Wilson**

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luiz Rachid Cançado

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Araújo, Thiago Ferreira de
Importância da detecção de mutações do gene *ATP7B* para o diagnóstico da
doença de Wilson / Thiago Ferreira de Araújo. -- São Paulo, 2014.

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientador: Eduardo Luiz Rachid Cançado.

Descritores: 1.Doença de Wilson 2.Trifosfato de adenosina/genética
3.Proteínas de transporte de cátions/genética 4.Análise de sequência de DNA
5.Linhagem 6.Hepatite crônica 7.Falência hepática

USP/FM/DBD-077/14

Dedico aos pacientes portadores da doença de Wilson.

Aos meus pais, familiares e avós in memoriam, pelo amor e apoio incondicional, dedico-lhes com muito carinho mais essa conquista.

Agradecimentos

A Deus;

Aos meus pais Célia Maria Ferreira de Araújo e Paulo Felizola de Araújo, e a Irena Ferreira de Araújo (*in memorian*) pelo amor, apoio incondicional, amizade, conselhos, exemplos de pessoas, caráter, honestidade e dedicação;

Aos tios, primos, pelo apoio, amizade e conselhos, especialmente Ricardo Paes Barreto Ferreira, pois sem a sua intervenção nada disso poderia ter ocorrido, muito obrigado. Aos meus avôs Jayme Boanerge Ferreira, Maria de Lima Ferreira (*in memorian*) e Antonio Alves de Araújo e avó Irene Felizola de Araújo (*in memorian*);

Ao Dr. Eduardo Luiz Rachid Cançado pela amizade, apoio, orientação; ajudou-me muito a crescer como aluno e pessoa e por ter acreditado em mim, minha imensurável gratidão;

A Dra. Marta Mitiko Deguti pela oportunidade de vir a São Paulo, pela orientação no começo da jornada, amizade e apoio, minha imensurável gratidão;

Ao Dr. Egberto Reis Barbosa pelo incentivo e ajuda para realização da tese;

A Maria Cristina Nakhle e Clarice Pires Abrantes Lemos por tudo, absolutamente tudo que fizeram por mim, pela amizade, apoio e ajuda para realização da tese e em todos os sentidos da vida, muito, muito obrigado mesmo, tenho uma gratidão impagável a vocês ah, se eu tivesse sorte como tenho preguiça;

Ao grupo de Doenças Autoimune e Metabólicas, Andréia Evangelista da Silva, Débora Raquel Benedita Terrabuio, Fabrício Guimarães, Kátia Oliveira, Michele Harriz pela amizade e apoio;

Ao grupo do Dr. João Renato Rebelo Pinho pelo apoio, amizade e a oportunidade de realizar toda a parte experimental da tese no laboratório, meu muito obrigado, especialmente a Michele Gomes Gouvea pela amizade e apoio em todos os sentidos da vida, Michele, meu muito obrigado;

Ao amigos do Laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo pela amizade e apoio nesse longos anos, em especial a Fátima Valentim pela amizade, apoio e por ensinar os trâmites burocráticos, além dos cafés;

As Sra. Fabiana Bispo, Vilma e Fátima Gomes que colaboraram para o cumprimento das normas e prazos para realização da tese;

Aos amigos Paulo Magalhães de Sousa Filho, José Claudio, Carlos Antonio, Anderson Renato Jatahy da Fonseca, Juliana Goldbaum Crescente, Marcelo Neves, Luana Karen, Karol de Souza Barbosa e Ingrede de Lima Lira pelo apoio e toda amizade que me deram força para continuar em frente em todos os momentos, meu muito obrigado;

A Cristiane da Silva Monte pela amizade, apoio, conselhos, por ter ajudado na correção da tese, meu muito obrigado tsc...tsc;

A todos os médicos, assim como a todos os demais profissionais que atenderam aos pacientes com doença de Wilson nos serviços de Hepatologia, Hepatologia pediátrica, Neurologia e Transplante do fígado do HC-FMUSP;

A CAPES pela bolsa concedida;

A Fundação Faculdade de Medicina pela possibilidade de realizar essa tese juntamente com o emprego de biologista;

Ao rock'n roll e aos litros de café por me ajudarem a manter os neuronios funcionando e a concentração para realização da tese.

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ATP: Adenosina trifosfato

AST: Aspartato aminotransferase

ALT: Alanina aminotransferase

BAL: *British anti-lewisite*

CAPPesq: Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa

Cp: Ceruloplasmina

Cu: Cobre

d: Dia

dL: Decilitro

DPA: d- Penicilamina

Dr: Doutor

DW: Doença de Wilson

EDTA: Ácido etileno diamina tetra acético

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

et al: e outros

FAN: Fator antinuclear

µg: Micrograma

g: Grama

GGT: Gamaglutamil transferase

GSH: Glutathione

h: Hora

Hb: Hemoglobina

HC–FMUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo

hCTR1: *Human copper transporter1*

Ht: Hematócrito

ID: Idade

INR: *International Normalized Ratio*

kg: Quilograma

LSN: Limite superior de normalidade

mg: Miligrama

mm: Milímetros

MT: Metalotioneína

MTHFR: Metilenotetrahidrofolato redutase

TC: Tomografia computadorizada

RNM: Ressonância nuclear magnética

TAP: Tempo de atividade da protrombina

XLSN: Número de vezes acima do limite superior de normalidade

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. Introdução	2
1.1 Aspectos gerais	2
1.2 Histórico	3
1.4. Biologia molecular DW	7
1.4.1. Gene ATP7B	7
1.4.2 Mutações gene ATP7B	8
1.4.3 Mecanismo patogênico na doença de Wilson	11
1.5 Diagnóstico	15
1.5.1 Anéis de Kayser-Fleischer	15
1.5.2 Ceruloplasmina	15
1.5.3 Cobre urinário	16
1.5.4 Quantificação do cobre hepático	17
1.5.6 Estudos de imagem encefálica	18
1.5.7 Teste genético para o gene ATP7B	18
1.5.8. Escore internacional diagnóstico da doença de Wilson	20
1.6 Tratamento	21
1.6.1 Dieta	22
1.6.2 D-Penicilamina	22
1.6.3 Trientina	23
1.6.4 Sais de zinco	23
1.6.5 Tetratiomolibdato de amônia	23
1.6.6 Transplante Hepático	24
2. Justificativa do estudo	26
3. Objetivos	29
4. Casuística e Métodos	31
4.1. Seleção da casuística de pacientes com DW	31
4.1.1. Seleção da casuística de pacientes suspeitos de DW	31
4.2. Critérios de Inclusão	31
4.3. Critérios de Exclusão	32
4.4. Diagnóstico de DW	32
4.5. Dados Demográficos	33

4.6. Genotipagem do gene ATP7B	33
4.6.1. Extração DNA genômico	33
4.6.2. Amplificação das Regiões Codificadoras	34
4.6.3. Sequenciamento direto	34
4. Resultados	38
5.1 Casuística	38
5.2. Dados demográficos	38
5.2.1. Pacientes com DW	38
5.2.2. Pacientes suspeitos de DW	39
5.3 Apresentações clínicas, exames laboratoriais e histopatológicos	40
5.3.1 Apresentação clínica	40
5.3.2 Exames laboratoriais, de imagem e estudo anatomopatológico hepático e genotipagem ATP7B	43
5.3.2.1 Pacientes com Doença de Wilson	43
5.3.2.2 Rastreamento familiar	46
5.3.2.2.1. Casos em que o diagnóstico de DW foi definido pelo sequenciamento no grupo de rastreamento familiar	48
5.3.2.2.2. Caso de exclusão do diagnóstico de DW por sequenciamento no grupo de RF	50
5.3.2.3 Hepatite crônica criptogênica	51
5.3.2.3.1. Caso de diagnóstico de DW por sequenciamento no grupo de hepatite crônica criptogênica	53
5.3.2.3.2. Caso de exclusão do diagnóstico de DW por sequenciamento no grupo de HC	55
5.3.2.4 Insuficiência hepática aguda grave	56
5.3.2.4.1. Caso de diagnóstico de DW por sequenciamento no grupo de IHAG	58
5.3.2.4.2. Caso de não confirmação diagnóstica de DW por sequenciamento no grupo de IHAG	60
5.4. Diversidade genotípica e fenotípica em uma mesma família	63
6. Discussão	70
7. Conclusões	93
8. Anexos	96
9. Referências Bibliográficas	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mutações mais comuns da DW de acordo com a população estudada	9
Tabela 2. Sistema de escore sugerido por Ferenci et al. 2003	21
Tabela 3 – Primers e tamanho dos produtos das PCRs da amplificação da região codificadora do gene ATP7B por PCR convencional	35
Tabela 4: Grupos dos pacientes suspeitos de DW	38
Tabela 5: Dados demográficos dos pacientes suspeitos de DW	39
Tabela 6. Principais órgãos afetados nas primeiras manifestações da doença	41
Tabela 7. Manifestações clínicas e suas respectivas frequências	42
Tabela 8. Mutações e frequências alélicas nos pacientes com DW	45
Tabela 9. Mutações e frequências alélicas dos familiares no rastreamento familiar	48
Tabela 10. Exames iniciais da paciente RF_15	49
Tabela 11. Exames iniciais do paciente RF_01	50
Tabela 12. Mutações e frequências alélicas nos pacientes com hepatite crônica criptogênica	53
Tabela 13. Exames iniciais do paciente HC_11	54
Tabela 14. Exames iniciais do paciente HC_07	55
Tabela 15. Resultados anatomopatológicos dos explantes dos pacientes com IHAG.57	
Tabela 16. Mutações e frequências alélicas nos pacientes com insuficiência hepática aguda grave	58
Tabela 17. Exames iniciais do paciente IHAG_4	59
Tabela 18. Todos os exames do paciente IHAG_3	61
Tabela 19. Exames laboratoriais realizados nos grupos estudados	62
Tabela 20. Parâmetros diagnósticos mais importantes dos grupos estudados	63
Tabela 21. Exames iniciais dos pacientes RF_7* e DW_27	64
Tabela 22. Exames iniciais do paciente RF_18	66
Tabela 23. Exames iniciais do paciente RF_19	68

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da topologia da ATP7B (adaptado de Bie et al. 2007)	6
Figura 2. Fisiologia do transporte de cobre dentro do hepatócito normal e com DW (adaptado de Madsen et al. 2006)	7

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Essa dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado do International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de Apresentação de dissertações e teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Cresiana, 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 o *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Araujo T.F. Importância da detecção de mutações do gene *ATP7B* para o diagnóstico da doença de Wilson [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

RESUMO

O diagnóstico da doença de Wilson (DW) é realizado por exames clínicos, laboratoriais, anatomopatológicos e de imagem. Mais de 500 mutações no gene *ATP7B* foram descritas como causadoras da DW. Para avaliar a importância da detecção de mutações no diagnóstico da DW em nosso meio, analisamos 35 pacientes com DW, 20 familiares de wilsonianos a partir de rastreamento familiar, 18 com hepatite crônica criptogênica e sete com insuficiência hepática aguda grave. Para o diagnóstico da DW foi utilizado o sistema de escore sugerido pela Sociedade Europeia para o Estudo do Fígado de 2012. Os dados demográficos, clínicos, laboratoriais e histológicos foram obtidos retrospectivamente. Obteve-se o DNA genômico de cada paciente a partir de sangue periférico e realizou-se o sequenciamento direto dos 21 éxons e suas bordas intrônicas do gene *ATP7B*. Todos os pacientes com DW apresentavam no mínimo quatro pontos. No grupo de rastreamento familiar o sequenciamento foi importante para o diagnóstico de DW em 14 familiares; no grupo de hepatite crônica criptogênica em oito pacientes e no grupo de insuficiência hepática aguda grave em três pacientes. Foi caracterizada uma família com cinco genótipos diferentes (dois homozigotos p.A1135Qfs/p.A1135Qfs e p.M645R/p.M645R), um heterozigoto composto (p.A1135Qfs/p.M645R) e dois heterozigotos simples (p.A1135Qfs/0 e p.M645R/0) com fenótipos variados. Foram detectadas duas mutações em heterozigose simples em pacientes com insuficiência hepática aguda grave. A mutação p.A1135Qfs e p.L708P foram as mais frequentes em todos os grupos.

Foi identificada pela primeira vez a mutação p.M645R em homozigose. Concluimos que os resultados confirmaram que o sequenciamento do gene *ATP7B* foi útil: 1) para confirmar que as mutações p.A1135Qfs e p.L708P são as mais importantes na população brasileira; 2) para demonstrar que a mutação tida como a mais frequente na Europa, a p.H1069Q, tem bem menor importância em nosso meio, embora mais frequentemente do que o observado anteriormente; 3) para confirmar (ou excluir) precocemente o diagnóstico e evitar a realização de exames desnecessários e invasivos e iniciar (ou não realizar) o tratamento, com base mais sólida, em pacientes com hepatopatia crônica idiopática e em familiares de portadores de DW; 4) para definir o diagnóstico de DW em casos de insuficiência hepática aguda grave, diagnóstico ainda que tardio, mas de suma importância para realização de estudo familiar subsequente, 5) para identificação não esperada de heterozigotos simples e polimorfismos de significado ainda não esclarecido em pacientes com insuficiência hepática aguda grave; 6) para identificação de casos inusitados de três genótipos diferentes causadores da doença na mesma família (homozigose de duas mutações diferentes e heterozigose composta); 7) para melhor definir que a mutação p.M645R em homozigose tem potencial para desenvolver a DW, embora resultados de estudos em *in vitro* sugiram função normal da proteína defeituosa sintetizada; 8) para definir que há casos de doentes com a mutação p.M645R em heterozigose composta de evolução extremamente benigna, com diagnóstico após a quinta década de vida, com discretas alterações hepáticas. Porém há casos com evolução mais grave tanto do ponto de vista hepático quanto neurológico, possivelmente influenciados pelas mutações que a acompanham.

Descritores: Doença de Wilson, Trifosfato de adenosina/genética, Proteínas de transporte de cátions/genética, Análise de sequência de DNA, Linhagem, Hepatite crônica, Falência hepática.

SUMMARY/ABSTRACT

Araujo T.F. The importance of detecting *ATP7B* gene mutations for the diagnosis of Wilson's disease [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

Wilson's disease (WD) is an autosomal recessive disorder secondary to mutations in the *ATP7B* gene resulting in toxic accumulation of copper in various tissues. The diagnosis of WD is made by the analysis of clinical, laboratory, histological findings and imaging tests. More than 500 mutations have been described in the *ATP7B* gene as the cause of WD. In order to expand the knowledge of the importance of mutation detection in the diagnosis of WD, we analyzed 36 patients with WD, 20 individuals from family screening, 18 with cryptogenic chronic hepatitis and seven with severe acute liver failure. For the diagnosis of WD the International Scoring System suggested by the European Association for the Study of the Liver (EASL) in 2012 was used. Demographic, clinical, laboratory and histological data were obtained retrospectively. Direct sequencing of 21 exons and intron boundaries of *ATP7B* gene was performed in genomic DNA extracted from peripheral blood leucocytes of all subjects. All patients with WD have at least four points of the scoring system without considering the DPA challenge test. In the family screening group, sequencing was important for the diagnosis of DW in fourteen patients; eight patients in the group of cryptogenic chronic hepatitis, and three patients in the group of severe acute liver failure. Five different genotypes were identified in one family (two homozygous, p.A1135Qfs/p.A1135Qfs and p.M645R/p.M645R, one compound heterozygous p.A1135Qfs/p.M645R, and two simple heterozygous p.A1135Qfs/0 and p.M645R/0). Two patients with acute liver failure were detected as simple

heterozygous. The p.A1135Qfs and p.L708P were the most frequent mutations in all groups. It is the first time p.M645R mutation was detected in homozygosity. The *ATP7B* gene sequencing was useful: 1) to confirm that p.A1135Qfs and p.L708P mutations are the most frequent in the Brazilian population; 2) to confirm that the most common mutation in Europe, p.H1069Q has lower frequency in our area; 3) to confirm (or exclude) an early diagnosis and to avoid unnecessary and invasive tests and to initiate (or not) the specific treatment with a stronger basis in patients with chronic liver disease and individuals from family screening of patients with Wilson disease; 4) to confirm the diagnosis, although late, of cases with severe acute liver failure, but very important to perform family screening; 5) to identify simple heterozygotes in patients with severe acute liver failure; 6) to describe unusual cases of three different genotypes of WD patients in a same family (two different homozygous mutations and one compound heterozygous); 7) to better define that p.M645R mutation in homozygosity develops WD, although the results from *in vitro* studies suggested a normal function for the defective synthesized protein; 8) to define that there are patients with p.M645R mutations in compound heterozygosity with a very benign clinical picture, with late diagnosis, after the fifth decade of life, with mild liver alterations. However, there are patients with a more severe clinical evaluation, hepatic or neurologic, probably secondary to the influence of the other mutation.

Descriptors: Wilson's disease; Triphosphate adenosine/genetic, cation transport proteins /genetic, Sequence Analyze DNA, Pedigree Hepatitis chronic, Liver failure acute.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais

A Doença de Wilson (DW) é distúrbio autossômico recessivo decorrente de alteração na excreção biliar do cobre (Petrukhin et al. 1994). Foi descrita, primeiramente, por Samuel Alexander Kinnier Wilson (Wilson, 1912) como degeneração lenticular progressiva, denominação que nos remete ao comprometimento mais importante dos dois órgãos na doença (fígado e cérebro), e relaciona a lesão dos gânglios da base com a cirrose hepática. A DW pode ocorrer na proporção de um para cada 30.000 a 100.000 indivíduos, ocorrendo com mais frequência em regiões geográficas com elevadas taxas de consanguinidade (Ala; Shilsky, 2004; Ala et al., 2007).

1.2 Histórico

Publicações anteriores à de Alexander Kinnier Wilson já tinham feito menções à síndrome tais como a de Gowers (1888) que relatou casos de coréia tetanoide associada à cirrose hepática; a de Westphal e Strümpell (1889) que caracterizaram a pseudoesclerose em prováveis portadores dessa condição. Kayser (1902) e Fleisher (1903) descreveram os anéis corneanos associados à doença neurológica e à hepática e Alzheimer (1912) observou pacientes com pseudoesclerose e alterações intensas das células dos gânglios da base com neurônios preservados. Hall (1921) sugeriu o caráter genético autossômico recessivo, o que foi confirmado por Bearn (1953). Tanzi et al., Bull et al., e Yamaguchi et al., independentemente, identificaram e clonaram, em 1993, o gene *ATP7B*, responsável pela DW.

No Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), o primeiro caso de DW foi identificado em 1946 e o diagnóstico foi realizado mediante manifestações neurológicas e hepáticas, além da presença dos anéis de Kayser-Fleischer (Barbosa et al., 2009). Na década de 60 iniciou-se, nesse hospital, a investigação da enfermidade com o estudo do cobre e da ceruloplasmina (Canelas et al., 1962; Canelas et al., 1963_{a,b}; Canelas et al., 1964). Nos anos 80, houve a incorporação de exames de imagens, ecografia e tomografia computadorizada (Barbosa et al., 1986; Cançado et al., 1987). A análise molecular do gene *ATP7B* começou a ser realizada no início da década passada, com análise de pacientes provenientes do serviço, assim como de outras instituições (Deguti et al., 2004; Machado et al., 2008).

1.3. A proteína *ATP7B* e o metabolismo do cobre

O cobre tem papel essencial em vários processos biológicos envolvidos na geração de energia, no transporte de oxigênio, na transdução de sinal, geração de ATP, além de ser cofator de várias enzimas. A deficiência de cobre afeta o desenvolvimento do coração, metabolismo de lipídeos, processos inflamatórios e resistência a drogas quimioterápicas (Banci et al., 2010; Lutsenko, 2010).

O cobre apresenta dois estados redox, um oxidado Cu^+ e outro reduzido Cu^{2+} . É extremamente útil como cofator em proteínas que realizam reação redox ou transporte de elétrons. Apesar dessa importante função, é sabido que o Cu^+ tem efeitos citotóxicos, embora os mecanismos moleculares dessa toxicidade não estejam completamente claros (Banci et al., 2010).

Em condições fisiológicas, a concentração citosólica do cobre é essencialmente zero, uma vez que 95% do cobre são retirados da circulação pelo fígado dentro de 24 horas. Seis a 8% reaparecem incorporados à ceruloplasmina, o que corresponde a aproximadamente 95% do cobre plasmático. A ceruloplasmina é uma ferroxidase sintetizada no fígado e secretada no plasma após a incorporação de seis átomos de cobre. O cobre que não retorna à corrente sanguínea é excretado na bile. A não incorporação do cobre à ceruloplasmina durante a sua síntese resulta na secreção de apoceruloplasmina desprovida de atividade ferroxidase, o que a torna rapidamente degradada. Em pacientes com DW a falta de funcionalidade da ATP7B também resulta na secreção de apoceruloplasmina e níveis diminuídos de ceruloplasmina no plasma (Banci et al. 2010; Tao e Gitlin 2003).

Aproximadamente 60% do cobre oriundo da dieta (cerca de 1-2 mg/dia) é absorvido na parte proximal do intestino delgado, o que é suficiente para as necessidades do indivíduo, entretanto interferem nesse processo sexo, idade, uso de contraceptivos e a alimentação (Tao e Gitlin, 2003; van den Berghe & Klomp, 2009; Huster 2010). Estudos mostram que na faixa etária de 20 a 59 anos, a absorção foi maior no sexo feminino e não houve diferença em relação à idade (Johnson et al., 1992).

Na absorção do cobre são necessárias as ações de uma metaloredutase que atuam no polo apical do enterócito, antes do seu ingresso. O transporte transmembrana é realizado via proteínas hCTR1 e DMT1. A proteína ATP7A, expressa no trato gastrointestinal, exporta o metal à circulação portal ligado à albumina ou à histidina de onde é transportado a vários tecidos, principalmente ao fígado. No hepatócito desliga-se das proteínas transportadoras e é

introduzido ao citosol pela proteína transportadora CTR1, situada no polo sinusoidal dessa célula. No citoplasma é ligado a proteínas citoprotetoras (metalotioneína, glutatona) e à chaperona Atox 1, que o transporta até a proteína ATP7B, localizada no complexo de Golgi do hepatócito (Tao & Gitlin, 2003; Roberts; Sarkar, 2008).

A ATP7B é uma proteína transportadora de cobre de 1.465 resíduos de aminoácidos com regiões conservadas chamadas domínios, também presentes em outras ATPases do tipo P (Tanzi et al. 1993; Bull et al. 1993). A região N-terminal possui seis domínios de ligação de cobre e cada um contém aminoácidos conservados MXCXXC (C cisteína; M metionina e X qualquer outro aminoácido) (de Bie et al. 2007). Outros domínios funcionalmente importantes são típicos de ATPases transportadores de íons: 1) domínio de fosforilação contendo um motivo altamente conservado Asp-Lys-Thr-Gly-Thr (DKTGT) sendo o aminoácido ácido aspártico fosforilado (Asp) típico de ATPases tipo P; 2) domínio com motivo Thr-Gly-Glu (TGE) envolvido na transdução de energia da hidrólise do ATP para transportar cátion; 3) uma prolina invariavelmente entre duas cisteínas (CPC) no canal de cátion; 4) domínio de ligação de ATP (de Bie et al 2007; Kenney e Cox 2007) (Figura 1).

A ATP7B participa do metabolismo do cobre por meio de dois mecanismos: 1) incorporação à apoceruloplasmina, originando a holoceruloplasmina, mais estável, com meia-vida de 4 a 5 dias, que será secretada para o plasma, contendo 95% do cobre circulante; 2) redistribuição do metal para o endossomo e lisossomo até a sua excreção biliar. Nesse último processo a proteína MURR1 interage com a ATPase para excreção biliar do metal. Outra via de eliminação é

a renal, que representa menos de 5% do cobre excretado (Schaefer et al., 1999; Harris, 2000; Shim; Harris, 2003; Ala; Schilsky, 2004 Ala et al., 2007).

Figura 1. Representação esquemática da topologia da *ATP7B*
(adaptado de Bie et al. 2007)

Em condições normais de concentração de cobre ($< 1\mu\text{M}$), a ATP7B localiza-se no complexo de Golgi. Maior concentração de cobre extracelular promove redistribuição da ATPase na membrana apical canicular, em vesículas e em seguida em vacúolos dos canalículos biliares. As vesículas com cobre prosseguem através da membrana do canalículo biliar do hepatócito, fundindo-se com lisossomos e são excretadas na bile por exocitose (Ala et al. 2007; Lutsenko et al. 2008) (Figura 2).

Figura 2. Fisiologia do transporte de cobre dentro do hepatócito normal e com DW (adaptado de Madsen et al. 2006).

A ATP7B também é expressa em outros tecidos tais como cérebro, coração, rins, pulmões e placenta. Estudos experimentais, em murinos, sugeriram que, ao ocorrer excesso de cobre no intestino, o metal é compartimentado em forma de vesículas por essa proteína, contribuindo para homeostase do metal também no enterócito (Weiss et al., 2008).

1.4. Biologia molecular DW

1.4.1. Gene *ATP7B*

A DW é causada por mutações no gene *ATP7B*, responsável pela síntese de um transportador de cobre, ATPase tipo P. Após as evidências apresentadas

por Hall em 1921, foram realizados vários trabalhos a fim de se localizar o gene da DW (Frydman et al. 1985; Bowcock et al. 1988). Com base na homologia do gene da Doença de Menkes, responsável também pela síntese de transportador de cobre do tipo P, *ATP7A*, (Mercer et al. 1992; Vulpe et al. 1992), Bull et al (1993) identificaram, por clonagem posicional, usando cromossomos artificiais de leveduras (YACs), na região 13q14.3, um gene cujo produto era uma proteína com 57% de homologia com *ATP7A*. Tanzi et al (1993) analisaram diversos cDNAs por hibridização e observaram uma ATPase transportadora de metal pesado com 76% de homologia com a transportadora da doença de Menkes e essa proteína foi nomeada *ATP7B*. O *ATP7B* é um gene com 21 éxons, mais de 80.000 pares de bases (pb) e uma região codificadora de aproximadamente 4100 pb (Behari e Pardasani 2010). A primeira caracterização da estrutura do gene foi realizada em 1994 (Petruknin et al. 1994) e já foram descritas mais 500 mutações (<http://www.wilsonsdisease.med.ualberta.ca/database.asp>).

1.4.2 Mutações gene *ATP7B*

As primeiras mutações no gene *ATP7B* foram detectadas na década de 90. No Brasil, os casos de DW ocorrem em associação com pelo menos 37 mutações no gene *ATP7B*, 14 das quais tiveram sua identificação relatada pela primeira vez: p.M33T p.N41S, c.1434delC, c.2296insA, c.2438-2440delTAAinsAT, p.S932X, p.V949G, p.L1088X, p.F1094L, p.T1232P, p.K1258X, p.L1275S, p.L1373R e c.IVS3+1 G/C (Deguti et al. 2004, Machado et al. 2007).

Apesar de grande diversidade de mutações, observa-se que pacientes de determinados grupos étnicos ou de algumas regiões geográficas manifestam

preferencialmente a DW associada a única mutação ou a pequeno número delas (Ferenci, 2006) (Tabela 1).

No Brasil, p.A1135Qfs (34,8%) foi a mais frequente e ocorreu em 63,3% das famílias oriundas do estado de São Paulo. A p.L708P teve frequência alélica de 14,1% em 46 casos índices estudados e em 27,4% das famílias de Minas Gerais e Bahia. As demais mutações ocorreram em frequências inferiores a 5%, em pacientes provenientes de vários estados (Deguti 2004). Esse estudo de sequenciamento foi realizado conjuntamente com pesquisadores da Universidade de Humboldt e todo o trabalho de biologia molecular foi efetuado na Alemanha.

Tabela 1. Mutações mais comuns da DW de acordo com a população estudada.

País	N	Mutação mais comum	FA* em %	Outra mutação	FA* em %	Referências
Áustria	125	p. H1069	34,1	p.G710S c.2299insC	6,4 3,6	Ferenci 2006
Alemanha	243	p. H1069Q	47,9	c.2299insC c.3402delC	2,9 4,3	Ferenci 2006
Rússia	48	p. H1069Q	39,0	c.3402delC (19)	19	Shah et al. 1997
Itália	99	p. H1069Q	17,0	c.2299insC p.2530delC	6,8 9,0	Loudianos et al. 1997
Ilhas Canárias	24	p. L708P	64,0	—	—	García-Villarreal et al. 2000
Grécia	62	p. H1069Q	35,0	p.R969Q	12,0	Panagiotakaki et al. 2004
Brasil	46	c. 3402delC	30,8	p.L708P	16,7	Deguti et al. 2004
Arábia Saudita	56	p.Q1399R	32,0	p.S774R	16,0	Al Jumah et al. 2004
Índia	43	p.I1102T	6,2	p.P992X p.P992H c.3031insC	5,8 5,8 5,8	Kumar et al. 2005
Japão	47	c.2871delC	15,9	p.R778L c.1708-5T>G	13,4 11,0	Okada et al. 1999
China	66	p.R778L	49,2	—	—	Liu et al. 2004

*FA: Frequência alélica

Mutações do tipo *missense* que apresentam substituição de um nucleotídeo por outro, por exemplo, a p.L708P, podem alterar as características

da proteína ATP7B (estabilidade, ligação com o ATP, interações com outras proteínas, localização da ATP7B no hepatócito e transporte do cobre para fora do hepatócito) que resultam, finalmente, na perda da função da proteína. A mutação H1069Q, caracterizada pela substituição do aminoácido histidina na posição 1069 pelo aminoácido glutamina, corresponde de 35% a 50% dos alelos de DW na população europeia. Stapelbroek et al. (2004) analisaram 577 pacientes e sugeriram a relação entre a mutação p.H1069Q com manifestações neurológicas e início tardio das manifestações clínicas e dos sintomas. Panagiotakaki et al. (2004) também associaram a mutação p.H1069Q com manifestações neurológicas e início tardio, porém, Vrabelova et al. (2005) e Shah et al. (1997) não encontraram relação entre manifestações neurológicas e hepáticas com a mutação p.H1069Q. Rodriguez-Granillo et al. (2008) sugeriram que as proteínas com essa mutação, H1069Q, são mais sensíveis a temperaturas superiores a 20°C e perdem sua função. Portanto, elas não teriam função na temperatura corpórea por permanecerem desenoveladas.

Mutação do tipo *nonsense*, por exemplo, a p.L1088X, é mutação pontual que muda o códon específico de um aminoácido para um dos códons finalizadores (UAG, UAA, UGA). Já as mutações *frameshift*, por exemplo, a p.A1135Qfs, são causadas por deleções e inserções de um ou uma série de nucleotídeos, não formando as trincas de nucleotídeos (códon) corretas, o que resulta em não alinhamento correto das duas fitas de DNA, deixando a “leitura confusa”, com tradução diferente da original. Gromadzka et al. (2005) e Merle et al. (2010) sugeriram que mutações do tipo *nonsense* e *frameshift* provocam início precoce das manifestações clínicas, porém essas informações não foram confirmadas por Angios et al. 1998; Deguti et al. 2004, Okada et al. 2000 e

Palsson et al. 2001. Além disso, por mecanismo desconhecido, mutações *nonsense* resultam, muitas vezes, na síntese de mRNA altamente instável, que é rapidamente degradado pela via conhecida como decaimento de mRNA mediado por alterações sem sentido, com perda completa da estrutura e função da proteína (Gromadzka et al 2005).

1.4.3 Mecanismo patogênico na doença de Wilson

O mecanismo patogênico na DW envolve dano oxidativo devido à sobrecarga de cobre (Ferenci et al. 2005). Têm sido detectados em fígados de pacientes com DW a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), bem como a oxidação lipídica e danos ao DNA, particularmente em estádios avançados da doença (Yasuda et al. 2006; Nair et al. 1998; Hayashi et al. 2006), o que ocasiona apoptose. Ainda não foram definidas quais vias de apoptose influenciam a perda celular na DW, mas somente os danos provocados pela geração de ERO não explicam a falta de correlação fenótipo–genótipo, a variabilidade de manifestações clínicas, inclusive entre gêmeos, e a piora no quadro neurológico no tratamento com agentes quelantes de cobre.

Apesar da patogênese na DW não estar completamente esclarecida, sabe-se que a ATP7B codificada pelo gene mutante não consegue excretar o cobre do hepatócito, produzindo desequilíbrio no balanço e acúmulo tóxico do metal, que inicialmente se distribui no citosol, levando posteriormente à formação de radicais livres, deposição de glicogênio nuclear, disfunção mitocondrial, alteração da oxidação lipídica (gerando esteatose) e estresse oxidativo, que resultam em dano celular, inflamação, fibrogênese e cirrose. Esse estresse também provoca resposta adaptativa celular com expressão de vários genes,

alguns relacionados à degradação proteassomal e outros que possibilitam a sobrevivência celular (Gu et al., 2000; Ferenci, 2004, Rosencrantz; Muller et al., 2007; Schilsky, 2011).

O cobre acumula-se em diversos tecidos, principalmente no fígado e cérebro, levando a manifestações hepáticas, neurológicas, hematológicas, oftalmológicas, renais, osteomusculares e neuropsiquiátricas, porém alguns casos são assintomáticos por longos períodos.

Quando a capacidade de armazenamento hepático do cobre se esgota, há liberação desse metal na circulação, o que acarretará sua deposição em outros tecidos. No cérebro, ainda não está bem esclarecido como esse acúmulo é lesivo, porém a sua interação com proteínas forma complexos bioinorgânicos, com propriedade oxidante ou antioxidante, que poderiam alterar a função neuronal ou desencadear processo neurodegenerativo (Ferenci, 2004).

No fígado, a sobrecarga de cobre pode desenvolver hepatite, cirrose, podendo progredir para insuficiência hepática (Huster 2010). No cérebro, o globo pálido, tálamo, mesencéfalo, ponte e corpo caloso são as estruturas mais afetadas (Trocello et al. 2010). O desenvolvimento de sintomas neuropsiquiátricos (movimentos involuntários, ataxia, depressão) geralmente ocorre em pacientes mais velhos embora possam ser secundárias as manifestações hepáticas da encefalopatia hepática.

O cobre atua direta ou indiretamente (produzindo radicais livres), na esfingomielinase ácida liberando ceramida, que está implicada no processo de apoptose de hepatócitos e eritrócitos nos indivíduos com DW (Lang et al., 2007). Outro mecanismo descrito é que o excesso do metal resulta em mudança na conformação e degradação mais precoce da proteína relacionada à inibição da

apoptose (XIAP), que atua na supressão da caspase-3 o que leva a maior suscetibilidade ao processo de morte celular (Mufti et al., 2006).

Embora as mutações pareçam exercer algum papel na determinação da apresentação clínica, não há linearidade entre genótipo e fenótipo. Tem se buscado outros fatores modificadores da doença, como outros genes que possam influenciar na apresentação clínica da DW. Recentes estudos em modelos animais têm demonstrado novas vias que podem contribuir para o desenvolvimento da patologia. Embora sejam limitados, esses estudos sugerem envolvimento de processos celulares que anteriormente não tinham sido associados à DW.

Gromadzka et al. (2011) sugeriram que pacientes com os polimorfismos C677T e A1298C no gene da 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), enzima relacionada ao metabolismo da homocisteína, apresentaram alteração na apresentação clínica em relação aos que não os possuíam. O polimorfismo C677T foi associado à apresentação hepática e início mais precoce dos sintomas. Foi sugerido que a homocisteína promove estresse oxidativo, resultando em toxicidade hepática e neurológica.

A apolipoproteína E (APOE) está expressa principalmente no fígado e cérebro e atua no metabolismo e transporte dos lípidos para os tecidos. Possui três polimorfismos principais: APOE2, APOE3 e APOE4, sendo essa última associada à despolimerização microtubular e à inibição do crescimento de axônios e dendritos (Nathan et al., 1995; Verghese et al., 2011). Schiefermeier et al. (2000) sugeriram que pacientes com DW e homozigotos H1069Q e genótipo APOE 3/3 exibiram manifestações clínicas mais tardias em relação ao APOE 3/4, possivelmente devido à ação antioxidante da APOE 3. Outros estudos

reforçaram os resultados de Schiefermeier. Litwin et al. 2012 observaram que os pacientes com os genótipos APOE 3/4 e APOE 4/4 exibiram quadro clínico mais precoce em relação àqueles com os genótipos APOE 3/3 no sexo feminino.

Grubenbecher et al. (2006) e Merle et al. (2006), sugeriram que pacientes com DW e com polimorfismos no códon 129 no gene *PRP* (gene codificador da proteína príon), em homozigose para metionina, apresentaram quadro neurológico mais grave, associado à faixa etária mais elevada. Príon é uma glicoproteína de superfície celular ligado a GPI (glicosilfosfatidilinositol), com aproximadamente 209 resíduos de aminoácidos, codificado pelo gene *PRP*, e apresenta duas regiões distintas: um domínio C-terminal α hélice e uma região N-terminal altamente flexível, sem estrutura secundária definida na ausência de Cu^+ , com uma região com a repetição de oito resíduos de aminoácidos (Jones et. al 2005).

1.5 Diagnóstico

Scheinberg e Sternlieb (1984) estabeleceram critérios baseados nos achados clínicos e laboratoriais associados à presença dos anéis de KF, aos níveis de ceruloplasmina sérica menor que 20 mg/dL, à concentração de cobre hepático maior que 250 µg/g de tecido seco, à cuprúria basal de 24 horas maior que 100 µg/dia e ao teste com cobre radioativo. Para o estabelecimento do diagnóstico seriam necessários pelo menos dois desses parâmetros.

1.5.1 Anéis de Kayser-Fleischer

São observados na DW e devem ser pesquisados por lâmpada de fenda, principalmente na forma neurológica. Podem ser encontrados excepcionalmente em colestases de longa duração, como por exemplo na colestase extra-hepática e na cirrose biliar primária (Scheinberg; Sternlieb, 1984; Roberts & Schilsky, 2008). Nessas situações, os níveis de ceruloplasmina são normais ou mesmo elevados. Crianças assintomáticas com DW raramente apresentam essas estruturas (Nicastro et al., 2010).

1.5.2 Ceruloplasmina

A ceruloplasmina é uma α_2 -globulina azul, com atividades de ferroxidase e transporte de cobre sérico. Seus níveis são mais frequentemente mensurados no soro pelo método de nefelometria, radioimunoensaio e imunodifusão radial (EASL 2012). Seus níveis elevam-se em processos inflamatórios, gestação, uso de contraceptivos, hepatite aguda e em neoplasias. Por outro lado está reduzida nos casos de DW, desnutrição grave, cirrose descompensada, falência hepática aguda, aceruloplasminemia, enteropatia ou nefropatia perdedora de proteínas,

síndrome de Menkes e em aproximadamente 20% dos indivíduos heterozigotos para o gene *ATP7B* (Scheinberg; Sternlieb, 1984; Brewer; Yuzbasiyan-Gurkan, 1994; Ala; Schilsky, 2004).

Walshe (2005) observou que outras condições neurológicas também apresentam valores reduzidos de ceruloplasmina, como doença de Huntington, esclerose múltipla, aceruloplasminemia, panencefalite esclerosante subaguda e síndrome de Hallervorden Spatz.

Mak et al. (2008) encontraram níveis séricos de ceruloplasmina menores que 20 mg/dL em 5,8% de indivíduos saudáveis, nenhum apresentava níveis menores de 14 mg/dL. A análise desse valor mostrou sensibilidade e especificidade no diagnóstico da DW de 93% e 100% respectivamente, com valor preditivo positivo de 100% e negativo de 97,1%.

1.5.3 Cobre urinário

A concentração normal do cobre urinário é menor que 30 µg/24 h, entretanto, valores maiores que 100 µg/24 h são encontrados em pacientes sintomáticos com DW, cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária e hepatite autoimune. Indivíduos heterozigotos e assintomáticos com DW podem apresentar valores intermediários (Medici et al., 2007; Roberts & Schilsky, 2008). Nicastro et al., (2010) sugeriram utilizar cuprúria basal maior do que 40 µg/24 horas em crianças assintomáticas com DW, pois observaram sensibilidade e especificidade de 78,9% e 87,9%, respectivamente, sugerindo dessa forma, que o valor de 40 µg/24 horas seja o adotado.

O cobre urinário, assim como a ceruloplasmina, pode ser normal em infantes com DW (Werlin et al., 1978; Nazer et al., 1986). Para aumentar a

acurácia diagnóstica dessa população, foi proposto o teste desafio com a d-penicilamina (DPA), em que 500 mg de d-penicilamina são administrados com intervalo de 12 horas, com coleta de urina por 24 h, a partir da primeira dose. Níveis maiores que 1600 µg/24 h apresentaram sensibilidade e especificidade, para o diagnóstico, de 88% e 98,2%, respectivamente (Costa et al., 1992). Quando esse teste foi reproduzido em crianças sintomáticas a sensibilidade observada foi 92%, enquanto naquelas assintomáticas foi 46% (Muller et al., 2007).

Foruny et al. (2008) realizaram o teste desafio da DPA em adultos. O valor encontrado, para diferenciar os portadores de DW de outras hepatopatias, foi 1057 µg/24 h, com sensibilidade e especificidade de 100% e 82,3%, respectivamente. Todos os pacientes com valor de cuprúria maior que 1400 µg/24 h, após teste, tinham DW.

O valor desse teste em rotina de portadores de doença hepática crônica sem etiologia definida é desconhecido. Tentando avaliar o resultado desse exame em heterozigotos prováveis de DW, Vieira et al. analisaram pais de wilsonianos e verificaram que nenhum indivíduo do estudo apresentou valores acima de 1400 µg/24 h, porém níveis tão altos quanto 1085 µg/24 h foram encontrados em um pai sem evidência de ser portador da doença (Vieira et al 2012).

1.5.4 Quantificação do cobre hepático

A quantificação do cobre hepático maior do que 250 µg/g de tecido seco é considerada o melhor teste diagnóstico para DW. Os indivíduos sadios geralmente apresentam valores menores do que 50 µg/g (Roberts & Schilsky, 2008).

Ferenci et al. (2005) encontraram níveis menores do que 250 µg/g em 17% dos wilsonianos. A sensibilidade e especificidade observadas foram 83,3% e 98,6%, respectivamente, e ao se reduzir o limite de 250 para 75 µg/g, aumentou-se a sensibilidade do exame para 96,5% com leve queda na especificidade.

Todavia, as colestases, como cirrose infantil da Índia, e outras hepatopatias também apresentam cobre hepático elevado (Roberts & Schilsky, 2008).

1.5.6 Estudos de imagem encefálica

Os achados mais frequentes da DW nos estudos de imagem encefálica são as alterações nos gânglios da base, tálamo, tronco cerebral e placa tectal visibilizadas na tomografia de crânio (TC) como hiperdensidade e na ressonância nuclear magnética (RNM) encefálica como hiperintensidade do sinal em T2. Outras alterações são a atrofia cortical e subcortical. Uma imagem característica da doença é o sinal do urso panda gigante, encontrado na ponte ou mesencéfalo (Roberts & Schilsky, 2008; Prashanth et al., 2010).

1.5.7 Teste genético para o gene *ATP7B*

A análise de mutações *ATP7B* é realizada com técnicas de sequenciamento direto de todo o gene ou pesquisa de alelos específicos. Recomenda-se o estudo genético naqueles pacientes em que o diagnóstico não pôde ser estabelecido mediante os achados do quadro clínico e dos exames laboratoriais e nos indivíduos assintomáticos com irmão portador de DW (Ferenci et al., 2003; Roberts & Schilsky, 2008; Huster, 2010; EASL, 2012).

Desde a identificação do gene *ATP7B* como gene da DW em 1993, o teste genético tem sido sugerido para o diagnóstico de DW (Bennet & Si 2011). A sensibilidade do teste genético foi inicialmente de 80% (Vrabelova et al. 2005). Estudos subsequentes tem reportado sensibilidade superior a 95%, com as novas técnicas de sequenciamento (Bennet & Si 2011). O teste genético tem se mostrado mais sensível em crianças do que em adultos, pois quanto menor a idade de início das manifestações, as mutações provavelmente serão detectadas mais cedo (Schmidt, 2009).

O sequenciamento direto de éxons e suas bordas intrônicas do gene *ATP7B* pode apresentar uma sensibilidade que é comparável, senão superior, ao da quantificação de cobre no tecido e evita a necessidade de biópsia hepática (Bennet & Si 2011). No entanto, o teste genético tem suas limitações: além de ser caro, não se consegue detectar 100% das mutações, é um exame que pode demorar até 90 dias, e não está disponível em grande parte dos serviços.

Krumina et al. (2008) demonstraram como o sequenciamento do gene *ATP7B* pode ser utilizado para estimar a incidência da DW, embora o procedimento não assume que a penetrância gênica seja de 100%. Kucinskas

et al. (2008) também comprovaram a importância do teste genético para o diagnóstico mais rápido da DW.

Dessa forma os testes genéticos têm melhorado muito a capacidade de diagnosticar a DW em pacientes com dados clínicos e bioquímicos de difícil interpretação e em familiares de pacientes afetados. Em populações com maior frequência de determinadas mutações, o teste direto para identificá-las pode simplificar e acelerar o diagnóstico. Ao longo do tempo, esse teste vem sendo usado regularmente como diagnóstico, o que permite maior precocidade de iniciar o tratamento. Diagnóstico mais rápido induzirá a reversão, ou mesmo a prevenção de novas lesões induzidas pelo cobre em pacientes com suspeita de DW. Poderá, ainda, evitar o aparecimento de formas mais graves nos pacientes com doenças hepáticas mais discretas.

1.5.8. Escore internacional diagnóstico da doença de Wilson

Em 2003 Ferenci et al sugeriam um sistema de escore para diagnóstico de DW em que o sequenciamento seria um dos parâmetros. A detecção de mutações em homozigose e heterozigose composta seria diagnóstica, a despeito da presença de alterações clínicas, laboratoriais e histológicas, pois teria pontuação quatro, o escore exigido para “diagnóstico muito provável” de DW. Na Tabela 2 está apresentado esse sistema de escore.

Como todo escore diagnóstico, há limitações na utilização do proposto para diagnóstico da DW. Quadro neurológico grave é muito inespecífico. Pacientes com quadro neurológico grave que se assemelha ao da DW pode ter diagnóstico sugerido em razão da pontuação de 2. Como foi mencionado acima, o teste desafio com 1,0 grama de DPA fornece resultados acima de 5 vezes o

limite superior em mais de 80% de prováveis heterozigotos da DW (pais de doentes) (Vieira et al, 2012).

Tabela 2. Sistema de escore sugerido por Ferenci et al. 2003

Parâmetros	Escore
Anéis de Kayser-Fleischer: presente	2
Ausente	0
Sintomas neuropsiquiátricos: severo	2
moderado	1
Ausente	0
Cuprúria basal: >1-2 vezes o valor normal	1
>2 vezes o valor normal	2
Normal, mas teste desafio com 1g DPA aumento na excreção do cobre maior que 5x o limite superior da normalidade	2
Cobre no tecido hepático: $\leq 50 \mu\text{g/g}$ tecido seco	-1
50-250 $\mu\text{g/g}$ tecido seco	1
>250 $\mu\text{g/g}$ tecido seco	2
cobre hepático (rodanina)	1
Ceruloplasmina: >20mg%	0
10-20mg%	1
< 10mg%	2
Mutações: homozigoto ou heterozigoto composto	4
heterozigoto simples	1

1.6 Tratamento

O tratamento inicial de todos os casos sintomáticos deverá incluir agentes quelantes do cobre a como DPA e trietiltetramina (trientina) (Roberts & Schilsky, 2008; EASL, 2012). Naqueles com a forma hepática a DPA parece ser mais eficaz, enquanto nos assintomáticos e com quadro neurológico os sais de zinco tiveram melhor tolerância (Wiggelinkhuizen et al., 2009). A Associação Europeia para o Estudo do Fígado (EASL, 2012) sugere que os sais de zinco possam ser a primeira escolha na apresentação neurológica. Contudo, tem de se considerar que a melhora clínica será lenta, uma vez que esse tratamento não influenciará imediatamente nos níveis do cobre já depositados nos diversos órgãos, apenas agirá na absorção do cobre ingerido na dieta. Nos

assintomáticos, tanto os agentes quelantes quanto o zinco poderiam ser utilizados como tratamento inicial.

1.6.1 Dieta

Alimentos com alto teor de cobre, como feijão, castanha, nozes, cogumelos, vísceras e chocolates devem ser evitados, ao menos no primeiro ano de tratamento. Em pacientes que não utilizam agentes quelantes, a dieta deve ser mais rigorosa (Roberts & Schilsky, 2008; EASL, 2012). Se bem que os casos de hipocupremia sintomática de pacientes com DW tenham sido relatados em pacientes que estavam em uso de sais de zinco (da Silva-Junior FP, 2011).

1.6.2 D-Penicilamina

A DPA promove a excreção urinária do cobre e induz a síntese de metalotioneína. É usada na dose inicial de 250 a 500 mg/dia, aumentando-se 250 mg a cada sete dias, até atingir 1 a 1,5 g/dia, dividida em duas a quatro tomadas. Administra-se uma hora antes das refeições. A dose de manutenção é de 750 a 1000 mg/dia. Entre os efeitos adversos mais frequentes estão hipersensibilidade, piora neurológica que ocorre de 10% a 50% dos casos, síndrome nefrótica e mielotoxicidade. Faz-se suplementação de piridoxina (vitamina B6) 25 mg/dia. Em geral doses prolongadas acima de 1 g/dia estão associadas a lesões dermatológicas do tipo elastose serpiginosa perfurante.

O controle terapêutico faz-se com cuprúria de 24 horas que deve estar entre 200-500 µg/24 horas e com o cobre sérico livre entre 5-15 µg/dL. Esse exame tem valor estimado, obtido com a subtração do cobre sérico total pelo

resultado do produto ceruloplasmina x 3,15 (Roberts & Schilsky, 2008; EASL, 2012).

1.6.3 Trientina

Atua aumentando a excreção renal do cobre e ferro. Pode causar deterioração neurológica, mas em menor frequência que a DPA. Outros efeitos colaterais são anemia sideroblástica, plaquetopenia e gastrite. A dose inicial é de 750 a 1500 mg/dia e a de manutenção de 750 a 1000 mg/dia, dividida em duas a três tomadas, uma hora antes das refeições (Roberts & Schilsky, 2008; EASL, 2012). O controle terapêutico é igual ao da DPA.

1.6.4 Sais de zinco

O seu mecanismo de ação é diferente da penicilamina e trientina: o zinco interfere com a absorção do cobre a partir do trato gastrointestinal. Os sais de zinco estimulam a síntese de metalotioneína intestinal e hepática. Uma vez ligado a metalotioneína, o cobre ficará retido nos enterócitos e será eliminado nas fezes com a esfoliação fisiológica das células intestinais (Roberts & Schilsky, 2008). A formulação dos sais poderá ser em acetato ou sulfato. Para o sulfato de zinco a dose deve ser de 220 mg e para o acetato de zinco 170 mg três vezes ao dia, que correspondem a 150 mg de zinco elementar por dia, também administrados uma hora antes das refeições (Roberts & Schilsky, 2008; Huster, 2010; EASL, 2012).

1.6.5 Tetratiomolibdato de amônia

É potente quelante de cobre, que funciona por meio de dois mecanismos: pode interferir a absorção intestinal de cobre (se administrado nas refeições) ou na ligação do cobre do plasma (quando tomado entre as refeições). Em doses baixas, remove cobre de metalotioneína, porém em doses mais elevadas, forma um complexo de cobre insolúvel que é depositado no fígado. Não causa deterioração neurológica e ainda não está disponível comercialmente (Roberts & Schilsky, 2008; EASL, 2012).

1.6.6 Transplante Hepático

É reservado para os casos de insuficiência hepática aguda grave, mesmo sem tentativa de tratamento, ou de cirrose hepática descompensada, que não melhoraram com tratamento clínico.

Na forma hepática da DW é considerado tratamento curativo, ao contrário das sequelas neurológicas que não constituem indicações para tal procedimento (Roberts & Schilsky, 2008; Catana; Medice, 2012; EASL, 2012).

Justificativa

2. Justificativa do estudo

Uma dificuldade encontrada no acompanhamento dos pacientes em investigação de doenças hepáticas no Hospital das Clínicas da FMUSP é a confirmação (ou exclusão) do diagnóstico em pacientes que apresentam manifestações hepáticas, sem quadro neurológico, sem anel de Kayser-Fleisher e que nem sempre têm condições de realizar a biópsia hepática por alterações pronunciadas da coagulação (em especial das formas graves). As alterações detectadas nos níveis de ceruloplasmina, de cobre sérico, de cobre urinário de 24 horas com ou sem desafio com a DPA nem sempre são suficientes para definir, com certeza, o diagnóstico da enfermidade que, ao se confirmar, certamente mudará a vida do paciente para sempre.

Também não está disponível no presente momento a técnica para dosagem do cobre no tecido hepático, o que diminui a especificidade da biópsia, pois as alterações histológicas não são patognomônicas e a presença de depósito corável de cobre nem sempre é identificada ou, quando o é, pode não corresponder ao diagnóstico de DW, pois também pode ser identificada quando há colestase.

Dessa forma, caso se dispusesse da pesquisa das mutações do gene *ATP7B* nessas situações de difícil diagnóstico, o atendimento aos pacientes na Instituição certamente seria de melhor qualidade.

Outra situação em que a pesquisa das mutações teria indicação fundamental seria em estudo de familiares após a identificação de um novo caso índice. Nessas situações, o diagnóstico precoce poderia ser antecipado em anos, antes mesmo que os exames laboratoriais se alterassem, significando

ganho de tempo no diagnóstico, o que representaria menor lesão nos órgãos-alvos.

OBJETIVOS

3. Objetivos

- 3.1.** Introduzir o sequenciamento do gene *ATP7B* em nosso hospital;
- 3.2.** Utilizar a pesquisa das mutações do gene *ATP7B* em casos suspeitos de DW;
  - 3.2.1.** Realizar o rastreamento familiar de pacientes com DW;
  - 3.2.2.** Esclarecer casos em que os dados clínicos, exames laboratoriais e histológicos foram inconclusivos para o diagnóstico definitivo de DW;
  - 3.2.3.** Esclarecer casos de insuficiência hepática aguda grave em o diagnóstico não foi definido com certeza.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

4. Casuística e Métodos

4.1. Seleção da casuística de pacientes com DW

Foram incluídos 35 (28 casos índices e 7 familiares) pacientes com diagnóstico de DW dos ambulatórios do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, dos serviços de Gastroenterologia, Neurologia, Cirurgia Experimental e de Hepatologia Pediátrica do Instituto da Criança. O estudo contou com apoio financeiro FAPESP 2006/00499-1.

Esse grupo de pacientes foi incluído com o objetivo de introduzir a metodologia de sequenciamento do gene *ATP7B* em nosso laboratório.

4.1.1. Seleção da casuística de pacientes suspeitos de DW

Foram incluídos 45 (22 casos índices e 23 familiares) pacientes dos ambulatórios do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo dos serviços de Gastroenterologia, Neurologia, Cirurgia e Transplante do fígado e Hepatologia Pediátrica do Instituto da Criança. Dos 45 pacientes, sete foram incluídos como insuficiência hepática aguda grave e eram acompanhados por um dos integrantes do grupo no ambulatório de Cirurgia e Transplante do Fígado e apresentavam suspeita de DW, hepatite autoimune, hepatite toxicomedicamentosa ou não, sem suspeita etiológica nenhuma.

4.2. Critérios de Inclusão

4.2.1. Diagnóstico ou não de DW definido clinicamente, segundo os critérios da literatura (EASL 2012; Roberts & Schilsky, 2008).

4.2.2. Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelo paciente ou por seus responsáveis legais para coleta de sangue e extração de DNA;

4.2.3. Existência de registros médicos em prontuário.

4.3. Critérios de Exclusão

4.3.1. Retirada do consentimento previamente assinado;

4.4. Diagnóstico de DW

O diagnóstico da DW foi feito com base em dados clínicos, bioquímicos, histológicos e exames de imagem.

4.4.1. O diagnóstico de DW foi baseado na apresentação hepática ou neurológica com pelo menos dois dos seguintes critérios: a) história familiar positiva em parentes de primeiro grau, b) baixo nível de ceruloplasmina sérica ($<0,2$ g/L); c) cobre no fígado elevado (> 250 μ g/g de tecido seco); d) presença de anéis de Kayser-Fleischer; e) valores basais 24 horas da excreção urinária de cobre maior que 100 μ g/24 horas; f) aumento dos níveis urinários de 24 horas após a administração de um grama de DPA para valores acima de 1400 μ g/24 horas; g) anemia hemolítica com teste de Coombs negativo (Vieira et al. 2012). Além disso, os pacientes, suspeitos que não atingiram quatro pontos (ou atingiram esse valor a partir da pontuação do teste de desafio com 1,0 g de DPA) de acordo com o sistema de pontuação internacional para o diagnóstico de DW (EASL 2012) foram submetidos ao sequenciamento do gene *ATP7B*. De acordo com a experiência do grupo de estudo do Hospital das

Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Vieira et al, 2012), a maioria dos heterozigotos (pais de pacientes diagnóstico clínico de DW) teriam pontuação dois a partir desse parâmetro.

4.4.2. Os achados histopatológicos hepáticos considerados sugestivos foram esteatose, glicogênio nuclear, fibrose, hepatite crônica ou cirrose, e a coloração positiva para rodanina. Por fim, admitir-se-ão também as alterações de gânglios da base visibilizadas na ressonância magnética de encéfalo.

4.5. Dados Demográficos

Os dados demográficos obtidos foram:

4.5.1. Idade: idade biológica declarada, e não a do registro oficial em cartório;

4.5.2. Sexo: masculino e feminino;

4.5.3. Cor: branca, negra, parda, amarela, baseada nos caracteres físicos e na informação do paciente;

4.5.4. Presença de outros membros da família com diagnóstico;

4.5.5. Idades no início dos sintomas e no momento do diagnóstico;

4.5.6. Origem geográfica mais remota da família: país e estado.

4.6. Genotipagem do gene *ATP7B*

4.6.1. Extração DNA genômico

O DNA genômico de cada paciente foi extraído a partir de sangue de veia periférica, utilizando-se kit comercial de extração de DNA genômico (QiAmp DNA Mini Kit 250, Qiagen®, Alemanha).

4.6.2. Amplificação das Regiões Codificadoras

Para a amplificação de cada segmento utilizou-se um par de *primers* (Tabela 3). Subdividiu-se o éxon 2 do gene *ATP7B*, devido à sua extensão, em quatro fragmentos: 2A, 2B, 2C e 2D. A amplificação de cada região codificadora foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação proteica pré-amplificação a 95°C por 30 segundos, seguindo-se 30 ciclos de desnaturação do DNA a 95°C por 30 segundos; hibridização por quatro minutos à temperatura otimizada para cada éxon e extensão da fita de DNA a 72°C, por 30 segundos. Finalmente realizou-se a extensão final da fita de DNA a 72°C por cinco minutos.

Após amplificação, todos os produtos de PCR foram submetidos a purificação enzimática, ExoSap (GE LifeScience®, Uppsala Suécia) conforme recomendações do fabricante.

4.6.3. Sequenciamento direto

Os produtos de PCR, após purificação enzimática, foram submetidos à reação *cycle sequencing*, usando os primers utilizados na PCR e o kit ABI Prism^R BigDye^{TM} Terminator Cycle Sequencing Ready (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A reação *cycle sequencing* foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação proteica pré-amplificação a 95°C por 30 segundos, 30 ciclos de desnaturação do DNA a 90°C por dois minutos, hibridização à temperatura otimizada para cada éxon (Tabela 3) por quatro minutos e extensão a 55°C por quatro minutos, e extensão final a 72°C por cinco minutos. Os produtos de PCR após *cycle sequencing* foram analisados no sequenciador ABI 3500. As sequências foram analisadas pelos programas Bioedit versão 7.0 e os alinhamentos foram realizados pelo programa online BLAST do site NCBI

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As mutações e polimorfismos foram confirmados pelo banco de mutações em DW (<http://www.wilsondisease.med.ualberta.ca/database.asp>).

Tabela 3 – *Primers* e tamanho dos produtos das PCRs da amplificação da região codificadora do gene *ATP7B* por PCR convencional.

Éxon	Sequência dos <i>Primers</i>	TH* (°C)	Produtos* (pb)
1	(F) 5'-TTCCCGGACCCCTGTTTGCT-3' (R) 5'-AATCCTCCTGGTGGGAGTGAGCAC-3'	54	262
2 ^a	(F) 5'-TGACACCAGTGGCATTGTTT-3' (R) 5'-GAGGCTGCCTTTCCTTCTG-3'	60	450
2b	(F) 5'- CATTGAGGACAGGATTTCCAAT-3' (R) 5'-ATATCAATTGGTCCCAGGCTTA -3'	60	447
2c	(F) 5'-GTAAATGACATGGGATTTGAAG-3' (R) 5'-AGAACTGGAAGACCTGTGATCT-3'	57	496
2d	(F) 5'-GAAGAAAATATTGGCCAGCTC-3' (R) 5'-AAGAGAAAAGGAGACAAGCTCA-3'	58	508
3	(F) 5'-GATATTTCTGACATTTTATCC-3' (R) 5'-GCAGCATTCTAAGTTCA-3'	57	323
4	(F) 5'-GCAGCCTCATTTTCAAACAGTG-3' (R) 5'-CGGCTTCAAAGGAAAGTGAAAC-3'	62	460
5	(F) 5'-CCTGGGTCTGTGGGATTCT-3' (R) 5'-AAAGGTGACTACAATTTTAAATGATGA-3'	57	233
6	(F) 5'-CTGCCAATGCATATTTTAAAC-3' (R) 5'-GGTAGAGGAAGGGACTTAGA-3'	54	199
7	(F) 5'-TGTGACAAAGGCAGGTCTTAAA-3' (R) 5'-GAAACCAGGCCCTTAGTAGTCC-3'	60	503
8	(F) 5'- AGCTAGAGGCTTTGCCATCC-3' (R) 5'-CATGGTGTTTCAAGGAAGTGAG-3'	60,5	
9	(F) 5'-TTTCGATAGCTCTCATTTTCAAC-3' (R) 5'-AAACCACATGGGCATCTGAT-3'	55	209
10	(F) 5'-AGTCGCCATGTAAGTGATAA-3' (R) 5'-CTGAGGGAACATGAAACAA-3'	57	193
11	(F) 5'-GCTGAGCAAGTGACAGTT-3' (R) 5'-CGAGGAAGATGAAGTTAGTT-3'	57	231
12	(F) 5'-TCCATGCTTGTGGTGTGTTTATT-3' (R) 5'-TCTGGCTTAGATTTTGCTGTCA-3'	60	358
13	(F) 5'-AGTTCGTCACGTTGTGTCCAGT-3' (R) 5'-GAGTGGCTCTCAGGCTTTTCTC-3'	62	396
14	(F) 5'-GCAGGTTGGGTGAAGTTCTG-3' (R) 5'-GGGCCCTCTAAGTGGTTTTTC-3'	60,5	399
15	(F) 5'-CTTTCTCTCAGTTCCCGCTTTC-3' (R) 5'-TCTGTGGTTTGACCCACCTCTA-3'	62	358
16	(F) 5'-GCTGTAAAAGGATTGCATGG-3'	60	300

Tabela 3 – *Primers* e tamanho dos produtos das PCRs da amplificação da região codificadora do gene *ATP7B* por PCR convencional - conclusão

Éxon	Sequência dos <i>Primers</i>	TH* (°C)	Produtos* (pb)
17	(R) 5'-AGGAGGACTCTTTTGCCTGA-3'	57	239
	(F) 5'-AACTTGGTAGCTGCTGAT-3'		
18	(R) 5'-TTTTGTCTCTAACTGCTTTTATGA-3'	60	345
	(F) 5'-TAACTTGAGGTTTCTGCTGCTATC-3'		
19	(R) 5'-GGAGCACACAGTGAGGAAGG-3'	54	
	(F) 5'-GGCAGACCCCTTCCTCAC-3'		
20	(R) 5'-CCTGGGAGAGAGAAGCCTTT-3'	53	392
	(F) 5'-CTAGGTGTGAGTGCGAGTT-3'		
21	(R) 5'-CAGCATTTGTCCCAGGT-3'	53	361
	(F) 5'-AATGGCTCAGATGCTGTT-3'		
	(R) 5'-GCTTGTGGTGAGTGGAGG-3'		

*PCR: reação em cadeia da polimerase

TH ; tempo de hibridização; PB pares de base

RESULTADOS

5. Resultados

5.1 Casuística

Durante o período do estudo, foram incluídos 35 pacientes diagnosticados com DW e 45 pacientes foram incluídos como casos suspeitos de DW sendo subdividido em 3 grupos, Tabela 4.

Tabela 4: Grupos dos pacientes suspeitos de DW

Rastreamento familiar (RF)	20
Hepatite crônica criptogênica (HC)	18
Insuficiência hepática aguda grave (IHAG)	07
Total	45

5.2. Dados demográficos

5.2.1. Pacientes com DW

Dos pacientes com DW, 21 foram do sexo masculino (60,0%) e 15 do sexo feminino (42,2%).

O início das manifestações clínicas foram em média de $17,6 \pm 5,5$ anos (variação de 9 a 27 anos), a média de idade na época do diagnóstico foi $18,8 \pm 6,4$ anos (variação de 9 a 35 anos). Foram excluídos da média de início das manifestações clínicas os pacientes assintomáticos. O tempo médio do atraso do diagnóstico foi de $0,8 \pm 1,4$ anos.

A etnia caucasiana foi a mais comum, com 78,3%, seguido de pardos 16,2% e negros 5,4%.

O rastreamento da família possibilitou a inclusão de oito pacientes que preenchiam os critérios para diagnóstico de DW, dos quais três eram

assintomáticos, dois não apresentavam sinais de hepatopatia e uma paciente foi submetida a transplante hepático por insuficiência hepática aguda grave.

5.2.2. Pacientes suspeitos de DW

A Tabela 5 apresenta os dados demográficos dos pacientes com suspeita diagnóstica de DW. Foram excluídos da média de início das manifestações clínicas os pacientes assintomáticos.

Tabela 5: Dados demográficos dos pacientes suspeitos de DW

	Sexo (M/F)	Idade no início dos sintomas (Média $\pm$ DP)	Idade ao diagnóstico (Média $\pm$ DP)	Atraso para o diagnóstico (Média $\pm$ DP)	Etnia B/P/A/N
Insuficiência hepática aguda grave	1/6	23,3 $\pm$ 11,5	24 $\pm$ 11,8	0,7 $\pm$ 0,95	3/3/1/0
Hepatite criptogênica	11/7	22,3 $\pm$ 11,9	21,5 $\pm$ 11,2	0,3 $\pm$ 0,8	14/2/1/0
Rastreamento familiar	12/8	12,7 $\pm$ 3,4	18,4 $\pm$ 12,8	0,2 $\pm$ 1,14	12/7

B brancos, P pardo, N negro; DP desvio padrão, M masculino; F feminino

As famílias estudadas foram oriundas dos seguintes estados: 36 de São Paulo; uma família de Goiás, Minas Gerais, Paraná, Ceará, Amapá e Piauí.

5.3 Apresentações clínicas, exames laboratoriais e histopatológicos

5.3.1 Apresentação clínica

As formas clínicas da DW foram classificadas conforme o órgão em que se observaram as primeiras manifestações da doença, a forma hepática foi mais frequente, exceto no grupo de rastreamento familiar; em uma paciente de DW o quadro renal foi o inicial; três pacientes que apresentavam forma hepática nas primeiras manifestações desenvolveram também forma neurológica posteriormente. Na Tabela 6 observam-se as principais manifestações clínicas. Os dados com todas as manifestações clínicas e suas respectivas frequências estão apresentados na Tabela 7. As apresentações neurológico-hepáticas estiveram presentes em 13 de 35 pacientes de DW (37,1%). Somente um em 19 pacientes (5,6%) com o diagnóstico realizado pelo rastreamento familiar apresentou manifestação neurológico-hepática. Não houve início clínico com quadro neurológico proveniente da DW nos demais grupos.

A pesquisa dos anéis de KF por lâmpada de fenda foi realizado em 30 de 35 dos pacientes (85,7%) com DW, em 13 de 20 dos indivíduos estudados pelo rastreamento familiar (65,0%) e em 16 de 18 dos investigados por hepatite crônica criptogênica (88,9%). Não foi realizada essa pesquisa em pacientes com insuficiência hepática aguda grave.

Tabela 6. Principais órgãos afetados nas primeiras manifestações da doença.

Órgãos	DW (N=35)	RF (N=20)	HC (N=18)	IHAG (N=7)
Fígado (%)	19 (54,3)	5 (25,0)	16 (88,9)	7 (100)
SNC (%)	14 (40,0)	1 (5,0)	-	-
Assintomático (%)	1 (2,8)	14 (70,0)	2 (11,1)	-
Outras Manifestações	1 (2,8)	-	-	-

RF rastreamento familiar; HC hepatite criptogênica; IHAG insuficiência hepática aguda grave;
SNC sistema nervoso central inclui as formas neuropsiquiátricas

As manifestações clínicas neurológicas mais comuns nos pacientes com DW foram disartria (12), disfagia (12) e tremores (10). Também foram descritas, disfasia (1), desvio de rima (1), mudança de comportamento (1), lentificação da fala (1), oligocinesia (1), riso sardônicos (1), coreoatetose (1), epilepsia (1), ataxia (1), bradicinesia (1), coreia (1), déficit de memória (1), descoordenação (1) e alteração na fala (1). Só um paciente diagnosticado com DW a partir de rastreamento familiar (RF_18), apresentou manifestações neurológicas e também apresentava epilepsia (1). Nos pacientes com hepatite criptogênica, um paciente apresentou encefalopatia hepática e em outro paciente foi observada ascite. Dos pacientes com insuficiência hepática aguda grave, todos apresentaram distúrbios de coagulação, icterícia, ascite (2) e nenhum paciente apresentou hemólise.

Tabela 7. Manifestações clínicas e suas respectivas frequências.

Forma Clínica (N)	Modo de apresentação	DW	RF	HC	IHAG
Assintomática (17) (%)	Hepatite crônica	1 (5,9)	9 (52,9)	2 (11,8)	-
Hepática (46) (%)	Sem hepatopatia	1 (5,9)	4 (23,5)	-	-
	Cirrose hepática descompensada	6 (13,0)	-	3 (6,5)	-
	Cirrose hepática compensada	2 (4,4)	3 (6,5)	1 (2,2)	-
	Hepatite aguda	3 (6,5)	-	-	-
	Hepatite crônica	6 (13,0)	2 (4,4)	10 (21,7)	-
	Carcinoma hepatocelular	-	-	1 (2,2)	-
	Insuficiência hepática aguda grave	2 (4,4)	0	0	7 (15,2)
Neurológica* (15) (%)	Disartria	12 (80,0)	1 (6,6)	-	-
	Tremor	10 (66,6)	1 (6,6)	-	-
	Alteração na marcha	5 (33,3)	1 (6,6)	-	-
	Distonia	8 (53,3)	-	-	-
	Rigidez	6 (40,0)	1 (6,6)	-	-
	Depressão	3 (20,0)	0	-	-
	Disfagia	12 (80,0)	1 (6,6)	-	-
	Hipertonía	3 (20,0)	-	-	-
	Sialorréia	9 (60,0)	1 (6,6)	-	-
	Dificuldade para andar	4 (26,6)	-	-	-

RF rastreamento familiar; HC hepatite criptogênica; IHAG insuficiência hepática aguda grave; SNC sistema nervoso central inclui as formas neuropsiquiátricas; * um paciente pode apresentar mais uma manifestação neurológicas, † demonstrados somente os que apresentava exame positivo por detecção de lâmpada de fenda.

5.3.2 Exames laboratoriais, de imagem e estudo anatomopatológico hepático e genotipagem *ATP7B*.

5.3.2.1 Pacientes com Doença de Wilson

As pesquisas de marcadores de hepatites virais e autoanticorpos foram realizadas em 21 de 35 (60,0%) e em 15 de 35 (42,9%) dos pacientes com DW, respectivamente. O paciente do grupo com diagnóstico já definido de DW (DW_1) apresentou reatividade para o anticorpo antimúsculo liso na titulação de 1/40, padrão vascular.

As enzimas hepáticas estavam acima do limite superior da normalidade em média $1,90 \pm 2,14$ para ALT, $1,90 \pm 1,16$ para AST, $1,30 \pm 0,58$ para a fosfatase alcalina e $2,00 \pm 2,02$ para a gamaglutamil transpeptidase, os níveis de bilirrubinas totais médios forma de $1,10 \pm 0,91$, de albumina $3,95 \pm 0,77$ g%, INR $1,31 \pm 0,35$ e de cobre sérico $34,20 \pm 21,83$ µg/dL.

A dosagem de ceruloplasmina foi reduzida em todos os pacientes, com média de $4,20 \pm 3,29$. A cuprúria basal foi realizada em 28 de 35 (80,0%) pacientes e 18 (64,3%) apresentaram valores > 100 µg/dia com média de $552,4 \pm 766,93$ µg/dia. O teste desafio com 1,0 grama de DPA foi realizado em 2 de 35 (5,7%) com média $2.908 \pm 1.438,25$ µg/24h.

Nos pacientes com DW a ultrassonografia de abdômen foi realizada em 21 de 35 (60,0%). A esplenomegalia foi o achado mais comum em oito dos 21 pacientes (38,09%). Outros achados foram modificação da ecotextura hepática em cinco de 21 pacientes (23,80%), aspecto de cirrose hepática e ascite em três de 21 (14,28%) cada, hipertensão portal e hepatite crônica em dois de 21 pacientes (9,52%) cada e fígado reduzido, colelitíase e colecistite em um de 21

pacientes (4,76%) cada. Em quatro de 21 (19,04%) os exames foram normais. Entre os estudos de imagem encefálica, a tomografia de crânio e a ressonância magnética de encéfalo, foram realizadas em quatro (11,11%) e em 12 de 35 (34,3%), respectivamente, em três de quatro (8,33%) e em um de 12 (2,77%) os exames foram normais, respectivamente. Alterações de núcleo da base foram encontradas em um de quatro (25%) e em oito de 12 (66,66%) dos pacientes submetidos a tomografia de crânio e ressonância magnética de encéfalo, respectivamente.

Foi realizado exame endoscópico do aparelho digestivo superior em 35 pacientes (2,8%) cujo resultado estava dentro dos parâmetros da normalidade.

O estudo anatomopatológico hepático foi realizado em dez de 35 (28,6%). A coloração de cobre pela técnica da rodanina foi positivo em três de dez (33,3%) pacientes com DW. Cirrose hepática foi encontrada em dois de dez pacientes (20%); seis de dez (60%) apresentaram esteatose macro ou microgoticular; atividade de interface foi detectada em quatro de dez (40%); glicogenação nucleolar em dois de dez (20%); um de dez (10%) apresentou siderose.

Foram detectadas 17 mutações distintas, três polimorfismos e uma mutação sinônima. Os polimorfismos detectados foram p.K952R (10,81%), c.3903+6 T>C (9,4%) e p.A1140V (6,76%) e a mutação sinônima foi a p.T991T (2,70%). Dos 36 pacientes, 14 foram homozigotos, 19 heterozigotos compostos e três heterozigotos simples. Na Tabela 8 encontram-se as mutações e suas frequências nos pacientes com DW.

Todos os pacientes desse grupo apresentavam no mínimo quatro pontos

pelo sistema de escore antes da realização do teste genético, mesmo não considerando o teste de DPA.

Tabela 8. Mutações e frequências alélicas nos pacientes com DW

Mutação	Domínio	Alelos afetados	Frequência gênica (%)
p.L708P	TM2	11	15,71
p.P1273L	ATP <i>hinge</i>	2	2,86
p.M769Hfs	TM4	1	1,43
p.A1135Qfs	ATP <i>loop</i>	29	41,43
p.I1184T	ATP <i>loop</i>	2	2,86
p.G869V	TM5	1	1,43
p.H1069Q	ATP <i>loop</i>	6	8,57
p.M645R	Cu6/TM1	3	4,29
c.3061-12T>A	Intrônica	3	4,29
p.W650X	Cu6/TM1	1	1,43
p.N1270S	ATP <i>hinge</i>	2	2,86
p.A971V	TM6	1	1,43
p.D765N	TM4	1	1,43
p.E1173K	ATP <i>loop</i>	1	1,43
p.L1275S	ATP <i>hinge</i>	1	1,43
p.G1061E	ATP <i>loop</i>	1	1,43
p.L1238Sfs	ATP <i>bind</i>	2	2,86
Sem mutação (2 alelos)			2,86
Total		68	100,00

TM transmembrana; CU sitio de ligação de cobre

5.3.2.2 Rastreamento familiar

A pesquisa de hepatites virais foi realizada em nove de 20 familiares (45,0%). Um indivíduo (RF_15) tinha cicatriz sorológica para hepatite A. A pesquisa de autoanticorpos foi realizada em oito de 19 (42,1%) indivíduos, e um deles (RF_11) apresentou fator antinúcleo na titulação 1/320, com o padrão pontilhado fino.

As enzimas hepáticas acima do limite superior da normalidade em média $2,36 \pm 1,80$ UI/L para ALT, $2,54 \pm 3,86$ UI/L para a AST, $1,32 \pm 0,71$ UI/L para a fosfatase alcalina e $1,35 \pm 0,58$ UI/L para a gamaglutamil transpeptidase. Os níveis médios de bilirrubinas totais foram de $0,48 \pm 0,23$ mg%, de albumina $3,93 \pm 0,94$ g%, de INR $1,10 \pm 0,12$, de cobre sérico $26,73 \pm 32,80$ µg/dL. Todos os resultados foram apresentados na média e desvio padrão.

A dosagem de ceruloplasmina foi reduzida em todos os pacientes, com média de $6,8 \pm 8,16$ mg/dL (2-35 mg/dL). A cuprúria basal foi realizada em nove de 20 pacientes (45,0%), e dois dos 9 familiares (22,2%) apresentaram valores >100 µg/dia com média de $120,80 \pm 221,73$. O teste desafio de um grama de DPA foi realizado em três de 19 (15,7%) com média de $425,66 \pm 491,32$ µg/24h.

O exame ultrassonográfico de abdômen foi realizado em 13 de 20 pacientes (65,0%), dos quais sete foram normais (53,4%), quatro (30,7%) apresentaram modificações na ecotextura hepática. Esplenomegalia, hepatomegalia, esteatose, hepatoesplenomegalia e hepatopatia crônica foram registrados uma vez cada (7,7%). Os estudos de imagem encefálica, ressonância magnética de encéfalo, foram realizados em dois de 20 (10,0%); e não foi realizado exame de tomografia de crânio. Alterações no núcleo da base, hipersinal em T2 e fair no centro semioval direito foram encontrados em um de

dois (50%) cada. Foi realizado exame endoscópico do aparelho digestivo alto em um de 20 (5,0%) e o resultado estava dentro dos limites da normalidade.

A biopsia hepática foi realizada em nove de 20 familiares (45,0%). O exame de rodanina foi feito em seis desses nove pacientes (66,6%) e foi positiva em apenas um caso (16,6%); quatro de nove casos (44,4%) apresentaram esteatose macro ou microgoticular; em dois de nove (22,2%) detectaram-se atividade de interface e glicogenação nuclear cada. Em dois de dez (11,1%) pacientes foi realizada quantificação de cobre no tecido com valor de 2949 µg/g tecido seco em um dos familiares; em outro familiar ainda não há o resultado.

Foram detectadas dez mutações distintas e dois polimorfismos. Doze familiares eram homozigotos, cinco heterozigotos compostos, três heterozigotos simples. Os polimorfismos detectados foram p.K952R (2,63%), c.3903+6 T>C (2,63%). Na Tabela 9 encontram-se as mutações e suas frequências. Em 14 pacientes o sequenciamento foi importante para definir diagnóstico de DW.

Tabela 9. Mutações e frequências alélicas dos familiares no rastreamento familiar.

Mutação	Domínio	Alelos afetados	Frequência gênica (%)
p.L708P	TM2	10	25,00
p.P1273L	ATP <i>hinge</i>	2	5,00
p.A1135Qfs	ATP <i>loop</i>	11	27,50
p.H1069Q	ATP <i>loop</i>	1	2,50
p.M645R	Cu6/TM1	5	12,50
p.D765N	TM4	1	2,50
p.T766Ffs	TM4	2	5,00
p.N1150Tfs	ATP <i>loop</i>	1	2,50
p.T1232P	ATP <i>bind</i>	3	7,50
p.K1238Sfs	ATP <i>bind</i>	1	2,50
Sem mutações (3 alelos)			7,50
Total		37	100,00

TM transmembrana; CU sítio de ligação de cobre;

5.3.2.2.1. Casos em que o diagnóstico de DW foi definido pelo sequenciamento no grupo de rastreamento familiar

Paciente RF_15, 51 anos, sexo feminino, parda, natural de Santo Antônio da Platina (PR) e residente de São Paulo (SP), assintomática, os pais não eram consanguíneos, portadora de hipotireoidismo e hipertensão arterial sistêmica, com anéis de KF ausentes e irmão com DW com genotipagem p.M645R/p.A1135Qfs. A Tabela 10 apresenta os exames iniciais da paciente. Exame ultrassonográfico de abdômen se encontrava dentro dos limites da normalidade.

Após acompanhamento de seis anos, foram observadas discretas alterações das aminotransferases (menos de 1,5 vezes o limite superior da normalidade) e alterações da ecotextura hepática. Em razão desses achados foi realizada biópsia hepática e o sequenciamento do gene *ATP7B*.

Tabela 10. Exames iniciais da paciente RF_15

Exames	Resultados Iniciais	Resultados Alterados
ALT (xLSN)	1,0	1,4
AST (xLSN)	1,0	1,4
FALC (xLSN)	1,0	1,0
GGT (xLSN)	1,0	1,1
BT/BD (mg%)	0,7/0,2	0,7/0,2
Fator antinúcleo/anti-LKM1/	-/-	-/-
Antimitocôndria/antimúsculo liso	-/-	-/-
Hepatites A/B/C	IgG VHA +	IgG VHA +
Ceruloplasmina (20-50 mg/dL)	4,0	3,0
Cobre sérico (70-160 µg%)	10	8
Cobre livre (<10 µg/dL)*	-2,6	-1,45
Cobre Urinário (< 80 µg/24h)	< 80	< 80
Teste DPA (µg/24h)	NR	662
Escore	0	4

ALT alanina aminotransferase; AST Aspartato aminotransferase; FALC fosfatase alcalina; GGT gamaglutamil transpeptidase; xLNS vezes limite superior da normalidade; pontuação do sistema de escore ≥4: muito provável; 3: provável, investigar mais; 0-2: improvável, NR não realizado; *cobre livre = cobre total (µg%) – 3,15 x ceruloplasmina (mg%)

O resultado da biopsia hepática apresentou esteatohepatite (alcoólica ou não alcoólica), com as seguintes características: fibrose perissinusoidal leve (e focalmente moderada) e expansão fibrosa portal discreta; esteatose macro e microgoticular grau 2 (34 a 66% dos hepatócitos); balonização hepatocitária leve (grau 1); inflamação lobular mista discreta (grau 1); glicogenação nuclear em vários hepatócitos; infiltrado linfomononuclear leve (com extravazamento) e reação ductular discreta portais. A conclusão foi de que tais achados poderiam ser apenas acompanhantes da esteatohepatite ou, alternativamente, serem marcadores de outra etiologia. A detecção de cobre no hepatócito pela técnica da rodanina foi negativa.

O teste genético identificou as mutações p.M645R/p.A1135Qfs, iguais às do irmão e com isso, o escore de 4 (com o teste da DPA), foi para 8, desta forma o diagnóstico de DW foi estabelecido sem qualquer dúvida.

5.3.2.2.2. Caso de exclusão do diagnóstico de DW por sequenciamento no grupo de RF

Assim como o sequenciamento pode ser utilizado para confirmar o diagnóstico, também pode ser utilizado para exclusão do diagnóstico, como demonstrarei neste exemplo.

Paciente RF_01, sexo masculino, 32 anos, branco, natural de Caieiras (SP) e procedente de Francisco Morato (SP), assintomático, os pais não eram consanguíneos, sem comorbidades, com anéis de KF ausentes, com irmã homozigota para mutação p.D765N/p.D765N. A Tabela 11 apresenta todos os exames iniciais do paciente.

Não foram realizados exames de imagem, biópsia hepática, cuprúria basal e teste desafio de um grama de DPA. Foi solicitado o teste genético e foi detectada a mutação p.D765N em heterozigose simples.

O resultado do teste genético afastou completamente o DW e simplificou a propedêutica diagnóstica do paciente uma vez que não foi necessária a realização de outros exames complementares desnecessários.

Tabela 11. Exames iniciais do paciente RF_01

Exames	Resultados
ALT (xLSN)	1,0
AST (xLSN)	1,0
FALC (xLSN)	1,0
GGT (xLSN)	1,0
BT/BD (mg%)	0,7
Fator antinúcleo/anti-LKM1/	—/—
Antimitocôndria/antimúsculo liso	—/—
Hepatites A/B/C	Negativo
Ceruloplasmina (20-50 mg/dL)	18
Cobre sérico (70-160 µg/dL)	81
Cobre livre (<10 µg/dL)*	24,3
Escore	2

ALT alanina aminotransferase; AST Aspartato aminotransferase; FALC fosfatase alcalina; GGT gamaglutamil transpeptidase; xLNS vezes limite superior da normalidade; pontuação do sistema de escore ≥4: muito provável; 3: provável, investigar mais; 0-2: improvável, NR não realizado; *cobre livre = cobre total (µg%) – 3,15 x ceruloplasmina (mg%)

5.3.2.3 Hepatite crônica criptogênica

Foram encontrados dados de pesquisa de hepatites virais e autoanticorpos em 14 de 18 (77,8%), em quatro não foram encontrados os resultados de marcadores de hepatites virais e autoanticorpos. No paciente HC_01 detectou-se fator antinúcleo na titulação 1/320 e no paciente HC_07, fator antinúcleo na titulação 1/80.

O teste genético de pesquisa de mutações do gene *HFE* foi realizado nos pacientes HC_08 e HC_09, O paciente HC_08 apresentou ultrassonografia de abdômen com aumento da ecogenicidade hepática sugerindo doença de depósito/esteatose, com conteúdo férrico hepático normal a levemente aumentado pelo método de Rennes, com a ressalva de que a presença de esteatose poderia superestimar o conteúdo férrico por essa metodologia. Não foi detectada siderose e sim esteatose na biopsia hepática, embora o teste genético para *HFE* identificou duas mutações em heterozigose composta p.H63D/p.C282Y. O paciente HC_09 apresentou no exame histopatológico hepático o diagnóstico de hepatocarcinoma bem diferenciado grau 2 da classificação Edmonson e Steiner de padrão trabecular, com peliose focal, siderose grau II hepatócitos e células de Kupffer e rodanina positiva. O teste genético para *HFE* mostrou heterozigose simples para a mutação p.H63D.

Foram encontrados dados de ultrassom de abdômen em 14 de 18 (77,8%) pacientes em quatro pacientes não foram localizados os resultados. Hepatomegalia foi identificada em quatro de 14 (28,6%); alterações na ecotextura, esplenomegalia e esteatose foram encontradas em três de 14 (21,4%) cada; ascite e hepatopatia crônica em um de sete (7,7%) cada e quatro de 14 exames (28,6%) estavam dentro da normalidade. Foi realizado exame

tomográfico de abdômen em um de 18 (5,5%) com o achado de hepatomegalia. Os estudos de imagem encefálica, a tomografia de crânio e a ressonância magnética de encéfalo, foram realizados em três de 18 (16,7%) e quatro de 18 (22,2%) respectivamente. Só dois pacientes, HC_10 e HC_15, apresentaram alterações no exame de ressonância magnética de encéfalo, com os achados de encefalopatia, alteração metabólica relacionada a hepatopatia. Em todos os outros pacientes os exames estavam dentro dos limites da normalidade.

A biopsia hepática foi realizada em doze de 18 (66,7%) e a pesquisa de cobre pela rodanina em dez de 12 (83,3%), dos quais apenas três de 10 (30,0%) foram positivos; dois de 10 (20,0%) apresentaram siderose; em três de 10 (30,0%) foi detectada atividade de interface; esteatose macro e microgoticular foram encontradas em oito de 10 (80,0%); em um de 10 (10,0%) pacientes foi realizada quantificação de cobre no tecido com 499 µg/g tecido seco.

Foram detectadas nove mutações distintas, três homozigotos e seis em heterozigose composta e dois heterozigotos simples, não foram detectadas mutações em sete pacientes; cinco polimorfismos p.K952R (32,3%), c.3903+6 T>C (20,6%), p.A1140V (27,2%) e p.L456V (20,6%) e c.2866-13 G>C (5,9%); duas mutações sinônimas p.T991T(2,9%) e p.A1003A (5,9%). Na tabela 12 encontram-se descritas as mutações e suas frequências. Em oito pacientes o sequenciamento foi importante para o diagnóstico da DW.

Tabela 12. Mutações e frequências alélicas nos pacientes com hepatite crônica criptogênica

Mutação	Domínio	Alelos afetados	Frequência gênica (%)
p.A1135Qfs	ATP <i>loop</i>	11	30,56
p.M645R	Cu6/TM1	1	2,78
p.Q241X	Cu3	2	5,56
p.T1232P	ATP <i>bind</i>	1	2,78
p.L708P	TM2	1	2,78
p.E1173K	ATP <i>loop</i>	1	2,78
p.N41S	Cu1	1	2,78
p.921N	TM5	1	2,78
p.P1273L	ATP <i>hinge</i>	1	2,78
Sem mutação (16 alelos)			44,44
Total		20	100,00

TM transmembrana; Cu= sítio de ligação de cobre

5.3.2.3.1. Caso de diagnóstico de DW por sequenciamento no grupo de hepatite crônica criptogênica

O paciente HC_11, do sexo masculino, 40 anos, branco, natural do Rio de Janeiro (RJ), procedente de Fortaleza (CE), com pais não consanguíneos, assintomático, apresentou alteração de enzimas hepáticas em 2005. Na Tabela 13 estão registrados os exames iniciais do paciente. A pesquisa de anel de KF foi negativa. Os níveis de ceruloplasmina eram bem reduzidos e a cuprúria dentro da normalidade. O ultrassom de abdômen evidenciou esteatose hepática e discreta hepatomegalia e a ressonância magnética de encéfalo não mostrou anormalidade.

A biopsia hepática apresentou fibrose discreta, esteatose grau III e siderose nos hepatócitos grau II-III, com coloração de cobre pela técnica da rodanina negativa. A pesquisa das mutações p.C282Y e p.H63D para hemocromatose hereditária foi negativa.

Em razão da baixa cuprúria, da coloração negativa para rodanina, do baixo nível da ceruloplasmina e da sobrecarga de ferro, chegou-se a cogitar o

diagnóstico de aceruloplasminemia o que foi pesquisado com exames realizados fora do país que foram negativos. Paralelamente foi realizado o teste genético para DW, sendo detectadas as mutações p.M645R/p.A1135Qfs. Com esse resultado, o escore do paciente que era 2 (não foi feito o teste da DPA) foi para 6, definindo-se o diagnóstico de DW.

Tabela13. Exames iniciais do paciente HC_11

Exames	Resultados
ALT (xLSN)	1,6
AST (xLSN)	1,0
FALC (xLSN)	1,0
GGT (xLSN)	1,0
BT/BD (mg%)	0,48/0,14
Ferritina (30-400ng/mL)	945,80
Albumina (> 3,5g%)	4,8
TP/INR	92%/1,1
Ferro sérico (59-158µg/dL)	104,5
Saturação de Transferrina (%)	54,4
Hepatite aguda A/B/C	Anti-VHA total positivo
Fator antinúcleo/ anti-LKM1	—/—
Antimitocôndria/ antimúsculo liso	—/—
Ceruloplasmina (20-50 mg/dL)	3,0
Cobre sérico (70-160 µg/dL)	35,8
Cobre livre (<10 µg/dL)	26,35
Cobre Urinário (< 80 µg/24h)	< 80
Escore	2

ALT alanina aminotransferase; AST Aspartato aminotransferase; FALC fosfatase alcalina; GGT gamaglutamil transpeptidase; xLNS vezes limite superior da normalidade; pontuação do sistema de escore ≥4: muito provável; 3: provável, investigar mais; 0-2: improvável.

*cobre livre = cobre total (µg%) – 3,15 x ceruloplasmina (mg%)

5.3.2.3.2. Caso de exclusão do diagnóstico de DW por sequenciamento no grupo de HC

Paciente HC_07, sexo feminino, branca, natural e residente de São Paulo (SP), pais não consanguíneos, apresentou alterações de transaminases aos 14 anos, ALT 15,4 xLSN e AST 6,5 xLSN, com pesquisa negativa de anéis de KF, ultrassom de abdômen apresentou hepatomegalia. Tabela 14 apresenta os exames iniciais do paciente.

A biópsia hepática revelou hepatopatia crônica com discreta atividade de interface em fase de transformação nodular. Coloração de cobre pela técnica da rodanina negativa.

Tabela 14. Exames iniciais do paciente HC_07.

Exames	Resultados
ALT (xLSN)	15,9
AST (xLSN)	6,5
FALC (xLSN)	1,0
GGT (xLSN)	1,4
BT/BD (mg%)	0,69/0,23
Albumina (>3,5g%)	4,7
TP/INR	95%/1,1
Hepatite aguda A/B/C	-/-/-
Fator antinúcleo (pontilhado fino) /Anti-LKM1	1:160/-
Antimitocôndria/antimúsculo liso	-/-
Anti-SLA/LP	negativo
Ceruloplasmina (20-50 mg/dL)	12
Cobre sérico (70-160 µg/dL)	42
Cobre livre (<10 µg/dL) *	4,2
Cobre Urinário (>80 µg/24)	97
Teste DPA (µg/24h)	1098
Escore	2

ALT alanina aminotransferase; AST Aspartato aminotransferase; FALC fosfatase alcalina; GGT gamaglutamil transpeptidase; xLNS vezes limite superior da normalidade; pontuação do sistema de escore ≥4: muito provável; 3: provável, investigar mais; 0-2: improvável.

*cobre livre = cobre total (µg%) – 3,15 x ceruloplasmina (mg%)

Foi considerado o diagnóstico de DW, quando foi iniciado o tratamento com DPA na dose inicial de 250 a 500 mg/dia e aumentando-se 250 mg a cada sete dias, até atingir 1g/dia por um mês com efeito adverso depressão e labilidade emocional. Foi considerado piora clínica pelo uso de DPA e mudado o tratamento para trientina, na dose inicial de 500 mg/dia até ser atingida a dose de um grama que foi mantida por um ano sem efeitos adversos. As enzimas hepáticas não normalizaram, ALT 4,8 xLSN, AST 3,0 xLSN, GGT 1,0 xLSN e a fosfatase alcalina 1,0 xLSN e após um ano foi retirada a trientina. O teste genético para DW não detectou nenhuma mutação, somente polimorfismos em heterozigose simples p.L456V/0 e p.A1140V/0. A ausência de mutações associada e a falta de resposta clínica ao tratamento praticamente excluíram o diagnóstico de DW.

5.3.2.4 Insuficiência hepática aguda grave

Foram encontrados dados da pesquisa de hepatites virais e autoanticorpos em cinco de sete pacientes (71,4%). O paciente IHAG_4 exibiu anticorpo antimúsculo liso com titulação 1/160 padrão vascular e o paciente IHAG_5 apresentou anticorpo antimúsculo liso titulação 1/160 no padrão VGT (reação em vasos, glomérulos e fibrilas intracelulares das células epiteliais dos túbulos renais).

A relação fosfatase alcalina/bilirrubina foi realizada em quatro de sete (51,14%) pacientes com IHAG e em dois pacientes a relação foi menor que 2 e nos outros dois pacientes a relação foi de 13,86 e 3,66.

Foram realizados exames de ultrassonografia de abdômen, tomografia de crânio e ressonância magnética de encéfalo em dois de sete (28,5%) cada.

Os achados dos exames ultrassonográficos foram esplenomegalia e hepatopatia crônica em um de sete (14,28%) cada; os dois exames tomográficos de crânio e um exame de ressonância magnética de encéfalo estavam dentro dos limites da normalidade; um exame de ressonância magnética de encéfalo apresentou-se compatível com degeneração walleriana e pansinusopatia.

Na tabela 10 são apresentados os resultados dos exames anatomopatológicos dos explantes hepáticos dos pacientes com IHAG.

Tabela 15. Resultados anatomopatológicos dos explantes dos pacientes com IHAG.

Casos	Resultados dos exames anatomopatológicos dos explantes
IHAG_1	Necrose hepática panacinar, multiacinar; com marcada proliferação ductular e colestase acentuada; nódulos hepatocitários remanescentes.
IHAG_2	Colestase intracanalicular leve e esteatose micro e macrogoticular grau I.
IHAG_3	Necrose hepática submaciça, com envolvimento predominante do lobo esquerdo e formação de macronódulos regenerativos; número moderado de plasmócitos. Esteatose microgoticular difusa e bilirrubinostase intensa.
IHAG_4	Áreas de necrose confluyente, em ponte e, às vezes, panacinar; ductular exuberante. Aparência de estar fase cirrótica, com moderada inflamação linfomononuclear e participação de frequentes plasmócitos. - esteatose grau 1, principalmente microgoticular. Hepatite autoimune? Lesão tóxico-medicamentosa.
IHAG_5	Necrose confluyente e panacinar; cirrose hepática intensamente ativa (com plasmócitos variando de leve a moderada quantidade)
IHAG_6	Necrose hepática panacinar e multiacinar submaciça; não foram identificados marcadores etiológicos
IHAG_7	Necrose hepática maciça (panacinar) e difusa, drogas?

Foram detectadas seis mutações distintas e sete polimorfismos, um homozigoto, dois heterozigotos compostos, dois heterozigotos simples, dois sem mutação. Os polimorfismos detectados foram p.K952R (14,29%), c.3903+6 T>C (7,14%), p.A1140V (21,43%), p.L456V (14,29%), c.2866-13 G>C (14,29%),

c.1707+22 C>T (7,14%) e c.1707+57 C>T (7,14%). Na tabela 16 encontram-se as mutações e suas frequências. Em três pacientes o sequenciamento foi fundamental para o diagnóstico de DW.

Tabela 16. Mutações e frequências alélicas nos pacientes com insuficiência hepática aguda grave

Mutação	Domínio	Alelos afetados	Frequência gênica (%)
p.A1135Qfs	ATP <i>loop</i>	2	14,29
p.N41S	Cu1	1	7,14
p.H1069Q	ATP <i>loop</i>	1	7,14
p.N1270S	ATP <i>hinge</i>	1	7,14
p.D765N	TM4	2	14,29
p.V536A	Cu5	1	7,14
Sem Mutações (6 alelos)			42,86
Total		08	100,00

TM transmembrana; CU sitio de ligação de cobre

5.3.2.4.1. Caso de diagnóstico de DW por sequenciamento no grupo de IHAG

Paciente IHAG_4, sexo feminino, parda, natural e residente de São Paulo (SP), foi internada no serviço do HC em 06/05/2011, aos 17 anos, com quadro de insuficiência hepática aguda grave, com pais nãoconsanguíneos. Há relato de irmã gêmea univitelina submetida a transplante hepático na Beneficência Portuguesa por insuficiência hepática aguda grave (óbito). Nessa ocasião chegou a ser avaliada e não se constatou doença hepática (*sic*).

A Tabela 17 mostra os exames iniciais da paciente. Foram realizados exames de imagem: ultrassom de abdômen esplenomegalia homogênea; ressonância magnética de encéfalo dentro dos limites da normalidade.

Não foram realizados os exames de pesquisa dos anéis de KF, cuprúria basal e teste desafio da DPA devido o quadro de insuficiência hepática aguda grave.

O produto de explante hepático exibiu “hepatite aguda grave com áreas de necrose confluyente, em ponte e, às vezes, panacinar em paciente com diagnóstico clínico de hepatite fulminante. A reação ductular é exuberante e há bilirrubinostase acentuada. A provável doença de base associada tem aparência de estar em fase cirrótica, com moderada inflamação linfomononuclear e participação de frequentes plasmócitos. Observa-se esteatose grau 1, principalmente microgoticular. Sugere-se investigar possibilidade de hepatite autoimune, lesão tóxico-medicamentosa, entre outros. A coloração do cobre hepático pela técnica da rodanina foi negativa”.

Tabela 17. Exames iniciais do paciente IHAG_4

Exames	Resultados
ALT (31 UI/L)	20
AST (31 UI/L)	118
FALC (104 UI/L)	24
GGT (36 UI/L)	68
BT/BD (mg%)	40,6/39,4
Relação FALC/Bilirrubinas (<2,0)	0,4
Albumina (>3,5g%)	2,2
TP/INR	31%/2,4
Fator V (70-150%)	36%
Hepatite aguda A/B/C	Negativos
FAN/Anti-LKM1/	—/—
Antimitocôndria	—
Ceruloplasmina (20-50 mg/dL)	14
Cobre sérico (70-160 µg%)	205
Cobre livre (< 10 µg%)*	160,9
Escore	1

ALT alanina aminotransferase; AST Aspartato aminotransferase; FALC fosfatase alcalina; GGT gamaglutamil transpeptidase; xLNS vezes limite superior da normalidade; pontuação do sistema de escore ≥4: muito provável; 3: provável, investigar mais; 0-2: improvável.

*cobre livre = cobre total (µg%) – 3,15 x ceruloplasmina (mg%)

Apesar do resultado do exame anatomopatológico sugerir hepatite

autoimune, havia dados muito importantes que exigiam a investigação de DW, como os níveis séricos discretamente reduzidos de ceruloplasmina, a história familiar de insuficiência hepática aguda grave, os níveis baixos de fosfatase alcalina e os níveis de cobre livre muito elevados. Dessa forma foi realizado o teste genético e foram detectadas mutações em dois alelos p.H1069Q/p.N1270S, com isso o escore do paciente que era 1, sem diagnóstico de DW, foi para 5 sendo possível o diagnóstico de DW. Foi realizado também a genotipagem do irmão e foram detectadas as mesmas mutações p.H1069Q/p.N1270S, com início precoce do tratamento. Os pais não foram genotipados.

5.3.2.4.2. Caso de não confirmação diagnóstica de DW por sequenciamento no grupo de IHAG

Paciente IHAG_3, sexo feminino, raça amarela, natural de e residente em São Paulo (SP), foi internada no Serviço de Transplante e Cirurgia do Fígado do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 16/05/2009, com 22 anos de idade, com quadro de insuficiência hepática aguda grave, com pais não consanguíneos e sem história familiar de DW. A Tabela 18 apresenta resultados de exames relevantes da paciente IHAG_3.

Não foram realizados os exames de pesquisa dos anéis de KF, cuprúria basal e teste desafio da DPA e exames de imagem devido o quadro de insuficiência hepática aguda grave.

O produto de explante hepático exibiu: necrose hepática submaciça, com envolvimento predominante do lobo esquerdo e formação de macronódulos

regenerativos; com número moderado de plasmócitos. Há esteatose microgoticular difusa e bilirrubinostase intensa. Questionou-se o diagnóstico de hepatite autoimune.

Como diagnóstico não foi definido, foi realizado o sequenciamento do gene *ATP7B* e identificada a mutação p.A1135Qfs em heterozigose simples e também foram detectados polimorfismos tanto em homozigose, p.A1140V e c.2866-13C>G, quanto em heterozigose simples, p.L456V e p.K952R. Portanto, não foi possível definir, de forma definitiva, o diagnóstico de DW e tampouco de hepatite autoimune. A mutação mais comum em orientais, p.R778L, não foi detectada.

Tabela 18. Todos os exames do paciente IHAG_3

Exames	Resultados
ALT (xLSN)	446
AST (xLSN)	481
FALC (xLSN)	303
GGT (xLSN)	194
BT/BD (mg%)	21,7/19,0
Relação FALC/Bilirrubinas (<2,0)	13,9
Albumina (>3,5g%)	2,5
TP/INR	41%/1,8
Fator V (70-150%)	18%
Hepatite aguda A/B/C	Negativos
FAN/Anti-LKM1/antimitocôndria	Negativos
Ceruloplasmina (20-50 mg/dL)	25
Cobre sérico (70-160 µg/dL)	76
Cobre livre (<10 µg/dL) *	-2,75
Escore	0

ALT alanina aminotransferase; AST Aspartato aminotransferase; FALC fosfatase alcalina; GGT gamaglutamil transpeptidase; xLNS vezes limite superior da normalidade; pontuação do sistema de escore ≥4: muito provável; 3: provável, investigar mais; 0-2: improvável.

*cobre livre = cobre total (µg%) – 3,15 x ceruloplasmina (mg%)

Na tabela 19 estão apresentados os exames laboratoriais realizados em todos os grupos. Na tabela 20 encontram-se os exames com os parâmetros diagnósticos dos diversos grupos. Os exames laboratoriais com o escore diagnóstico individualizado de cada paciente estão nos anexo 8.5, anexo 8.8, anexo 8.11 e anexo 8.14.

Tabela 19. Exames laboratoriais realizados nos grupos estudados

Exames	DW (N=35) (Média ± DP)	RF (N=20) (Média ± DP)	HC (N=18) (Média ± DP)	IHAG (N=7) (Média ± DP)
ALT xLSN	1,90 ± 2,14	2,4 ± 1,80	3,60 ± 3,73	6,15 ± 6,00
AST xLSN	1,90 ± 1,16	2,5 ± 3,8	2,45 ± 2,00	7,02 ± 5,69
FA xLSN	1,30 ± 0,58	1,30 ± 0,72	1,30 ± 0,70	1,42 ± 0,66
GGT xLSN	2,00 ± 2,02	1,40 ± 0,60	1,97 ± 1,28	6,08 ± 7,89
Bilirrubina total (mg%)	1,07 ± 0,91	0,50 ± 0,23	1,43 ± 1,48	34,7 ± 8,79
Albuminas g/dL	3,95 ± 0,77	3,90 ± 0,94	4,06 ± 1,05	2,4 ± 0,18
INR	1,31 ± 0,35	1,10 ± 0,12	1,70 ± 1,21	4,54 ± 3,62
Globulinas (xLSN)	0,87 ± 0,16	1,15 ± 0,91	1,70 ± 1,00	0,97 ± 0,20
γglobulinas xLSN	1,28 ± 0,41	1,30 ± 0,29	1,70 ± 0,76	1,60 [‡]
Cobre sérico (μg/dL)	34,2 ± 21,83	26,70±32,80	39,64 ± 23,60	104 ± 56,64
Reticulócitos %	N.A	N.A	N.A	5,90 [‡]
DHL U/L	N.A	N.A	N.A	1331±608,56
Hb g/dL	N.A	N.A	N.A	9,81 ± 2,30
Ht %	N.A	N.A	N.A	29,64 ± 6,73

ALT alanina aminotransferase; AST Aspartato aminotransferase; FA fosfatase alcalina; GGT gamaglutamil transpeptidase; xLNS vezes limite superior da normalidade; DHL: desidrogenase láctica; Hb hemoglobina; Ht hematócrito; RF rastreamento familiar; HC hepatite criptogênica; IHAG insuficiência hepática aguda grave; SNC sistema nervoso central inclui as formas neuropsiquiátricas; N.A não se aplica; ‡ só foi realizado o exame em um paciente.

Tabela 20. Parâmetros diagnósticos mais importantes dos grupos estudados.

Parâmetros diagnósticos	DW (N=35) (Média ± DP)	RF (N=20) (Média ± DP)	HC (N=18) (Média ± DP)	IHAG (N=7) (Média ± DP)
Anéis de KF (%)	21/35 (60,0)	1/20 (5,0)	1/18 (5,5)	N.A
Ceruloplasmina (<20 mg/dL) **	4,20±3,30	6,80±8,16	10,12±6,53	16,2±6,96
Cobre urinário (>100µg/dia) **	28/35 (80,0) 552,40 ± 766,93	10/20 (50,00) 120,80±221,73	16/18 (88,9) 97,60±201,50	N.A
Teste da DPA*** (µg/24h)	2/35 (5,71) 2908±1438,25	3/20 (15,0) 425,70±491,33	6/18 (33,3) 819,50±477,54	N.A
Mutações no gene <i>ATP7B</i> ‡				
2 alelos (%)	66/70 (94,2)	34/40 (85,0)	18/36 (50,0)	6/14 (42,85)
1 alelo (%)	2/70 (2,9)	3/40 (7,5)	2/36 (5,6)	2/14 (14,30)
0 alelo (%)	2/70 (2,9)	3/40 (7,5)	16/36 (44,4)	6/14 (42,85)

RF rastreamento familiar; HC hepatite críptica; IHAG insuficiência hepática aguda grave; SNC sistema nervoso central inclui as formas neuropsiquiátricas; **Os testes laboratoriais são mostrados em média ± desvio padrão; *** >1600µg/dia em crianças e >1400µg/dia em adultos; ‡ cálculo realizado com número de total de alelos de cada grupo; N.A não se aplica.

5.4. Diversidade genotípica e fenotípica em uma mesma família

Os pacientes DW_27, sexo masculino, 20 anos, e RF_7, sexo feminino, 17 anos, pardos, naturais de e residentes em São Paulo (SP), assintomáticos, com pais consanguíneos de primeiro grau, começaram a ter seguimento em nosso Serviço com suspeita de DW devido a uma irmã, DW_4, ter sido submetida a transplante hepático por insuficiência hepática aguda grave, em outro Centro, com o produto do explante sugerindo DW. A Tabela 21 apresenta os exames iniciais dos dois pacientes.

Tabela 21. Exames iniciais dos pacientes RF_7* e DW_27

Exames	RF_7	DW_27
ALT (xLSN)	3,9	3,7
AST (xLSN)	1,9	1,9
FALC (xLSN)	1,0	1,0
GGT (xLSN)	3,0	1,6
BT/BD (mg%)	0,34/0,10	0,95/0,22
Fator antinúcleo/anti-LKM1	–/–	–/–
Antimitocôndria/antimúsculo liso	–/–	–/–
Hepatites A/B/C	Negativos	Negativos
Ceruloplasmina (20-50 mg/dL)	4	2
Cobre sérico (70-160 µg%)	10,3	16,0
Cobre livre (<10 µg/dL) **	-2,3***	9,7
Cobre Urinário (<80 µg/24h)	< 80	970
Teste DPA (µg/24h)	NA	1891
Escore	2	4

* Exames iniciais indisponíveis;

ALT alanina aminotransferase; AST Aspartato aminotransferase; FALC fosfatase alcalina; GGT gamaglutamil transpeptidase; xLNS vezes limite superior da normalidade; pontuação do sistema de escore ≥4: muito provável; 3: provável, investigar mais; 0-2: improvável; NR: não realizado

**cobre livre = cobre total (µg%) – 3,15 x ceruloplasmina (mg%)

*** paciente já chegou em tratamento

Foram realizados exames ultrassonográficos de abdômen nos dois pacientes; com sinais de hepatite crônica e leve aumento de ecogenicidade do parênquima e sem sinais de hipertensão portal na paciente RF_7. Já o paciente DW_27 apresentou fígado com leve aumento da ecogenicidade do parênquima, ausência de sinais de hipertensão portal e ausência de nódulos. A pesquisa de anéis de KF foi negativa em ambos os pacientes e não foi realizada biopsia hepática.

A paciente RF_7 apresentava como comorbidades; dislipidemia, diabetes tipo 1 e hipotireoidismo com anticorpos antitireoperoxidase e antitireoglobulina negativos. O paciente DW_27 também apresenta dislipidemia.

Foi solicitado o teste genético para os dois pacientes sendo detectada o genótipo homozigoto p.A1135Qfs/p.A1135Qfs na paciente RF_7, e surpreendentemente o genótipo heterozigoto composto p.A1135Qfs/p.M645R no paciente DW_27, confirmando-se, dessa forma, o diagnóstico de DW nos dois pacientes.

Foram convocadas também as duas outras filhas do casal, RF_16, 24 anos, e DW_4 (paciente que foi transplantada por insuficiência hepática aguda grave por DW) ambas do sexo feminino e pardas para realização dos testes genéticos e detectadas os genótipos p.M645R/0 e p.A1135Qfs/p.A1135Qfs respectivamente. A paciente RF_16 tinha um escore de 2 pontos devido a cuprúria basal de 104 µg/24h (aumento de 1-2 vezes o limite superior da normalidade e um alelo com mutação. Os níveis de ceruloplasmina foram 35 mg/dL, com discreto aumento da gamaglutamil transpeptidase (2,1 vezes o limite superior da normalidade).

Em razão dos resultados de dois genótipos de doença na família, os pais foram convocados para realização do teste genético, sendo detectados os genótipos p.A1135Qfs/0 na mãe e p.A1135Qfs/p.M645R no pai, paciente RF_18, pardo, 48 anos, assintomático. Os resultados laboratoriais desse paciente encontram-se na Tabela 22.

Tabela 22. Exames iniciais do paciente RF_18

Exames	Resultados
ALT (xLSN)	1,0
AST (xLSN)	1,0
FALC (xLSN)	1,0
Gama GT (xLSN)	1,0
BT/BD (mg%)	0,3/0,1
Hepatites A/B/C	Negativos
Ceruloplasmina (20-50 mg/dL)	3,0
Cobre sérico (70-160 µg/dL)	17
Cobre livre (< 10 µg/dL)*	7,55
Cobre Urinário (< 35 µg/24h)	114,69
Teste DPA (µg/24h)	2035,65
Quantificação de cobre no tecido (µg/ g de tecido seco)	2949
Escore diagnóstico*	10

ALT alanina aminotransferase; AST Aspartato aminotransferase; FALC fosfatase alcalina; GGT gamaglutamil transpeptidase; xLNS vezes limite superior da normalidade; pontuação do sistema de escore ≥4: muito provável; 3: provável, investigar mais; 0-2: improvável. * já estão incluídos os 4 pontos adquiridos pela detecção de 2 mutações, 6 pontos dos achados laboratoriais e 4 pontos do sequenciamento.

*cobre livre = cobre total (µg%) – 3,15 x ceruloplasmina (mg%)

Foram realizados exames de ultrassom de abdômen que mostrou discretos sinais de hepatopatia com esteatose hepática e ausência de hipertensão portal. A pesquisa de anéis de KF foi negativa.

A biopsia hepática revelou hepatite crônica discretamente ativa com esteatose macro e microgoticular grau 1, anisonucleose e balonização hepatocelular sem corpúsculos de Mallory. O estadiamento de acordo com a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (Gayotto et al. 2000) foi o seguinte: alterações arquiteturais: 1 (expansão fibrosa portal); infiltrado inflamatório portal/septal: 2 (aumento moderado dos linfócitos portais); atividade periportal/perisseptal: 2 (necrose em saca-bocados discreta); atividade

parenquimatosa: 2 (necrose focal de hepatócitos em numerosos sítios); outros marcadores: siderose moderada em hepatócitos; a pesquisa de cobre no tecido pela técnica da rodanina foi negativa.

Após todos os exames clínicos e laboratoriais o paciente foi diagnosticado com DW e iniciou o tratamento.

O rastreamento dos irmãos do paciente RF_18 foi então obrigatório. Referiu a existência de irmão casado com uma prima de primeiro grau com quem tinha três filhos. A família inteira foi convocada, porém o pai não compareceu.

Foram solicitados os exames laboratoriais de enzimas hepáticas, ceruloplasmina, cobre sérico e teste genético para DW.

A mãe de 44 anos, a filha de 10 anos e o filho de 11 anos, pardos não apresentaram alterações nos exames laboratoriais. Foram detectadas mutações em heterozigose simples p.M645R na mãe e na filha; no filho de 11 anos não foi detectada qualquer mutação.

No filho de 18 anos, RF_19 foi detectada a mutação p.M645R em homozigose. Trata-se de indivíduo do sexo masculino, branco, assintomático, natural de e residente em São Paulo (SP). A Tabela 23 mostra os exames iniciais do paciente RF_19. A pesquisa de anéis de KF foi negativa.

O produto da biopsia hepática apresentou infiltrado inflamatório mononuclear associado a expansão fibrosa portal discreta, não caracterizando quadro de hepatite crônica. A pesquisa histoquímica de cobre no tecido pela técnica de rodanina negativa.

Tabela 23. Exames iniciais do paciente RF_19.

Exames	Resultados
ALT (xLSN)	1,0
AST (xLSN)	1,0
FALC (xLSN)	1,0
GGT (xLSN)	1,0
BT/BD (mg%)	0,2/0,1
Hepatites A/B/C	Negativo
Ceruloplasmina (20-50 mg/dL)	3,0
Cobre sérico (70-160 µg/dL)	11
Cobre livre (<10 µg%)***	1,5
Cobre Urinário (< 35 µg/24h) *	
Teste DPA (µg/24h) *	
Quantificação de cobre no tecido (µg/g de tecido seco) *	
Escore**	7

ALT alanina aminotransferase; AST Aspartato aminotransferase; FALC fosfatase alcalina; GGT gamaglutamil transpeptidase; xLNS vezes limite superior da normalidade; pontuação do sistema de escore ≥4: muito provável; 3: provável, investigar mais; 0-2: improvável.

* Exame ainda em análise no Instituto de Química da Universidade de São Paulo

** Estão inclusos os 4 pontos adquiridos por ter sido detectada 2 mutações, 3 pontos dos achados laboratoriais e 4 pontos do sequenciamento

****cobre livre = cobre total (µg%) – 3,15 x ceruloplasmina (mg%)

6. Discussão

O diagnóstico precoce, em fase assintomática, é a melhor oportunidade para iniciar um tratamento eficaz na DW. Ao longo de seis décadas foram utilizados parâmetros diagnósticos propostos por Wilson (1912), Scheinberg & Sternlieb (1984), Ferenci et al. (2003) e Roberts & Schilsky (2008). Ferenci et al. (2003) e a Sociedade Europeia para o Estudo do Fígado (2012) sugeriram sistema de escore para o diagnóstico de DW, no qual não considera a hepatopatia como variável de pontuação, contemplando somente os casos neurológicos e hematológicos. Não há forma hepática típica de DW, porém a identificação de doença hepática não colestática com presença de anéis de KF é altamente sugestiva do diagnóstico (se não diagnóstica) de DW (Araujo 2012). Da mesma forma, o relato da existência de irmão com DW não está entre os critérios diagnósticos propostos, mas quem não trataria um familiar identificado no rastreamento familiar com ceruloplasmina baixa e alterações de enzimas hepáticas como DW, mesmo não tendo sido atingido o escore diagnóstico proposto internacionalmente?

Walshe (2005) reportou indivíduos sem DW com sintomas neurológicos e baixos níveis de ceruloplasmina, sem anéis de KF, sendo possível o diagnóstico de aceruloplasminemia. Contudo, para o sistema de escore de Ferenci et al. (2003), seriam dados suficientes para sugerir o diagnóstico de DW, pois não há exigência do padrão neurológico.

Da mesma forma, a pontuação do teste desafio da DPA pode fornecer resultados equivocados, como pode ser comprovado o caso HC_18 (vide anexo 8.11), que apesar da pontuação 4 ser atingida, com diagnóstico muito provável, o sequenciamento do gene *ATP7B* revelou apenas heterozigose simples. O

conjunto de dados clínicos, incluindo os achados da biópsia hepática, a evolução clínica favorável de 10 anos sem tratamento e a normalização bioquímica com a abordagem terapêutica para esteatohepatite não alcoólica sugere fortemente que o paciente não tenha DW. Outro paciente, HC_07 (vide seção resultados), da mesma forma, com diagnóstico provável em razão de escore 3, não revelou nenhuma mutação. Assim, há casos em que a decisão de tratar ou deixar de tratar requer a realização de todos exames disponíveis e nesse contexto o sequenciamento é arma imprescindível para se tomar a conduta com grande chance de acerto.

Por outro lado, o fato de ser heterozigoto simples ou mesmo não ter qualquer mutação, não exclui o diagnóstico haja vista o encontro desse perfil genotípico em até 10% dos pacientes com diagnóstico inequívoco de DW. Por isso a utilização de outras informações pode auxiliar o diagnóstico. Em nosso serviço, outros achados também foram considerados importantes e vêm sendo utilizados como parâmetros diagnósticos, como por exemplo, o achado de hepatopatia de causa indeterminada associada a níveis reduzidos séricos de ceruloplasmina e história familiar de DW, ou a presença de hepatopatia de origem desconhecida e a presença de anéis de KF com alteração nos exames do metabolismo do cobre com resposta terapêutica favorável ao uso de quelantes ou de sais zinco (Araujo 2012).

Para melhor sistematizar o diagnóstico da DW, foram utilizados os critérios do sistema de escore em todos os grupos suspeitos de DW pré e pós-sequenciamento. Nos grupos RF e HC, 16 de 20 (80,0%) e 14 de 18 pacientes (77,7%), respectivamente, e todos os pacientes de IHAG não apresentavam “escore 4” diagnóstico da doença. Após o sequenciamento 14 pacientes de RF,

8 pacientes de HC e 3 pacientes de IHAG apresentaram escore de no mínimo quatro pontos no sistema de escore e todos os pacientes foram diagnosticados como DW, independentemente do teste desafio com 1,0 grama de DPA.

Como se pode observar nos exemplos apresentados, os resultados dos exames podem exibir grande variabilidade entres os grupos; um desses exames é a dosagem de ceruloplasmina que variou da normalidade, 35 mg/dL no paciente RF_12 heterozigoto simples a 2 mg/dL em diversos pacientes. Contudo, nos pacientes que fecharam o diagnóstico definitivo de DW e foram tratados como tal o nível médio de ceruloplasmina foi de $4,2 \pm 3,3$ nos pacientes de DW, $4,6 \pm 3,8$ no RF, $5,4 \pm 3,6$ no HC e $10,3 \pm 3,5$ no IHAG.

A dosagem de ceruloplasmina foi realizada em 94,88% dos pacientes. A ceruloplasmina é o maior transportador de cobre no sangue. É proteína de fase aguda que transporta seis átomos de cobre. Em pacientes com DW o nível de ceruloplasmina é geralmente inferior a 10 mg/dL, embora a concentração sérica da ceruloplasmina possa estar elevada em processos inflamatórios agudos (Roberts & Schilsky 2008), como no caso do paciente RF_12, que apresentava cirrose hepática descompensada, e evoluiu para insuficiência hepática aguda grave, quando, então, foi submetido a transplante hepático. Por essa razão, em casos de insuficiência hepática aguda grave o nível de ceruloplasmina tem baixa acurácia diagnóstica devido à falência hepática (Korman et al. 2008) e atividade inflamatória. Níveis baixos podem ser mal interpretados sugerindo DW e níveis mais altos como não sugerindo DW.

Steindl et al. (1997) observaram que 12 de 55 dos pacientes com DW que apresentavam manifestações hepáticas sem anéis de KF apresentavam níveis de ceruloplasmina normais. Gow et al. (2000) observaram 22 pacientes com

manifestações hepáticas e seis deles apresentavam ceruloplasmina com valores superiores a 20 mg/dL. Se por um lado em pacientes com manifestações hepáticas e níveis normais de ceruloplasmina não se exclui o diagnóstico de DW, por outro lado também não se pode dar o diagnóstico de DW somente com níveis baixos de ceruloplasmina. Aproximadamente 20% dos heterozigotos podem apresentar níveis reduzidos da proteína sem ter a doença (Scheinberg & Sternlieb, 1984; Brewer & Yuzbasiyan-Gurkan, 1992).

Anéis de KF foram detectados em 58,33% dos pacientes com DW e 16 de 17 pacientes (94,11%) que apresentavam quadro neurológico, exibiam também anéis de KF. Ao contrário, em somente cinco de 36 (16,12%) dos pacientes com quadro hepático foi observado esse achado. Não foram observados anéis de KF em pacientes assintomáticos. Dessa forma o sequenciamento do gene *ATP7B* adquire valor importante nessa situação, pois na forma hepática parâmetros diagnósticos importantes estão ausentes.

Araujo (2012) reporta presença de anéis KF em 78,3% dos indivíduos com DW, em 98,9% dos pacientes com quadro neurológico e em 95% daqueles com quadro neuropsiquiátrico. Os anéis de KF não foram encontrados em dois pacientes com quadro neurológico. Machado et al. (2006) observaram a presença de anéis de KF em todos os pacientes com quadro neurológico. Segundo Deguti (2004), 75% dos pacientes em que foi feito o sequenciamento do gene *ATP7B* apresentavam anéis de KF e essa porcentagem subiu para 84,8% quando se avaliou somente os casos índices dos pacientes com quadro hepático.

Scheinberg e Sternlieb (1984) sugeriram a associação de quadro neurológico com anéis de KF. O diagnóstico deveria ser refutado em casos de

pacientes com quadro neurológico sem anéis de KF. Porém, Steindl et al., (1997), Gow et al., (2000); Bruha et al., (2010) e Mehta et al., (2010) reportaram a não obrigatoriedade absoluta dessa associação. Os anéis de KF estão ausentes em 44% a 63% dos pacientes com quadro hepático (Steindl et al. 1997, Gow et al. 2000, Emre et al. 2001, Medici et al. 2001, Merle et al. 2007). Steindl et al. (1997) não observaram esse achado em 53% dos pacientes com manifestações hepáticas e em 10% dos pacientes neurológicos. Acreditamos que a detecção dos anéis de KF seja patognomônica do diagnóstico de DW na presença de níveis baixos de ceruloplasmina, uma vez que as situações clínicas em que é descrita a sua presença, que são as colestases, são encontrados valores normais altos e até valores elevados de ceruloplasmina.

Outro exame que apresentou grande variabilidade entre os grupos foi a cuprúria basal e o teste desafio com um grama de DPA. Dos pacientes com DW, sete apresentavam excreção inferior a 100 µg/24 horas. Dos pacientes em RF, dos 10 que fizeram o teste, somente dois apresentavam excreção superior a 100 µg/24 horas, somente o paciente RF_13, com 744 µg/24 horas, teve confirmado o diagnóstico de DW. No grupo dos pacientes com HC, 15 fizeram o teste e dois apresentaram excreção superior a 100 µg/24 horas somente no paciente HC_12, 134 µg/24h foi confirmado o diagnóstico. O teste desafio foi realizado em dois pacientes de DW e RF e em cinco pacientes de HC. Não houve aumento de mais cinco vezes o limite superior da normalidade no teste desafio em três pacientes. Não foram realizados testes de cuprúria basal e teste desafio com DPA nos pacientes com IHAG. Valores do desafio de cobre acima de 1000 µg/24 horas foram encontrados em todos os pacientes de DW, em três pacientes de HC, dos quais apenas um paciente foi diagnosticado de fato com DW, no grupo de RF

em nenhum paciente foi observado valores acima de 1000 µg/24 horas para o teste desafio de 1g de DPA, o valor mais próximo foi o do paciente RF_18 no valor de 993 µg/24 horas, que teve o diagnóstico de DW confirmado pelo sequenciamento do gene *ATP7B*.

Valores de cuprúria basal acima de 100 µg/24 horas são indicativos da doença (Mark et al. 2008) e valores abaixo de 40 µg/24 horas são encontrados em controles não wilsonianos (Gow et al. 2000). Em pacientes com excreção normal, mas com aumento maior ou igual a cinco vezes o limite superior da normalidade, dois pontos são adicionados ao escore. Na literatura há vários dados controversos sobre a interpretação dos resultados da excreção urinária do cobre. Nicastro et al. (2012) sugerem valores de 40 µg/24 horas e 1575 µg/24 horas para teste basal e teste desafio, respectivamente em crianças e sugerem que o teste desafio tenha pouco valor para o diagnóstico de DW. Foruny et al. (2008) sugerem que o valor discriminante seja de 1057 µg/24 horas para o diagnóstico de DW em adultos, com sensibilidade e especificidade de 100% e 82,3%, respectivamente. Vieira et al. (2012) realizaram teste de cuprúria basal e desafio com pais de pacientes de DW, sem diagnóstico de DW e observaram o aumento de cinco vezes o limite normal basal em 84% dos parentes de DW, em alguns casos superiores a 1000 µg/24 horas e sugeriram que deveriam ser adotados os valores acima de 1400 µg/24 horas e 1588 µg/24 horas para adultos e crianças no sistema de escore, respectivamente, em vez do aumento de cinco vezes o valor da normalidade, pois a pontuação é alta para um parâmetro com pouca discriminação.

Os principais achados histopatológicos foram esteatose macro e microgoticular, glicogenação nuclear e atividade de interface e cirrose hepática.

Nos pacientes do grupo IHAG, em somente um paciente, foram encontrados achados sugestivos para DW, em cinco pacientes não foram achados marcadores etiológicos, e em uma paciente os achados foram altamente sugestivos de hepatite autoimune como foi descrito no item 5.3.2.4.1. Nesse caso em particular, a identificação da heterozigose composta foi de extrema importância, pois em paciente com insuficiência hepática aguda grave, sem história familiar de consanguinidade, com ceruloplasmina de 14 mg% e com alterações histológicas no explante bem sugestivas de hepatite autoimune pensar em DW não seria o mais plausível. Contudo, alguns dados clínicos como o aparecimento de insuficiência hepática aguda grave em adolescente do sexo feminino, os níveis de aminotransferases pouco elevados em comparação com os de bilirrubinas muito elevados, os níveis normais baixos de fosfatase alcalina, a história familiar de outro caso de insuficiência hepática aguda grave em adolescente gêmea univitelina, os níveis de cobre livre muito elevados foram muito fortes para não contentarmos com o diagnóstico de hepatite autoimune. O interessante é que, nenhuma das informações das quais lançamos mão para cogitar o diagnóstico de DW está pontuada nos critérios diagnósticos internacionais da enfermidade, o que mostra a insuficiência de parâmetros nesse sistema de score, particularmente para as formas hepáticas e insuficiência hepática aguda grave em especial. Nessas formas fulminantes, alguns parâmetros podem ser inviáveis ou difíceis de serem obtidos como a pesquisa de anéis de KF e a realização do teste desafio da DPA.

A possibilidade da existência de duas enfermidades simultaneamente, hepatite autoimune e DW, embora possível e raramente descrita na literatura, não pode ser feita com as informações que dispomos da paciente IHAG_4 (vide

seção resultados). Milkiewicz et al., (2000); Yener et al., (2004); Santos et al. (2005) reportaram a associação entre DW e hepatite autoimune. Araujo (2012) reportou dois casos de pacientes de nosso serviço que apresentaram reatividade de autoanticorpos para hepatite autoimune, um com anticorpo antimúsculo liso 1/320 com biopsia hepática sugestiva e outro paciente somente com anticorpo antimúsculo liso 1/160. A reatividade dos autoanticorpos hepáticos não é patognomônica dos processos autoimunes. A evolução satisfatória dos casos, sem tratamento específico para hepatite autoimune, corrobora o diagnóstico único da DW.

A positividade da coloração de rodanina nos grupos estudados variou de 10% a 30% entre os grupos. Pilloni et al. (1998) avaliou essa técnica para detecção de cobre em 76 pacientes com DW da Ilha da Sardenha divididos em 3 grupos, grupo A pacientes com esteatose e fibrose leve; grupo B hepatite crônica com necrose em sacabocados e grupo C hepatite crônica com cirrose hepática. Obtiveram valores médios de 594, 838 e 696 por grama de tecido seco, enquanto a técnica de detecção pela rodanina apresentou positividade em 13,2%, 26,7%, 36,6% nos grupos A, B e C respectivamente. A partir desses resultados sugeriram que a não detecção de cobre pela coloração de rodanina não excluía o diagnóstico de DW e postularam que a coloração de cobre no tecido é obsoleta, pois é muito pouco efetiva para realização do diagnóstico. Os nossos resultados não foram muito animadores em defesa dessa técnica.

A quantificação de cobre no tecido foi realizada em dois pacientes, HC_13 e RF_19, tendo sido obtido os valores 499 e 2949 $\mu\text{g/g}$ tecido seco, respectivamente. A quantificação de cobre hepático com valores superiores a 250 $\mu\text{g/g}$ tecido seco é um dos melhores parâmetros bioquímicos para o

diagnóstico de DW, embora esses valores sejam contestados na literatura, devido ao fato de ter sido baseado na análise de 114 casos de DW. Valores maiores que ou iguais a 70 µg/g tecido seco foram sugeridos por Ferenci et al. (2005) para aumentar drasticamente a sensibilidade, porém, com perda de especificidade. Em outro estudo, Merle et al. (2007) demonstraram que todos os pacientes da casuística apresentavam ao menos 95 µg/g tecido seco e apenas 8% tinham valores maiores que ou iguais a 250 µg/g tecido seco. Demonstraram em sua casuística que os valores da quantificação de cobre no tecido não excediam a 250 µg/g tecido seco. Essa discrepância entre os estudos pode ser explicada pela distribuição heterogênea de cobre no fígado, como descrita por McDonald et al. (1992). Além da DW, colestases, cirrose infantil da Índia e outras hepatopatias também apresentam cobre hepático elevado (Roberts & Schilsky, 2008). A realização desse exame em nosso meio é extremamente difícil em razão da indisponibilidade desse exame. Nos raros casos em que foi feita, contamos com o auxílio do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. No paciente HC_13, apesar do sequenciamento ter evidenciado heterozigose simples, o conjunto evolução clínica, exames laboratoriais e resposta terapêutica selaram o diagnóstico definitivo de DW. O paciente RF_18, embora apresentasse exames bioquímicos hepáticos normais aos 48 anos de idade, exibia alterações diagnósticas muito importantes para se diagnosticar a doença, ou seja, níveis de ceruloplasmina menores que 10 mg%, heterozigose composta e níveis hepáticos muito elevados de cobre no tecido hepático, em que pese a técnica de rodanina ter sido negativa.

Atualmente, são descritas mais de 500 mutações no gene *ATP7B*, algumas delas são predominantes de algumas regiões, como pode ser

observado na Tabela 1. A genotipagem do gene *ATP7B* é cada vez mais factível, embora a interpretação ainda seja um desafio.

Nesse estudo foram detectadas 23 mutações distintas em 160 alelos pesquisados. As mutações mais frequentes foram p.A1135Qfs e p.L708P em todos os grupos estudados, um perfil genético diferente do encontrado na Europa e em outras regiões, onde a mutação mais frequente é a p.H1069Q. Nossos dados corroboram achados de Deguti et al. (2004) em 60 pacientes brasileiros, em estudo realizado na Universidade de Humboldt, Alemanha, que também detectou as duas mutações, p.A1135Qfs (34,8%) e p.L708P (14,1%), como as mais frequentes. Entretanto, De Bem et al (2011) demonstraram que, em regiões em que a imigração europeia é mais importante como no sul do Brasil, a mutação mais frequente foi a p.H1069Q seguida das mutações p.M769Hfs e p.A1135Qfs.

Atualmente, o teste genético vem sendo comercializado em laboratórios de diagnósticos no Brasil. Em sua grande maioria o teste é realizado somente para detecção de mutações nos éxons 2, 14 e 18, outros laboratórios apenas realizam a genotipagem da mutação p.H1069Q, localizada no éxon 14. As principais mutações mais frequentes nos estudos realizados em São Paulo estão nos éxons 8, 14 e 15. Dessa forma, antes de se solicitar o teste genético em pacientes nos laboratórios de genética no Brasil, o médico deve primeiro ter conhecimento se está ou não está sendo feito o sequenciamento completo do gene *ATP7B*. Se estiver sendo realizada a pesquisa de mutações mais frequentes em outros países, provavelmente não corresponderá as expectativas dos brasileiros com suspeita de DW. Por outro lado o sequenciamento do gene *ATP7B* completo comercialmente tem o valor aproximado de R\$ 6.500 reais pela mesma técnica usada no presente experimento e está fora da realidade para ser

usado como *screening* na rotina para esclarecimento diagnóstico de hepatopatias crônicas.

A mutação p.A1135QfsX13 (p.Ala1135Gln, troca do aminoácido alanina pela glutamina), também conhecida como c.3402delC, é comum em caucasianos norte-americanos, suecos (Waldenström et al. 1996), também está presente em 19% das mutações na Rússia (Shah et al. 1997) e em 9% das alemães (Caca et al. 2001). Foi observada em nossa casuística que quatro de 16 (25%) alelos dos pacientes que foram submetidos a transplante hepático apresentavam ao menos um alelo com p.A1135QfsX13. Araujo (2012) observou que 40% dos pacientes submetidos a transplante hepático apresentavam ao menos um alelo com mutações do tipo *nonsense* ou *frameshift*. Observamos que dois pacientes de IHAG, IHAG_1 e IHAG_3, apresentavam mutações p.A1135Qfs em heterozigose composta e simples respectivamente.

Okada et al. (2010) associaram mutações *nonsense* e *frameshift* a alta prevalência de insuficiência hepática aguda grave. Gromadzka et al. (2005) e Merle et al. (2010) sugeriram que mutações *nonsense* e *frameshift* provocaram início precoce das manifestações clínicas, porém essas informações não foram confirmadas por Angios et al. 1998; Deguti et al. 2004, Okada et al. 2000 e Palsson et al. 2001. Além disso, por mecanismo desconhecido, mutações *nonsense* resultam, muitas vezes, na produção de mRNA altamente instável, que é rapidamente degradado pela via conhecida como decaimento de mRNA mediado por alterações sem sentido, com perda completa da estrutura e da função da proteína (Gromadzka et al. 2005). Huster et al. 2003 observaram, em testes *in vitro*, que a proteína p.A1135Qfs apresentava localização anormal (fora do Complexo de Golgi) e difusa e, como consequência, o transporte de cobre

não é induzido, sugerindo que a localização errada, juntamente com a proteína aberrante, influenciaria na patologia da DW.

A mutação p. L708P (p.Leu708Pro, troca do aminoácido leucina por prolina) é bastante frequente nas Ilhas Canárias, em Cuba e Espanha (García-Villarreal et al. 2000; Clark et al 2011; Margarit et al. 2005). A substituição por uma prolina em lugar de uma leucina na posição 708 geraria, teoricamente, uma disfunção grave na proteína ATP7B, porque a prolina altera a estrutura secundária da proteína (Eilers et al 2000).

Huster et al. (2012) realizaram amplo estudo funcional das mutações de DW havendo, entre elas, algumas mutações encontradas na nossa população tais como a p.D765N, p.N1270S, p.P1273L, p.M645R, p.H1069Q e o polimorfismo p.V456L. Todas as mutações, com exceção da p.M645R, apresentavam a capacidade de transporte de cobre deficiente. Segundo esse estudo as mutações p.D765N e p.P1273L, demonstraram transporte parcial de 48,87% e 13,53%, respectivamente.

Forbes & Cox (1998) sugeriram que a mutação p.D765N (p.asp765Asn, troca do aminoácido ácido aspártico por asparagina) não interferiria no transporte de cobre *in vitro*. Na paciente IHAG_5, 22 anos, foi detectada homozigose para mutação p.D765N. A mutação tem sido associada a formas hepáticas com cirrose hepática, e neurológicas com disartria, tremores posturais e distúrbios de comportamento (Deguti et al. 2004) em homozigose. O achado de homozigose dessa mutação na paciente IHAG_22 sugere que o comprometimento hepático possa mesmo ser muito grave.

A mutação p.N1270S (p.Asn1270Ser, troca do aminoácido asparagina por serina) está presente em 61% dos pacientes costa-riquenhos tendo alta

incidência de insuficiência hepática aguda grave (Shah et al. 1997). Barada et al. (2010) associou essa mutação com início mais precoce das manifestações hepáticas e formas mais graves como cirrose hepática com ascite. Huster et al (2012) sugeriram que o transporte de cobre na presença da mutação p.N1270S é bastante reduzido, correspondendo a apenas 1,50%, quando comparado com a proteína ATP7B normal.

No paciente descrito no item 5.3.2.4.1 com insuficiência hepática aguda grave foi realizado o sequenciamento e detectaram-se as mutações p.H1069Q e p.N1270S, corroborando o estudo de Huster et al. (2012) sobre a gravidade das duas mutações. Por outro lado, Rodriguez-Granillo et al. (2008) sugeriram que a proteína produzida decorrente da mutação H1069Q seria sensível a temperaturas superiores a 20°C e perderia sua função. Dessa forma não teria função na temperatura corpórea por permanecerem desenoveladas.

Atualmente 139 variantes não causadoras da doença estão descritas no banco de dados de DW (Kenney & Cox, 2007). Variantes não causadoras de doenças são mutações com frequência maior que 1%, como os polimorfismos e as mutações sinônimas. Foram encontrados os seguintes polimorfismos em nosso estudo: p.K952R, c.3903+6 T>C, p.A1140V c.2866-13 G>C, c.1707+22 C>T e c.1707+57 C>T e as mutações sinônimas p.T991T, p.A1003A. Porém, há poucos estudos funcionais das mutações e polimorfismos.

Segundo estudo de Huster et al. (2012) a presença do polimorfismo p.V456L acarreta produção de proteína que transporta parcialmente o cobre, ou seja, 37,59% comparado com o da ATP7B normal. Esses autores sugeriram que a associação desse polimorfismo com outras mutações poderia influenciar de alguma maneira no transporte de cobre no hepatócito. Como no caso da paciente

IHAG_3, que apresenta a mutação p.A1135Qfs em heterozigose simples e o polimorfismo p.V456L também em heterozigose simples. Poderia ser esse caso uma forma de IHAG secundária a DW, em que pese os valores normais de ceruloplasmina e baixos do cobre livre? Na verdade, resultado muito interessante do estudo foi o encontro de duas pacientes em heterozigose simples no grupo IHAG que não eram consideradas como tendo diagnóstico de DW. Como foi mencionado na seção “Casuística e métodos”, incluímos casos de insuficiência hepática que por algum motivo foi pensado em DW a despeito dos critérios internacionais (IHAG_4) e casos que não tinham explicações ou a causa era a hipótese de hepatite autoimune ou drogas. Comparando com a chance de se encontrar heterozigoto simples na população de 1:90, o encontro de dois heterozigotos nesse pequeno grupo de pacientes deve constituir forte estímulo para pesquisarmos mutações do gene *ATP7B* na insuficiência hepática aguda grave.

As mutações sinônimas p.T991T e p.A1003A foram observadas em dois pacientes, HC_6 e HC_15, porém em nenhum dos dois casos foi confirmado o diagnóstico de DW e também não foram encontradas mutações causadora de DW nesse pacientes. No paciente DW_28, também foi encontrada a p.T991T em homozigose. Por muitos anos, acreditou-se que mutações sinônimas, mais conhecidas como mutações silenciosas, não apresentavam mudanças estruturais nas proteínas, por não haver mudança de aminoácidos. Devido a essa percepção, pode ter havido subnotificação dos efeitos desse tipo mutação. Mutações sinônimas - às vezes chamadas mutações "silenciosas"- são amplamente reconhecidas como sendo capazes de provocar alterações na expressão, conformação e função proteica (Sauna & Kimchi-Sarfaty 2011).

Cartegni et al. (2002) sugeriu que essas mutações podem resultar em *splicing* errôneo do mRNA o que poderia acarretar manifestações clínicas das enfermidades. Nackley et al. (2006) sugeriram que essas mutações podem alterar a estabilidade do mRNA e a expressão e atividade da enzima e acreditam que as mutações não sinônimas possuam maior impacto nas doenças humanas do que vem sendo creditado. O aumento do conhecimento sobre a associação de variantes genéticas com doenças, por meio de estudos de associação, revelou contribuição substancial desses SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) na ocorrência de doenças humanas e nos vários mecanismos moleculares subjacentes. Certamente, esse maior conhecimento trará implicações em futuras pesquisas e aplicações biomédicas (Sauna & Kimchi-Sarfaty 2011).

Para os casos sem mutação e os heterozigotos simples, pode-se sugerir que algumas mutações podem não ter sido detectadas pelo método utilizado, pois segundo Ferenci et al. (2003) não existem heterozigotos com sintomas clínicos. Assim, alterações funcionais nas chaperonas transportadoras de cobre poderiam modificar a história natural desses portadores de mutações do gene *ATP7B* (Deguti, 2004). Oh et al. (1999) demonstraram *in vitro* a presença de elementos na região promotora do gene *ATP7B* exercendo ação na expressão do gene. Dessa forma mutações na região promotora poderiam provocar, agravar ou amenizar disfunções do transporte de cobre. Atualmente os sequenciamentos de nova geração, em que se pode sequenciar o gene *ATP7B* completo de uma vez, poderiam ajudar a elucidar essas questões.

Outra mutação com resultado bastante interessante é a p.M645R (p.Met645Arg, troca do aminoácido metionina por arginina), que foi detectada na família descrita no item 5.4 e em outros três pacientes da casuística (anexo 8.5).

Observa-se que, com exceção da paciente DW_8, todos os outros tiveram manifestações hepáticas depois da segunda década de vida.

Arruda et al. (2013) reportaram um paciente com 44 anos, sem anel de KF, em heterozigose composta [p.M645Arg/(C1934TG/c.51+4A→T)], sem quaisquer manifestações hepáticas e neurológicas de DW, com exame histológico sem evidências de doença hepática estabelecida. Os autores concluíram que o paciente, apesar de apresentar mutações em dois alelos, portanto, com critério de diagnóstico fechado para a doença, do ponto de vista clínico não tinha a enfermidade, o que não está de acordo com os critérios internacionais. Infelizmente nesse estudo não foi feita a dosagem de cobre hepático. Esse paciente guarda semelhança muito estreita com os casos descritos HC_11, RF_15 e RF_18, pois são indivíduos assintomáticos com exames praticamente normais, biópsias hepáticas com pequenas alterações com diagnóstico realizado após a quinta década de vida e que o sequenciamento dirimiu qualquer dúvida em relação ao diagnóstico da DW.

A frequência dessa mutação na população espanhola de DW foi de 27%, segundo Margarit et al. (2005), que sugeriram que tal mutação possa ter impacto pequeno nas manifestações do fenótipo, não detectáveis sem os testes clínicos e laboratoriais. Huster et al. (2012) realizaram testes funcionais da mutação e classificaram o transporte de cobre como normal, correspondendo a 88,72% comparado com o da proteína ATP7B normal. A substituição de uma metionina por uma arginina na posição 645 ocorre entre o sexto domínio de ligação de cobre e o primeiro domínio transmembrana e essa região não é essencial para a função (Margarit et al. 2005).

Até o momento, não havia sido descrita a mutação p.M645R em

homozigose e observamos que o paciente de 18 anos com essa mutação em homozigose não apresenta sinais de comprometimento hepático importante, se bem que a biópsia hepática não seja completamente normal. Esse comportamento benigno até o momento corrobora a observação de Margarit et al. (2005), de que esta mutação pode ter pequeno impacto na manifestação do fenótipo. Todavia, o nível baixo de ceruloplasmina nesse paciente fala contra as conclusões do estudo *in vitro* de Huster et al. (2012). Teoricamente, os níveis de ceruloplasmina são baixos na DW em razão da incorporação anormal do cobre nessa proteína transportadora sendo a apoceruloplasmina rapidamente degradada (Sato & Gitlin 1991). Portanto, se eles são muito reduzidos não está ocorrendo esse transporte adequadamente. Resta saber se a excreção biliar do cobre não guarda relação com a incorporação do cobre à molécula de apoceruloplasmina. É necessário maior número de pacientes em homozigose dessa mutação para confirmar ou excluir a hipótese de não impacto no fenótipo.

Três pacientes, o HC_11 40 anos, a paciente RF_15 51 anos e o paciente RF_18 48 anos apresentavam heterozigose composta com a mutação p.A1135Qfs. No entanto, o caso índice, irmão da paciente RF_15, com o mesmo genótipo, abriu o quadro clínico com cirrose hepática descompensada por ruptura de varizes aos 36 anos de idade, embora seja fase tardia pra diagnosticar forma hepática da DW. Outros casos da casuística do Serviço com essa mutação p.M645R tiveram apresentação mais precoce como, por exemplo, paciente com 23 anos, heterozigoto composto p.M645R/p.L708P, abriu quadro neurológico com disartria, disfagia, alteração da marcha, distonia, bradicinesia, comprometimento motor moderado, quadros de alteração de comportamento e depressão e evidências em exames laboratoriais de cirrose hepática. Porém,

esse paciente é acompanhado há 35 anos com sequelas neurológicas relacionadas a disartria e com boa função hepática. Outro jovem de 21 anos, com quadro de cirrose hepática descompensada com ascite e icterícia, além de manifestações neurológicas mais discretas evoluiu com complicações da cirrose hepática e óbito. Era portador de heterozigose composta p.M645R/N1270S, mutação essa responsável por formas mais graves especialmente hepáticas, como descrito em doentes da Costa Rica.

A provável explicação para esses quadros relativamente benignos seria o *splicing* alternativo dos éxons 6, 7, 8, 12 e 13 (Deguti, 2004). Um aspecto relevante do gene *ATP7B* é o *splicing* alternativo em cérebro, fígado, rim e placenta de humanos que controla a quantidade de ATPase ativa nesses órgãos. O transcrito mais completo contendo todos os éxons é encontrado no fígado. Por outro lado, o maior número de variações de *splicing*, ocorre no cérebro: são diversas combinações que omitem os éxons 17, 13, 6, 8 e 12. A omissão do éxon 6 não interferiria na fase de leitura aberta (*open reading frame*) do gene e a repercussão funcional não é conhecida (Petrukhin et al 1994).

Deguti (2004) observou outros fatores que podem estar associadas às manifestações fenotípicas que é quantidade de cobre ingerido, como feijão (1304,6 µg/ 100mg) e o café (1433,0 µg/ 100mg) são ingeridos regularmente em grande quantidade pela população brasileira de forma geral. Embora, haja uma dificuldade de quantificar a ingestão individual de cobre e relacioná-la com o fenótipo.

São necessários mais estudos funcionais de mutações, dos polimorfismos e de mutações sinônimas para complementar a caracterização e para entender o comportamento da mutação *in vitro* e seus efeitos *in vivo*. Só

assim poderemos fazer melhor correlação fenótipo-genótipo.

O estudo de rastreamento familiar é importante, pois possibilita o diagnóstico precoce e é a melhor oportunidade para iniciar o tratamento de forma eficaz e sem comprometimento hepático e neurológico importante. Como pode ser observado nos casos do grupo de RF, em 15 casos o diagnóstico foi confirmado e o sequenciamento foi fundamental para confirmação (ou exclusão) do diagnóstico antes do surgimento das manifestações clínicas.

Dufernez et al. (2013) reportaram quatro famílias com, cinco pacientes, e três deles (60%) não apresentavam escore para o diagnóstico de DW pré-sequenciamento. Loudianos et al. (2013) descreveram duas famílias com sete pacientes, e três (42,85%) não apresentavam escore para o diagnóstico. Após o sequenciamento, todos os pacientes foram diagnosticados com DW nos dois estudos. Ambos as séries sugeriram que o sequenciamento foi de grande importância para o diagnóstico de DW, o que também pôde ser observado no presente estudo. Isso ocorreu, por exemplo, com a paciente RF_11 e o paciente RF_20 que tiveram o diagnóstico de DW confirmado e excluído rápida e precocemente. Esses pacientes foram motivos de preocupação porque, além de serem filhos de portadores de DW, os cônjuges eram parentes de primeiro grau.

Filhos de pais afetados com DW só podem ser afetados se o outro progenitor é ao menos heterozigoto. Considerando-se que a prevalência da DW é estimada para ser da ordem de 30 por um milhão, com uma frequência de portadores de cerca de 1:90, a probabilidade de ocorrência da doença em descendentes é estimada em 0,56% nos EUA e Europa (Bull et al. 1993; Petrukhin et al. 1993). A prevalência da DW e a frequência de portadores heterozigotos são possivelmente subestimadas. A probabilidade de ocorrência

de DW é maior em famílias consanguíneas e em populações com uma elevada frequência de DW (Ferenci et al. 2005). A ocorrência de DW em duas gerações consecutivas tem sido raramente reportada em populações caucasianas (Maier-Dobersberger et al. 1995, Czlonkowska et al. 2008; Dufernez et al. 2013).

A recomendação de rastreamento familiar quando a DW é diagnosticada é para os parentes de primeiro grau (Ferenci et al. 2003; Roberts & Schilsky, 2008). Parentes de primeiro grau incluem os pais, irmãos, e filhos. Na prática, essa recomendação foi muitas vezes interpretada como somente os filhos e irmãos. Subentende-se que os pais sejam heterozigotos. Porém, o risco para a descendência é extremamente baixo, menos do que 1% (Roberts 2013). Definitivamente nunca pensaríamos na DW no paciente RF_18, 48 anos, pai dos pacientes DW_28 e RF_7 com exames bioquímicos normais se não tivessem sido detectados genótipos diferentes na mesma família.

Roberts (2013) alega que a DW pode ser rara, mas talvez não tão rara como se pensava. Tendo em vista que as estimativas atuais de frequências alélicas e taxas de portadores na DW podem ser muito conservadoras, e de fato realmente imprecisas para certas populações, como a brasileira, a triagem dos filhos de pacientes com doença de Wilson deve ser rotina.

O diagnóstico da DW, com base em anormalidades do metabolismo do cobre, pode ser difícil devido à falta de confiabilidade de distinguir heterozigotos simples de crianças assintomáticas, mas afetadas. Nesses casos, o teste genético deve ser realizado e é uma poderosa ferramenta de diagnóstico (Dufernez et al. 2013).

No entanto, os testes clínicos como aminotransferases, níveis de ceruloplasmina e cuprúria basal de 24 horas são sempre necessários. Se o

diagnóstico clínico e bioquímico não for esclarecedor, o paciente deve ser reavaliado em intervalos regulares e o diagnóstico genético deve ser considerado na persistência da dúvida. Além disso, os pacientes adolescentes e adultos jovens precisam ser esclarecidos que, se tiverem filhos, as crianças necessitam ser triadas, embora o risco de 0,6-3 % seja baixo (Roberts 2013).

Finalmente, o teste genético pode se revelar mais eficiente e menos dispendioso do que a realização de extensa investigação diagnóstica, às vezes invasiva, e o acompanhamento por longos períodos para se chegar ao diagnóstico definitivo de se ter ou não ter a doença. Se for viável e não proibitivamente caro, o teste genético deve ser realizado.

A quantidade de mutações distintas em apenas um gene de uma doença rara dificulta a padronização de quais mutações devem ser investigadas, como é o caso da DW. Porém, em regiões com populações mais homogêneas isso se torna mais fácil, pois há o direcionamento para a realização das mutações prevalentes naquela área (Caca et al.2001). Ademais, a utilização da genotipagem é muito importante quando a propedêutica convencional não for o suficiente, quando a biopsia hepática não puder ser realizada por coagulopatia ou dificuldades técnicas.

Toda vez que é identificado um paciente com DW há necessidade de se estudar todos os familiares de primeiro grau. Contudo, muitos obstáculos interpõem-se entre os familiares e o hospital tais como: distância física, custo do transporte, estado de saúde incapacitante e falta de recursos de comunicação. A possibilidade de se enviar apenas o sangue para a instituição amenizaria tais dificuldades.

À medida que a genotipagem se torna mais acessível na prática clínica, o

diagnóstico da DW será definido mais agilmente, de modo menos invasivo e possivelmente será estendido a número maior de portadores das formas assintomáticas, atípicas e formas muito graves. Os resultados do presente estudo confirmam essas previsões uma vez que o diagnóstico pode ser feito (ou excluído) de forma mais rápida em casos de rastreamento familiar com exames de triagem suspeitos, mas com exames bioquímicos hepáticos normais. Foi de extrema valia no esclarecimento de hepatopatias crônicas idiopáticas, além de trazer informações surpreendentes na insuficiência hepática aguda grave e em identificar diversidade genotípica em uma mesma família.

CONCLUSÕES

7. Conclusões

O sequenciamento foi útil no diagnóstico de DW no presente estudo:

- 7.1 Para confirmar que as mutações p.A1135Qfs e p.L708P são as mais frequentes na população brasileira.
- 7.2 Para demonstrar que a mutação tida como a mais frequente na Europa, a p.H1069Q, tem bem menor importância em nosso meio, embora mais frequentemente do que o observado anteriormente.
- 7.3 Para confirmar (ou excluir) precocemente o diagnóstico e evitar a realização de exames desnecessários e invasivos e iniciar (ou não realizar) o tratamento, com base mais sólida, em pacientes com hepatopatia crônica idiopática e em familiares de portadores de doença de Wilson identificados pelo rastreamento familiar.
- 7.4 Em casos de insuficiência hepática aguda grave ao definir o diagnóstico ainda que tardio, mas de suma importância para realização de estudo familiar subsequente.
- 7.5 Para identificação não esperada de heterozigotos simples e polimorfismos de significado ainda não esclarecido em pacientes com insuficiência hepática aguda grave, observações que precisam ter estudos mais aprofundados.
- 7.6 Para Identificação de casos inusitados de três genótipos diferentes causadores da doença na mesma família (homozigose de duas mutações diferentes e heterozigose composta).
- 7.7 Para melhor definir que a mutação p.M645R em homozigose tem potencial para desenvolver a doença de Wilson, embora resultados de estudos em *in vitro* sugiram função normal da proteína defeituosa sintetizada.
- 7.8 Para definir que há casos de doentes com a mutação p.M645R em

heterozigose composta de evolução extremamente benigna, com diagnóstico tardio, após a quinta década de vida, com discretas alterações hepáticas. Porém há casos com evolução mais grave tanto do ponto de vista hepático quanto neurológico, possivelmente influenciados pelas mutações que a acompanham.

8. Anexos

8.1 Aprovação da pesquisa pela comissão de ética do HC-FMUSP

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 24.11.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1111/05**, intitulado: "Doença de Wilson: Aspectos demográficos e fenotípicos relacionados ao genótipo *ATP7B*" apresentado pelo Departamento de **GASTROENTEROLOGIA**, inclusive o 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. Eduardo Luiz Rachid Cançado**

Pesquisador (a) Executante: **Dra. Marta Mitiko Deguti**

CAPPesq, 24 de Novembro de 2005.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

8.2 Termo livre e esclarecido para inclusão dos pacientes

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DOENÇA DE WILSON: PESQUISA DAS MUTAÇÕES DO GENE *ATP7B*

EM PACIENTES BRASILEIROS

A doença de Wilson é transmitida de pais para filhos, através dos genes. Como é uma doença rara, sua colaboração é muito importante para que nós possamos estudar de que forma mutações nos genes determinam os sintomas. Para isso, realizaremos uma coleta de 10 ml de sangue, de onde extrairemos o DNA. No laboratório, procuraremos as mutações no gene da doença de Wilson. O único desconforto previsto é a picada no braço para colher sangue da veia. Acreditamos que o conhecimento do tipo de mutação que causa a doença de Wilson possibilite descobrir novos casos na família antes que tenham sintomas. Além disso, aumentaremos nosso conhecimento quanto ao tipo de mutação relacionando ao tipo de doença que ela causa.

Todo paciente que participa dessa pesquisa tem direito de perguntar sobre o andamento de nossos estudos, nossos resultados e avanços. Tem também nossa garantia de que os resultados são sigilosos e que seu DNA serão somente utilizados com finalidades bem aceitas pelas normas de ética científica mundiais. Além disso, é livre para retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, pode se recusar a doar seu DNA para esse projeto e isso não lhe trará prejuízos no tratamento que recebe de nossa equipe médica.

Não há riscos de danos à saúde relacionados a essa pesquisa, uma vez que os dados são basicamente obtidos por revisão de prontuário médico e análise

laboratorial dos sangue coletado. Nossa equipe assiste a todos os pacientes que são acompanhados no ambulatório A2MG-403 em suas intercorrências, de acordo com os recursos que nos são disponíveis nesta instituição.

Os contatos da equipe são:

Ambulatório A2MG-403: quintas-feiras, das 14 às 18 horas, Prédio dos Ambulatórios, quinto andar, sala 4B, telefone (11)3069-6380

Secretaria da Disciplina de Gastroenterologia: telefone (11)3069-6447

Enfermaria da Disciplina de Gastroenterologia: telefone (11)3069-6736

Dra. Marta Deguti e-mail: marta.deguti@uol.com.br pager: 3444-4545 cód. 84765

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo,   de   de

---

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Dra. Marta Mitiko Deguti – CRM-SP 78.966

médica pesquisadora

Anexo 8.3. Dados demográficos dos pacientes com DW (N=35)

Caso	Nome	Gênero	Etnia	Procedência	Consanguinidade	Parentes afetados	Idade de início	Idade do diagnóstico
DW_1	AAS	M	B	São Paulo (SP)	N	2 primos, 1 filha	23	23
DW_2	AAM	F	N	São Paulo (SP)	S	1 irmã	22	23
DW_3	AMW	M	B	Curitiba (PR)	N	-	9	10
DW_4	APPS	F	NR	São Paulo (SP)	S	1 irmão; 1 irmã	NR	NR
DW_5	ASG	F	B	Santa Rita do Passa Quatro (SP)	S	-	16	17
DW_6	AHP	M	B	Itumbiara (GO)	-	2 irmãos	-	13
DW_7	CTN	F	P	São Paulo (SP)	N	1 irmão	15	15
DW_8	DSB	F	B	São Bernardo do Campo (SP)	N	-	9	9
DW_9	EMC	F	P	Osasco (SP)	S	-	14	14
DW_10	EGMO	F	B	Campinas (SP)	S	-	15	15
DW_11	EAX	M	B	Ferraz de Vasconcelos (SP)	N	-	21	21
DW_12	EGS	M	N	São Paulo (SP)	S	S	27	28
DW_13	EFS	M	B	Guarujá (SP)	S	6 irmãos	18	18
DW_14	FASB	M	B	São Paulo (SP)	N	1 irmão	-	29
DW_15	FBN	M	B	São Paulo (SP)	S	1 irmã	17	17
DW_16	GRR	F	B	São Paulo (SP)	N	1 irmã	24	25
DW_17	GNL	F	B	São Paulo (SP)	N	-	20	20
DW_18	HBL	F	B	Indaiatuba (SP)	-	1 irmã	13	15
DW_19	IP	F	B	Resende (RJ)	S	-	-	11
DW_20	JHDLS	M	B	Alemanha	-	-	-	35
DW_21	JTN	M	P	Diadema (SP)	N	1 irmã	16	21
DW_22	KRG	M	P	São Paulo (SP)	N	2 irmãs	-	16
DW_23	MS	M	B	Indaiatuba (SP)	N	-	18	24
DW_24	MAJ	M	B	São Paulo (SP)	N	-	26	28
DW_25	MDPS	M	P	São Paulo (SP)	S	2 irmãs e pai	assintomático	20
DW_26	RSS	M	B	São José dos Campos (SP)	N	-	24	24

Anexo 8.3. Dados demográficos dos pacientes com DW (N=35) conclusão

Caso	Nome	Gênero	Etnia	Procedência	Consanguinidade	Parentes afetados	Idade de início	Idade do diagnóstico
DW_27	RPS	F	B	São Paulo (SP)	N	-	25	25
DW_28	SAS	F	B	São Paulo (SP)	N	-	9	10
DW_29	SLMR	M	B	São Paulo (SP)	S	1 irmão	assintomático	13
DW_30	TGC	F	B	São Paulo (SP)	N	1 irmão	18	18
DW_31	VCP	M	B	São Paulo (SP)	N	-	24	25
DW_32	WASG	M	B	Diadema (SP)	N	-	9	10
DW_33	WMN	M	B	Indaiatuba (SP)	N	1 irmã	11	13
DW_34	AGN	M	B	Euclides da Cunha(BA)	N	-	15	15
DW_35	EFS	M	B	Maceió (AL)	N	-	18	19

Anexo 8.4 Apresentação clínica dos pacientes com DW (N=35)

Caso	Principal Órgão	Quadro Neurológico	Quadro Hepático	CP	Outras manifestações
DW_1	fígado	-	Cirroze Hepática Descompensada	C	-
DW_2	fígado	-	Cirroze Hepática Descompensada ascite, anasarca	B	-
DW_3	fígado	-	Cirroze Hepática Compensada icterícia	A	-
DW_4	fígado	-	Insuficiência hepática aguda grave	-I	-
DW_5	SNC	disartria, disfagia, hipertonia, distonia, tremores, disfasia, desvio de rima	Hepatite Aguda	-I	hemólise, hematúria
DW_6	fígado	-	Hepatopatia crônica	-I	-
DW_7	fígado	-	Cirroze Hepática Descompensada anasarca amenorreia	C	-
DW_8	fígado	-	Hepatite Aguda	A	agitação psicomotora
DW_9	fígado	-	Cirroze Hepática Descompensada com icterícia, ascite, amenorreia	B	-
DW_10	fígado	-	Cirroze Hepática Descompensada com anasarca	C	amenorreia
DW_11	SNC	disartria, tremor mãos, sialorreia	Sem Hepatopatia	-I	-
DW_12	SNC	tremores, distonia, disartria, depressão	icterícia, colelitíase	A	-
DW_13	SNC	mudança de comportamento; lentificação da fala, tremores, disfagia, sialorreia	Hepatite Crônica	A	-
DW_14	fígado	-	Hepatopatia Crônica	-	-
DW_15	SNC	distonia, oligocinesia hipertonia, alteração da marcha, disartria, disfagia, riso sardônico, Sialorréia	Sem Hepatopatia	-I	-
DW_16	fígado	disartria, dificuldade para deambular, rigidez	Hepatite Aguda	-	agressividade
DW_17	SNC	micrografia, tremores, disartria, disfagia, Sialorréia	Hepatopatia Crônica	-	agressividade
DW_18	fígado	disartria, distonia, alteração da marcha, disfagia, coreoatetose, rigidez	Cirroze Hepática Compensada icterícia	C	-
DW_19	fígado	-	Hepatopatia Crônica	-	-

Anexo 8.4 Apresentação clínica dos pacientes com DW (N=35) conclusão

Caso	Principal Órgão	Quadro Neurológico	Quadro Hepático	CP	Outras manifestações
DW_20	fígado	-	Insuficiência hepática aguda grave	-	-
DW_21	SNC	tremores, disartria, disfagia, alteração da marcha ,rigidez ,epilepsia, Sialorréia	plaquetopenia	-	isolamento social
DW_22	fígado	-	Hepatopatia crônica	-	-
DW_23	SNC	câimbras, disartria e ataxia	Cirrose Hepática Compensada	C	labilidade emocional
DW_24	SNC	bradicinina, rigidez, hiponímia, anartria, Sialorréia, disfagia	Hepatite Crônica	-	depressão
DW_25	fígado	-	Hepatite Crônica	-	-
DW_26	SNC	Tremor dificuldade para andar, disartria, distonia, Sialorréia, disfagia	Sem Hepatopatia	-	-
DW_27	SNC	disartria, coréia, Sialorréia, disfagia, distonia, tremor ,rigidez, dificuldade para andar	Hepatite Crônica	-	ansiedade
DW_28	rim	-	Cirrose Hepática	-	hematúria macro e micro
DW_29	assintomático	-	Hepatopatia Crônica	A	depressão
DW_30	fígado	-	Hepatite Aguda	-	-
DW_31	SNC	déficit de memória rigidez ,incontinência urinária, disfagia, Sialorréia e dificuldade para deambular	Sem hepatopatia	-	-
DW_32	fígado	alteração fala, tremor, alteração da marcha	Cirrose Hepática Descompensada	C	-
DW_33	SNC	distonia, disartria, bradicinesia, hipertonia, tremor, alteração da marcha, disfagia	Cirrose Hepática	-	labilidade emocional
DW_34	fígado	-	Hepatopatia crônica	-	-
DW_35	SNC	distonia, disfagia	Hepatopatia crônica	-	depressão

Anexo 8.5 Dados de propedêutica complementar dos pacientes com DW

Caso	Anel de KF	Escore	Cerul (mg/dL)	Escore	Cu-S (µg/dL)/Cu-U (µg/24h)	Escore	Cu pós 1g DPA (µg/24h)	Escore	Bilir (mg/dL)	ALT (xLSN)/AST (xLSN)	FA (xLSN)/GGT (Xlsn)	rodanina	Escore	Escore Eurowilson	Genótipo	Polimor.	Mut. sinonimas	Escore Eurowilson
DW_1	N	0	8,0	2	48/...	0	NR		3,3	1,8/3,3	1/1,1	N	0	2	p.L708P / p.L708P	0/0	0/0	6
DW_2	S	2	13,0	1	93/303	2	NR		2,1	1,8/3,8	2,2/3,0	N	0	5	p.P1273L/ p.P1273L	0/0	0/0	9
DW_3	N	0	5,2	2	17/110	2	NR		0,1	1,0/1,0	1,31,0	N	0	4	p.M769Hfs /p.A1135Qfs	0/0	0/0	8
DW_4	NR	0	-/-	0	-/-	0	-/-		-/-	-/-	-/-	N	0	0	p.A1135Qfs	0/0	0/0	4
DW_5	NR	0	2,0	2	45,4/977	2	NR		0,5	1,0/1,0	1,0/1,0	N	0	4	p.I1184T/p.I1184T	p.K952R/p.K952R	0/0	8
DW_6	NR	0	5,0	2	NR/1514	2	NR		0,4	4/2,6	1/1,6	N	0	4	p.L708P/p.G869V	p.A1140V/0; c. 3903+6 T>C/0	0/0	8
DW_7	S	2	15,0	1	46/324	2	NR		2,3	2,9/3,1	2,6/4,1	N	0	5	p.H1069Q/A1135Qfs	p.K952R/0; c. 3903+6 T>C/0	0/0	9
DW_8	N	0	5,0	2	30/60	2	NR		0,5	12,7/6	1,2/3,8	N	0	4	p.M645R	0/0	0/0	8
DW_9	NR	0	2,0	2	8/424	2	NR		0,5	1,3/1,7	1,1/1,0	N	0	4	p.A1135Qfs	0/0	0/0	8
DW_10	S	2	2,0	2	67,2/583	2	NR		1,0	2/2	1,0/2,0	N	0	6	p.A1135Qfs	0/0	0/0	10
DW_11	S	2	2,0	2	27/12	0	NR		2,3	1,0/1,0	1,0/1,0	N	0	4	p.A1135Qfs	p.K952R /p.K952R	0/0	8
DW_12	S	2	2,0	2	28/34	0	NR		0,7	1,0/1,0	1,0/1,0	S	1	5	p.L708P / p.L708P	0/0	0/0	9
DW_13	S	2	2,0	2	15/547,6	2	NR		0,9	1,0/1,0	1,1/1,3	N	0	6	p.A1135Qfs	0/0	0/0	10
DW_14	S	2	2,0	2	15,9/173,7	2	NR		0,9	1,8/2,9	NR/1,8	N	0	6	p.A1135Qfs	0/0	0/0	10
DW_15	S	2	2,0	2	32/14	0	NR		0,6	1,0/1,0	1,0/1,0	N	0	4	p.A1135Qfs	0/0	0/0	8
DW_16	S	0	3,0	2	14,5/129,4	2	NR		0,9	1,5/1,5	1,0/1,6	N	0	4	c.3061-12 T>A/ p.A1135Qfs	p.K952R /-; c. 3903+6 T>C / c. 3903+6 T>C	0/0	8
DW_17	S	2	3,0	2	30/NR	0	NR		NR	NR	NR/NR	S	1	5	p.H1069Q/p.W650X	p.K952R /0; p.A1140V /-; c.	0/0	9

Anexo 8.5 Dados de propedêutica complementar dos pacientes com DW (N=35) conclusão

Caso	Anel de KF	Escore	Cerul (mg/dL)	Escore	Cu-S (µg/dL)/Cu-U (µg/24h)	Escore	Cu pós 1g DPA (µg/24h)	Escore	Bilir (mg/dL)	ALT (xLSN)/AST (xLSN)	FA (xLSN)/GGT (Xlsn)	rodanina	Escore	Escore Eurowilson	Genótipo	I3+6 T>C /-		Mut. sinónimas	Escore Eurowilson
DW_18	S	2	4,0	2	36/230	2	NR		2,0	1,1/1,1	1,3/NR	N	0	6	p.L708P/p.A1135Qfs	0/0	0/0		10
DW_19	N	0	6,8	2	41/NR	0	NR		0,6	2,9/2,6	1,0/3,4	N	0	2	p.A1135Qfs/p.L708P	0/0	0/0		6
DW_20	-	0	0	0	NR/NR	0	NR		NR	NR	NR/NR	0	0	0	p.H1069Q/p.A1135Qfs	0/0	0/0		4
DW_21	S	2	3,0	2	36/744	2	NR		0,6	1,0/1,0	1,0/1,0	N	0	6	p.H1069Q/p.A1135Qfs	p.K952R /-; c. 3903+6 T>C/-	0/0		10
DW_22	NR	0	8,0	2	25,4/192	2	810	2	0,4	1,1/1,0	1,5/1,0	N	0	6	p.H1069Q/p.N1270S	p.A1140V/ p.A1140V	0/0		10
DW_23	S	2	5,0	2	25/20	0	NR		4,1	1,3/3,1	1,5/1,0	N	0	4	p.H1069Q/p.N1270S	0/0	0/0		8
DW_24	S	2	2,0	2	29/23	0	NR		0,7	1,0/1,0	1,0/1,0	N	0	4	p.L708P/p.A971V	p.K952R /-; c. 3903+6 T>C/-; p.A1140V/-	0/0		8
DW_25	N	0	2,0	2	16/970	2	1891	2	0,9	3,7/1,9	1/1,6	N	0	6	p.M645R/p.A1135Qfs	0/0	0/0		10
DW_26	S	2	3,0	2	37/1947	2	NR		0,5	1,0/1,0	1,0/1,0	N	0	6	p.A1135Qfs/p.A1135Qfs	0/0	0/0		10
DW_27	S	2	3,8	2	29/179	2	NR		0,5	1,0/1,0	1,0/1,0	N	0	6	c.3061-12 T>A / p.A1135Qfs	p.K952R /-; c. 3903+6 T>C/-; p.A1140V/-	p.T991T/p.T991T		10
DW_28	N	0	2,0	2	15/114,8	2	NR		0,9	2,2/2,1	1/1,4	N	0	4	p.D765N/p.E1173K	c. 3903+6 T>C /-;	0/0		8
DW_29	N	0	2,0	2	30/759	2	NR		0,5	3,1/1,9	NR/NR	N	0	4	p.L708P/p.A1135Qfs	0/0	0/0		8
DW_30	S	2	2,0	2	94/3433	2	NR		0,9	1,0/1,0	1,0/1,0	N	0	4	p.H1069Q/p.L1275S	0/0	0/0		8
DW_31	S	2	2,0	2	37/126	2	NR		0,5	1,0/1,0	1,0/1,0	N	0	6	p.L1238Sfs / p.L1238Sfs	p.K952R / p.K952R	0/0		10
DW_32	S	2	2,4	2	5/NR	0	NR		NR	1,0/1,0	1,0/1,0	S	1	5	p.G1061E/p.A1135Qfs	0/0	0/0		9
DW_33	S	2	2,0	2	35/104	2	NR		0,5	1,0/1,0	3,6/1,0	N	0	6	p.A1135Qfs/s0	0/0	0/0		10
DW_34	N	0	9,0	2	68/1222	2	3925	2	1,68	1,0/3,0	1,0/3,7	N	0	6	p.L708P/p.L708P	0/0	0/0		10
DW_35	S	2	2,8	2	10,4/183	2	NR		0,9	1,4/1,9	1,2/4,2	N	0	6	p.A1135Qfs/c.3061-12T>C	p.K952R/0	0/0		10

Anexo 8.6 Dados demográficos dos pacientes de rastreamento familiar (N=20)

Caso	Nome	Gênero	Etnia	Procedência	Caso índice	Consanguinidade	Parentes afetados	Idade de início	Idade do diagnóstico
RF_1	RMA	M	B	Francisco Morato (SP)	N	N	1 irmã	assintomático	32
RF_2	AFD	M	B	Macapá (AP)	S	S	1 irmão	8	8
RF_3	AS	M	B	São Paulo (SP)	N	N	1 irmão	13	13
RF_4	MAS	M	P	São Paulo (SP)	N	N	1 irmão	assintomático	12
RF_5	FCG	M	B	Uberaba (MG)	S	S	1 irmão	assintomático	13
RF_6	GPS	F	P	São Paulo (SP)	N	S	1 irmão 1 irmã	14	14
RF_7	JBP	M	P	Piauí (PI)	N	N	1 irmão	assintomático	14
RF_8	NSS	F	P	São Paulo (SP)	N	N	pai	assintomático	9
RF_9	LPS	F	B	São Paulo (SP)	N	S	1 irmã, 2 primos	assintomático	17
RF_10	EFS	M	B	Guarujá (SP)	N	S	2 irmãs, 1 irmão	assintomático	12
RF_11	DBP	F	B	São Paulo (SP)	N	S	1 pai	assintomática	4
RF_12	EPP	F	B	São Paulo (SP)	N	S	1 irmão 1 irmã	assintomática	24
RF_13	JTN	M	P	Diadema (SP)	S	N	1 irmã	16	21
RF_14	AL	F	B	São Paulo (SP)	N	S	1 irmão	assintomático	22
RF_15	MHMB	F	P	São Paulo (SP)	N	N	1 irmão	assintomático	51
RF_16	FCM	F	B	São Paulo (SP)	S	S	1 irmã	assintomática	14
RF_17	SPS	M	B	São Paulo (SP)	N	S	1 irmão	assintomático	5
RF_18	RSP	M	P	São Paulo (SP)	N	N	3 filhos	assintomático	48
RF_19	CCS	M	B	São Paulo (SP)	N	S	1 tio, 3 primos	assintomático	18
RF_20	GB	M	B	São Paulo (SP)	N	S	1 mãe	assintomático	assintomático

Anexo 8.7 Apresentação clínica dos pacientes de rastreamento familiar (N=20)

Caso	Principal Órgão	Quadro Neurológico	Quadro Hepático	CP	Outras manifestações
RF_1	assintomático	-	Sem hepatopatia	-	-
RF_2	fígado	-	Cirrose Hepática compensada	A	proteinúria leve
RF_3	assintomático	-	Hepatite Crônica	-	-
RF_4	fígado	-	Cirrose Hepática compensada moderada ativa	A	-
RF_5	assintomático	-	Hepatite crônica	-	-
RF_6	assintomático	-	Hepatite crônica	-	dislipidemia, diabetes tipo 1, hipotireoidismo
RF_7	assintomático	-	Hepatite crônica	-	cefaleia esporádica, bronquite na infância
RF_8	assintomático	-	Hepatite Crônica	-	-
RF_9	assintomático	-	Hepatite crônica	-	-
RF_10	assintomático	-	Sem hepatopatia	-	-
RF_11	fígado	-	Hepatite Crônica	-	-
RF_12	assintomático	-	Sem hepatopatia	-	-
RF_13	SNC	tremores, disartria, disfagia, alteração marcha ,rigidez, epilepsia, Sialorréia	Plaquetopenia	-	isolamento social
RF_14	assintomático	-	Hepatite crônica	-	-
RF_15	assintomático	-	Hepatite Crônica	-	hipotireoidismo, HAS
RF_16	fígado	-	Cirrose hepática compensada	A	-
RF_17	fígado	-	Hepatopatia crônica	-	-
RF_18	assintomático	-	Hepatopatia crônica	-	-
RF_19	assintomático	-	Sem hepatopatia	-	-
RF_20	assintomático	-	Sem Hepatopatia	-	-

Anexo 8.8 Dados de propedêutica complementar dos pacientes de rastreamento familiar (N=20)

Caso	Anel KF	Escore	Cerul (mg/d L)	Escore	Cu-S (µg/dL)/ Cu-U (µg/24h)	Escore	Cu pós 1g DPA (µg/24h)	Escore	Bilir (mg/dL)	ALT (xLSN)/AST (xLSN)	FA (xLSN)/GG T (xLSN)	Coloração de rodanina	Escore	Escore Eurowilson	Genótipo	Polimor.	Escore eurowilson
RF_1	NR	0	18,0	1	76/NR	0	NR	0	0,7	1,0/1,0	1,0/1,0	N	0	1	p.D765N/0	0/0	2
RF_2	N	0	6,3	2	20/NR	0	NR	0	0,7	1,2/1,0	NR/NR	N	0	2	p.T766Pfs/p. T766Pfs	0/0	6
RF_3	N	0	2,0	2	NR/NR	0	NR	0	NR	3,1/18	NR/NR	N	0	2	p.N1150Tfs/ p.T1232P	0/0	6
RF_4	N	0	6,0	2	NR/NR	0	NR	0	0,7	2,0/1,0	1,0/1,0	N	0	2	p.L708P/p.L 708P	0/0	6
RF_5	NR	0	4,5	2	NR/NR	0	NR	0	NR	6,7/3,9	1,8/2,2	N	0	3	p.L708P/p.L 708P	0/0	7
RF_6	NR	0	4,0	2	10,3/<80	0	NR	0	0,3	3,4/1,9	1,0/3,0	N	0	2	p.A1135Qfs/ p.A1135Qfs	0/0	6
RF_7	N	0	2,0	2	17/34	0	NR	0	0,9	3,3/2,7	3,8/1,0	N	0	0	p.K1238Sfs/ p.A1135Qfs	0/0	4
RF_8	N	0	3,0	2	15/NR	0	NR	0	0,2	5,0/2,6	1,3/1,1	N	0	2	p.L708P / p.L708P	0/0	6
RF_9	N	0	6,6	2	27/NR	0	NR	0	0,4	2,6/1,6	1,0/1,4	N	0	4	p.L708P/p.L 708P	0/0	8
RF_10	NR	0	2,0	2	8/NR	0	NR	0	0,3	1,0/1,0	1,8/1,0	N	0	2	p.A1135Qfs/ p.A1135Qfs	0/0	6
RF_11	NR	0	2,0	2	10/NR	0	NR	0	0,5	1,0/1,2	1,0/1,0	N	0	2	p.A1135Qfs/ p.A1135Qfs	0/0	6
RF_12	NR	0	35,0	0	132,5/104	2	NR	0	0,2	1,0/1,0	1,0/2,1	N	0	2	p.M645R/0	0/0	3
RF_13	S	2	3,0	2	36/744	2	NR	0	0,6	1,0/1,0	1,0/1,0	N	0	6	p.H1069Q/p. A1135Qfs	p.K952R /-; c. 3903+6 T>C/-	10
RF_14	N	0	2,0	2	15/10	0	144	1	0,8	1,0/1,0	1,0/1,0	N	0	3	p.T1232P/p. T1232P	0/0	7
RF_15	N	0	4,0	2	10/NR	0	NR	0	0,7	1,0/1,0	1,0/1,0	N	0	2	p.M645R/p.A 1135Qfs	0/0	6
RF_16	N	0	16,0	1	7/24	0	NR	0	0,2	5,8/3,7	1,0/1,5	S	1	2	p.P1273L/p. P1273L	0/0	6
RF_17	N	0	7,0	2	16/NR	0	NR	0	0,5	2,9/2,1	1,5/1,8	N	0	2	p.L708P/p.L 708P	0/0	6
RF_18	N	0	3,0	2	17/114,69	2	2035,65	0	0,3	1,0/1,0	1,0/1,0	N	0	6	p.M645R/p.A 1135Qfs	0/0	10
RF_19	N	0	3,0	2	11/<80	0	140	1	0,2	1,0/1,0	1,0/1,0	N	0	3	p.M645R/p. M645R	0/0	7
RF_20	NR	0	NR	0	NR/NR	0	NR	0	NR	NR/NR	NR/NR	N	0	0	p.A1135Qfs/ 0	0/0	1

Caso RF_18 ganha dois pontos pela quantificação de cobre no tecido de 2949 µg/g de tecido seco

Anexo 8.9 Dados demográficos dos pacientes de hepatite crônica criptogênica (N=18)

Caso	Nome	Genero	Etnia	Procedência	Consanguinidade	Parentes afetados	Idade de Início	Idade diagnóstico
HC_1	LMR	F	B	Juiz de Fora (MG)	N	N	assintomático	19
HC_2	LHBJ	M	B	São Paulo (SP)	N	N	15	15
HC_3	LAC	F	B	São José dos Campos (SP)	N	N	8	8
HC_4	LMS	M	B	Barueri (SP)	-	-	assintomático	9
HC_5	CST	F	A	São Paulo (SP)	S	N	20	20
HC_6	DGS	M	B	São Paulo (SP)	N	N	29	29
HC_7	BFO	F	B	São Paulo (SP)	N	N	14	sem diagnostico
HC_8	MTF	F	B	Lupionópolis (PR)	N	N	18	sem diagnostico
HC_9	SSS	M	P	São Paulo (SP)	N	N	36	39
HC_10	PMR	M	B	Mauá (SP)	N	N	28	sem diagnostico
HC_11	LACF	M	B	Fortaleza (CE)	N	N	45	46
HC_12	ALCS	M	P	São Paulo (SP)	N	N	11	11
HC_13	DSF	M	B	São Paulo (SP)	N	1 prima	assintomático	11
HC_14	PG	F	B	São Paulo (SP)	S	1 irmã	assintomático	25
HC_15	HATNS	M	B	Santo Andre (SP)	N	1 primo	assintomático	22
HC_16	SLG	M	B	São Paulo (SP)	S	2 irmãos	assintomático	19
HC_17	PA	F	B	São Bernardo do Campo (SP)	S	2 irmãos	17	17
HC_18	FCS	M	B		N	1 primo	22	22

Anexo 8.10 Apresentação clínica dos pacientes de hepatite crônica criptogênica (N=18)

Caso	Principal Órgão	Quadro Neurológico	Quadro Hepático	CP	Outras manifestações
HC_1	fígado	-	Hepatopatia Crônica	-	-
HC_2	fígado	-	Cirrose Hepática Descompensada ascite hemorragia digestiva alta	C	-
HC_3	fígado	-	Cirrose Hepática Compensada	A	-
HC_4	fígado	-	Hepatopatia crônica	-	meningocele, hidrocefalia, hipospádia
HC_5	fígado	-	Hepatopatia Crônica	-	NR
HC_6	fígado	-	Hepatopatia crônica	-	-
HC_7	fígado	-	Hepatopatia crônica	-	-
HC_8	fígado	esquizofrenia	Hepatopatia Crônica	-	hipotireoidismo
HC_9	fígado	-	Carcinoma hepatocelular bem diferenciado	-	-
HC_10	fígado	-	Hepatopatia crônica hipertensão portal.	-	encefalopatia hepática
HC_11	fígado	-	Hepatopatia crônica	-	-
HC_12	fígado	-	Cirrose Hepática Descompensada icterícia, colúria, ascite, anasarca, ginecomastia	C	-
HC_13	assintomático	-	Hepatopatia crônica	-	-
HC_14	assintomático	-	Hepatopatia crônica	-	-
HC_15	fígado	-	Hepatopatia crônica	-	-
HC_16	fígado	-	Hepatopatia crônica	-	-
HC_17	fígado	-	Cirrose hepática descompensada ascite, icterícia	C	-
HC_18	fígado	-	Hepatopatia crônica	-	-

Anexo 8.11 Dados de propedêutica complementar dos pacientes de hepatite crônica criptogênica (N=18)

Caso	Anel KF	Escore	Cerul (mg/dL)	Escore	Cu-S (µg/dL)/ Cu-U (µg/24h)	Escore	Cu pós 1g DPA (µg/24h)	Escore	Bilir (mg/dL)	ALT (xLSN)/ AST (xLSN)	FA (xLSN)/ GGT (xLSN)	Rodanina	Escore	Escore Eurowilson	Genótipo	Polimor.	Mut. Sinônimas	Escore Eurowilson
HC_1	N	0	2,8	2	21,6/72	2	1204	0	1,0	2,9/1,7	1,1/NR	N	0	4	p.Q241X /p.L708P	p.K952R/ p.K952R	0/0	8
HC_2	N	0	5,0	2	33/14	0	NR	0	2,0	1,0/1,0	1,0/1,0	N	0	2	p.A1135Qfs/ p.E1173K	p.K952R /0; c. 3903+6 T>C/0	0/0	6
HC_3	N	0	5,0	2	NR/5,6	0	NR	0	1,0	8,6/3,8	1,0/4,8	N	0	2	p.A1135Qfs/ p.A1135Qfs	0/0	0/0	6
HC_4	NR	0	2,0	2	NR/10	0	NR	0	NR	6,2/2,8	1/1,8	S	1	3	p.A1135Qfs / p.T1232P	p.K952R /p.K952R	0/0	7
HC_5	N	0	13,0	1	41/NR	0	NR	0	2,0	1,0/1,0	1,0/1,0	N	0	1	0/0	p.K952R/0; p.A1140V/ p.A1140V; c. 3903+6 T>C/c. 3903+6 T>C; p.L456V/ p.L456V	0/0	1
HC_6	N	0	23,0	0	72/NR	0	NR	0	0,4	1,0/1,0	1,0/1,0	N	0	0	0/0	p.K952R/p.K952R ; p.A1140V/0	p.T991T/0	0
HC_7	N	0	12,0	1	42/97	2	1080	0	1,0	15,9/6,9	1,0/1,4	N	0	3	0/0	p.L456V/0; p.A1140V/0; c.2866-13G>C /c.2866-13G>C; p.L456V /p.L456V	0/0	3
HC_8	N	0	7,0	2	27/840	2	217	0	0,3	5,4/1,8	1,5/4,6	N	0	4	0/0	p.A1140V/ p.A1140V; c. 3903+6 T>C /c. 3903+6 T>C p.L456V/0; p.K952R/0; p.A1140V/0o	0/0	4
HC_9	N	0	17,0	1	51/<80	0	NR	0	2,0	2,1/4,3	1,0/1,0	S	1	2	0/0	p.K952R/0; p.A1140V/0o	0/0	2
HC_10	N	0	16,0	1	54/<80	0	1416	2	2,0	1,7/1,9	1,0/3,2	N	0	3	0/0	p.K952R/0; p.A1140V/0o	0/0	3
HC_11	N	0	2,0	2	35/75	2	NR	0	1,0	1,6/1,0	1,0/1,0	N	0	2	p.M645R/p.A1135Qfs	p.K952R /0; p.A1140V/0	0/0	6
HC_12	S	2	12,0	1	55/134	1	NR	0	1,0	4,7/6,7	2,0/2,8	N	0	4	p.A1135Qfs/ p.A1135Qfs	0/0	0/0	8
HC_13	N	0	12,0	1	10/16	0	NR	0	1,0	1,0/1,0	1,0/1,0	N	0	3	p.S921N/0	0/0	0/0	4
HC_14	N	0	6,5	2	06/28	0	NR	0	1,0	2,0/1,1	1,0/2,4	N	0	2	p.N41S/p.A1135Qfs	0/0	0/0	6
HC_15	N	0	20,0	0	81/37,1	0	528	2	1,0	1,4/1,0	1,0/1,0	N	0	2	0/0	p.L456V/0; p.A1140V/0; c. 3903+6 T>C/0-	p.A1003A/ p.A1003A	2
HC_16	N	0	2,0	2	NR/38	0	NR	0	1,0	1,7/1,0	3,7/1,0	N	0	2	p.A1135Qfs/ p.Q241X	0/0	0/0	6
HC_17	N	0	9,0	2	3/17	0	NR	0	7,0	2,3/4,8	1,4/3,0	N	0	2	p.A1135Qfs/ p.A1135Qfs	0/0	0/0	6
HC_18	N	0	16,0	1	63/17	0	472	2	1	3,8/1,4	1,0/1,5	S	1	4	p.P1273L/0	0/0	0/0	5

Caso HC_13 ganha mais pontos quantificação de cobre no tecido de 499 µg/g de tecido seco

Anexo 8.12 Dados demográficos dos pacientes de insuficiência hepática aguda grave (N=07)

Caso	Nome	Sexo	Etnia	Procedência	Consanguinidade	Parentes afetados	Idade Início	Idade diagnóstico
IHAG_1	LRG	F	B	São Paulo (SP)	S	1 irmã	18	18
IHAG_2	FAXM	M	P	São Paulo (SP)	N	NR	18	18
IHAG_3	RKO	F	A	São Paulo (SP)	N	NR	22	24
IHAG_4	RRG	F	P	São Paulo (SP)	N	1 irmão, 1 irmã	17	17
IHAG_5	NMA	F	B	Francisco Morato (SP)	N	1 irmão	22	24
IHAG_6	JMP	F	B	Itapevi (SP)	S	NR	49	50
IHAG_7	CLS	F	P	Suzano (SP)	N	NR	17	17

Anexo 8.13 Apresentação clínica dos pacientes de insuficiência hepática aguda grave (N=07)

Caso	Principal Órgão	Quadro Neurológico	Quadro Hepático	CP	Outras manifestações
IHAG_1	fígado	-	Insuficiência Hepática Aguda Grave	C	-
IHAG_2	fígado	-	Insuficiência hepática aguda grave	-	-
IHAG_3	fígado	-	Insuficiência hepática aguda grave	-	-
IHAG_4	fígado	-	Insuficiência hepática aguda grave	-	-
IHAG_5	fígado	-	Hepatopatia Crônica com evolução para insuficiência hepática aguda grave.	C	-
IHAG_6	fígado	-	Insuficiência hepática aguda grave	-	-
IHAG_7	fígado	-	Insuficiência hepática aguda grave	-	-

Anexo 8.14 Dados de propedêutica complementar dos pacientes de insuficiência hepática aguda grave (N=07)

Caso	Ane I KF	Esco re	Cerul (mg/dL)	Escore	Cu-S (µg/dL)/ Cu-U (µg/24h)	Escore	Cu pós 1g DPA (µg/24h)	Escore	Bilir (mg/dL)	ALT (xLSN)/ AST (xLSN)	FA (xLSN)/ GGT (xLSN)	Rodanina	Escore	Escore Eurowilson	Genótipo	Polimor.	Escore eurowilso n
IHAG_1	NR	0	7,0	2	NR/NR	0	NR	0	28,6	1,0/5,9	NR/NR	N	0	2	p.A1135Qf s/p.N41S	0/0	6
IHAG_2	NR	0	21,0	0	85/NR	0	NR	0	NR	NR/NR	NR/NR	N	0	0	0/0	p.L456V/0; p.K952R/0; p.A1140V/0; c. 3903+6 T>C /0 p.L456V/0; p.K952R/0;	0
IHAG_3	NR	0	25,0	0	76/NR	0	NR	0	22,2	12,3/11, 1	2,4/4,1	N	0	0	p.A1135Qf s/0	p.A1140V/p.A1140V ; c.2866- 13G>C/c.2866- 13G>C	1
IHAG_4	NR	0	14,0	1	205/NR	0	NR	0	40,6	1,0/3,8	1,0/1,5	N	0	1	p.H1069Q/ p.N1270S	0/0	5
IHAG_5	NR	0	10,0	2	71/NR	0	NR	0	40,7	1,0/2,6	1,0/1,0	S	1	3	p.D765N/p. D765N	0/0	7
IHAG_6	NR	0	20	0	84/NR	0	NR	0	41,4	10,3/14, 5	1,3/17,7	N	0	1	p.V536A/0	0/0	2
IHAG_7	NR	0	NR	0	NR/NR	0	NR	0	NR	NR/NR	NR	N	0	0	0/0	c.1707+22C>T/c.17 07+57C>T	0

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. Referências Bibliográficas

A.Członkowska, M. Rodo, G. Gromadzka, Late onset Wilson's disease: therapeutic implications, *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 23 2008 896–8

A.Krumina, J. Keiss, V. Sondore, A. Chernushenko, G. Cernevska, A. Zarina, I. Micule, L. Piekuse, M. Kreile, B. Lace, Z. Krumina, B. Rozentale, From clinical and biochemical to molecular genetic diagnosis of Wilson disease in Latvia, *Russian Journal of Genetics*, 44 2008

A.Nackley, S. Shabalina, I. Tchivileva, K. Satterfield, O. Korchynskyi, S. Makarov, W. Maixner, L. Diatchenko, Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure, *Science (New York, N.Y.)*, 314 2006 1930–3.

Al Jumah M, Majumdar R, Al Rajeh S, et al. A clinical and genetic study of 56 Saudi Wilson disease patients: identification of Saudi-specific mutations. *Eur J Neurol* 2004; 11: 121–24.

Ala A, Schilsky ML. Wilson disease: pathophysiology, diagnosis, treatment, and screening. *Clin Liver Dis*. 2004;8:787-805.

Ala A, Schilsky ML. Wilson disease: pathophysiology, diagnosis, treatment, and screening. *Clin Liver Dis*. 2004;8:787-805

Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, Schilsky ML. Wilson's disease. *Lancet*. 2007;3:397-408.

Araujo FC Doença de Wilson: a experiência de seis décadas no HC-FMUSP In Departamento de Gastroenterologia, Universidade de São Paulo, São Paulo 2004.

Banci L, Bertini I, McGreevy K, Rosato A. Molecular recognition in copper trafficking. *Natural product reports*. 2010; 27:695–710.

Barbosa ER, Culchebachi MD, Navarro JM, Scaff M, Canelas HM. Hypoattenuating lesions of the basal ganglia associated with pyramido-extrapyramidal features:report of two cases in brothers. *Arq Neuropsiquiatr*. 1986;44:55-9.

Barbosa ER, Machado AA, Cançado EL, Deguti MM, Scaff M. Wilson's disease: a case report and a historical review. *Arq Neuropsiquiatr*. 2009;67:539-43.

BEARN, AG. Genetic and Biochemical Aspects of Wilson's Disease AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE 1953 442-448

Behari M, Pardasani V. Genetics of Wilsons disease. *Parkinsonism & related disorders*. 2010; 16:639–44.

Bowcock A, Farrer L, Hebert... J. Eight closely linked loci place the Wilson disease locus within 13q14-q21 1988;

Brewer GJ, Yuzbasiyan-Gurkan V. Wilson disease. *Medicine*. 1992;71:139-64

Bruha R, Marecek Z, Pospisilova L, Nevsimalova S, Vitek L, Martasek P, Nevoral J, Petrtyl J, Urbanek P, Jiraskova A, Ferenci P. Long-term follow-up of Wilson disease: natural history, treatment, mutations analysis and phenotypic correlation. *Liver Int*. 2010; 3:83-91.

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 5:327-337

Cançado EL, Rocha Mde S, Barbosa ER, Scaff M, Cerri GG, Magalhães A, Canelas HM. Abdominal ultrasonography in hepatolenticular degeneration. A study of 33 patients. *Arq Neuropsiquiatr*. 1987;45:131-6

Canelas HM, De Jorge FB, Costa-Silva. Contribuição ao estudo do metabolismo do cobre.I: Metodologia da determinação do cobre em materiais biológicos. *Rev Paul Med.* 1962; 61:350-55.

Canelas HM, De Jorge FB, Escalante OD, Rocha-Quintão, EC. Hepatolenticular degeneration: clinical and biochemical study of three cases. *Arq Neuropsiquiatr.* 1963a; 21: 229-50.

Canelas HM, De Jorge FB, Spina-França. Contribuição ao estudo do metabolismo do cobre. II: Valores normais do cobre no sangue, líquido cefalorraqueano e urina. *Rev Paul Med.* 1963b; 62: 125-128

Canelas HM, De Jorge FB. Contribuição ao estudo da ceruloplasmina. I: Valores normais no soro sangüíneo. *Arq Neuropsiquiatr.* 1964; 22: 271-76.

Catana, V. Medici, Liver transplantation for Wilson disease, *World Journal of Hepatology*, 4 2012 5–10

D. Huster, A. Kühne, A. Bhattacharjee, L. Raines, V. Jantsch, J. Noe, W. Schirrmeister, I. Sommerer, O. Sabri, F. Berr, J. Mössner, B. Stieger, K. Caca, S. Lutsenko, Diverse functional properties of Wilson disease ATP7B variants, *Gastroenterology*, 142 2012 947–956.e5.

D. Huster, M. Hoppert, S. Lutsenko, J. Zinke, C. Lehmann, J. Mössner, F. Berr, K. Caca, Defective cellular localization of mutant ATP7B in Wilson's disease patients and hepatoma cell lines, *Gastroenterology*, 124 2003 335–45.

da Silva-Júnior FP, Machado AA, Lucato LT, Cançado EL, Barbosa ER. Copper deficiency myeloneuropathy in a patient with Wilson disease. *Neurology.* 2011a May 10;76:1673-4

de Bie P, Muller P, Wijmenga C, Klomp L. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *Journal of medical genetics*. 2007; 44:673–88.

Deguti M. Doença de Wilson: aspectos demográficos e fenotípicos relacionados ao genótipo ATP7B e estudo do haplótipo em portadores da mutação. In Departamento de Gastroenterologia, Universidade de São Paulo, São Paulo 2004.

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

E. Margarit, V. Bach, D. Gómez, M. Bruguera, P. Jara, R. Queral, F. Ballesta, Mutation analysis of Wilson disease in the Spanish population -- identification of a prevalent substitution and eight novel mutations in the ATP7B gene, *Clinical Genetics*, 68 2005 61–8.

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

E. Roberts, “Not so rare” Wilson disease, *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 37 (2013) 219–21.

E. Roberts, M. Schilsky, Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update, *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 47 (2008) 2089–111.

E. Waldenström, A. Lagerkvist, T. Dahlman, K. Westermarck, U. Landegren, Efficient detection of mutations in Wilson disease by manifold sequencing, *Genomics*, 37 1996 303–9

EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease, *Journal of Hepatology*, 56 (2012) 671–85

F. Dufernez, A. Lachaux, P. Chappuis, L. De Lumley, M. Bost, F. Woimant, M. Misrahi, D. Debray, Wilson disease in offspring of affected patients: report of four French families, *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 37 2013 240–5.

Ferenci P, Caca K, Loudianos G, Mieli-Vergani G, Tanner S, Sternlieb I, Schilsky M et al. Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. *Liver Int.* 2003;23: 139-42.

Ferenci P, Steindl-Munda P, Vogel W, Jessner W, Gschwantler M, Stauber R, Datz C, Hackl F, Wrba F, Bauer P, Lorenz O. Diagnostic value of quantitative hepatic copper determination in patients with Wilson's Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005;3:811-8

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

Ferenci P. Regional distribution of mutations of the ATP7B gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing. *Human genetics.* 2006; 120:151–9

Fleischer B Zwei weitere Fälle von grünliche Verfärbung der Kornea. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1903 41:489-491

Frydman M, Bonn-Tamir B, Farrer... L. Assignment of the gene for Wilson disease to chromosome 13: linkage to the esterase D locus 1985

G. Loudianos, A. Zappu, M. Lepori, S. Incollu, V. Dess, E. Mameli, G. Garrucciu, S. De Virgiliis, A. Cao, Wilson's disease in two consecutive generations: the detection of three mutated alleles in the ATP7B gene in two Sardinian families, *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of*

Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver, 45 2013 342–5.

García-Villarreal L, Daniels S, Shaw S, Cotton D, Galvin M, Geskes J, et al. High prevalence of the very rare Wilson disease gene mutation Leu708Pro in the Island of Gran Canaria (Canary Islands, Spain): a genetic and clinical study. *Hepatology* (Baltimore, Md.). 2000; 32:1329–36.

Gow PJ, Smallwood RA, Angus PW, Smith AL, Wall AJ, Sewell RB. Diagnosis of Wilson's disease: an experience over three decades. *Gut*. 2000;46:415- 19.

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

Gromadzka G, Rudnicka M, Chabik G, Przybyłkowski A, Członkowska A. Genetic variability in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) affects clinical expression of Wilson's disease. *J Hepatol*. 2011;55:913-9

Gromadzka G, Schmidt HH, Genschel J, Bochow B, Rodo M, Tarnacka B, Litwin T, Chabik G, Członkowska A: Frameshift and nonsense mutations in the gene for ATPase7B are associated with severe impairment of copper metabolism and with an early clinical manifestation of Wilson's disease. *Clin Genet*. 2005; 68:524-32.

Grubenbecher S, Stuve O, Hefter H, Korth C. Prion protein gene codon 129 modulates clinical course of neurological Wilson's disease. *Neuroreport* 2006;17:549–52

Gu M, Cooper JM, Butler P, Walker AP, Mistry PK, Dooley JS, Schapira AH. Oxidative-phosphorylation defects in liver of patients with Wilson's disease. *Lancet*. 2000;356:469-74.

H. Schmidt, Role of genotyping in Wilson's disease, *Journal of Hepatology*, 50 (2009) 449–52.

Hall HC La dégénérescence hépato-lenticulaire: Maladie de Wilson-

Harris ED. Cellular copper transport and metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2000;20: 291-10

HÖSSL, C.; ALZHEIMER, A. Ein Beitrag zur Klinik und pathologischen Anatomie der Westphal-Strümpellschen Pseudosklerose. 1912

Huster D. Wilson disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010;24:531-9

J. Bennett, S. Hahn, Clinical molecular diagnosis of Wilson disease, *Seminars in Liver Disease*, 31 (2011) 233–38

J. Forbes, D. Cox, Functional characterization of missense mutations in ATP7B: Wilson disease mutation or normal variant?, *American Journal of Human Genetics*, 63 1998 1663–74.

J. Foruny, D. Boixeda, A. López-Sanroman, E. Vázquez-Sequeiros, M. Villafruela, M. Vázquez-Romero, M. Rodríguez-Gandía, C. de Argila, C. Camarero, J. Milicua, Usefulness of penicillamine-stimulated urinary copper excretion in the diagnosis of adult Wilson's disease, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 43 2007 597–03.

J. McDonald, P. Snitch, D. Painter, W. Hensley, N. Gallagher, G. McCaughan, Striking variability of hepatic copper levels in fulminant hepatic failure, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 7 1991 396–98.

J. Nair, P. Carmichael, R. Fernando, D. Phillips, A. Strain, H. Bartsch, Lipid peroxidation-induced etheno-DNA adducts in the liver of patients with the genetic metal storage disorders Wilson's disease and primary hemochromatosis, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: a Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 7 1998 435–40.

J. Trocello, E. Corbillon, F. Bourdain, J. Xie..., Maladie de Wilson Protocole national de diagnostic et de soins Les points importants pour le neurologue, *Pratique Neurologique-FMC*. 2010 1(3):208-216

J. Yasuda, H. Eguchi, N. Fujiwara, T. Ookawara, S. Kojima, Y. Yamaguchi, M. Nishimura, J. Fujimoto, K. Suzuki, Reactive oxygen species modify oligosaccharides of glycoproteins in vivo: a study of a spontaneous acute hepatitis model rat (LEC rat). *Biochemical and biophysical research communications*. 2006; 342:127–34.

Johnson PE, Milne DB, Lykken GI. Effects of age and sex on copper absorption, biological half-life, and status in humans. *Am J Clin Nutr*. 1992; 56: 917-25

Jones, C.E., Klewpatinond, M., Abdelraheim, S.R., Brown, D.R. and Viles, J.H. Probing copper²⁺ binding to the prion protein using diamagnetic nickel²⁺ and ¹H NMR: the unstructured N terminus facilitates the coordination of six copper²⁺ ions at physiological concentrations. *J. Mol. Biol*. 2005 **346**, 1393–07

K. Barada, M. El-Atrache, I. El-Hajj, K. Rida, J. El-Hajjar, Z. Mahfoud, J. Usta, Homozygous mutations in the conserved ATP hinge region of the Wilson disease gene: association with liver disease, *Journal of Clinical Gastroenterology*, 44 2010 432–9.

K. Caca, P. Ferenci, H. Kühn, C. Polli, H. Willgerod B. Kunath, W. Hermann; J. Mossner, F. Berr, High prevalence of the H1069Q mutation in East German patients with Wilson disease: rapid detection of mutations by limited sequencing and phenotype–genotype analysis *Journal of Hepatology* 35 2001 575–581

Kayser B Ueber einen Fall von angeborener grünlicher Verfärbung der Cornea. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1902 40:22-25

Kenney S, Cox D. Sequence variation database for the Wilson disease copper transporter, ATP7B. *Human mutation*. 2007; 28:1171–77

Korman, I. Volenberg, J. Balko, J. Webster, F. Schiodt, R. Squires, R. Fontana, W. Lee, M. Schilsky, Screening for Wilson disease in acute liver failure: a comparison of currently available diagnostic tests, *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 48 (2008) 1167–74.

Kumar S, Thapa BR, Kaur G, Prasad R. Identification and molecular characterization of 18 novel mutations in the ATP7B gene from Indian Wilson disease patients: genotype. *Clin Genet* 2005; 67: 443–45

L. Cartegni, S. Chew, A. Krainer, Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing, *Nature Reviews. Genetics*, 3 2002 285–98.

L. Kucinkas, J. Jeroch, A. Vitkauskiene, R. Sakalauskas, V. Petrenkiene, V. Kucinkas, R. Naginiene, H. Schmidt, L. Kupcinkas, High frequency of the c3207C>A (pH1069Q) mutation in ATP7B gene of Lithuanian patients with hepatic presentation of Wilson's disease, *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 14 2008 5876–79.

Lang PA, Schenck M, Nicolay JP, Becker JU, Kempe DS, Lupescu A, Koka S, Eisele K, Klarl BA, Rübber H, Schmid KW, Mann K, Hildenbrand S, Hefter H, Huber SM, Wieder T, Erhardt A, Häussinger D, Gulbins E, Lang F. Liver cell death and anemia in Wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide. *Nat Med*. 2007;13: 164-70

Liu XQ, Zhang YF, Liu TT, Hsiao KJ, Zhang JM, Gu XF, Bao KR, Yu LH, Wang MX. Correlation of ATP7B genotype with phenotype in Chinese patients with Wilson disease. *World J Gastroenterol*. 2004;10: 590-3

Loudianos G, Dessì V, Lovicu M, Angius A, Nurchi A, Sturniolo G, et al. Further delineation of the molecular pathology of Wilson disease in the Mediterranean population. *Human mutation*. 1997; 12:89–94.

Lutsenko S, Gupta A, Burkhead J, Zuzel V. Cellular multitasking: the dual role of human Cu-ATPases in cofactor delivery and intracellular copper balance. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2008; 476:22–32.

Lutsenko S. Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways. [Internet]. *Current opinion in chemical biology*. 2010; 14:211–7.

M. Eilers, S. Shekar, T. Shieh, S. Smith, P. Fleming, Internal packing of helical membrane proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 2000 5796–801.

M. Sato, J. Gitlin, Mechanisms of copper incorporation during the biosynthesis of human ceruloplasmin, *The Journal of Biological Chemistry*, 266 1991 5128–34.

M. Wiggelinkhuizen, M. Tilanus, C. Bollen, R. Houwen, Systematic review: clinical efficacy of chelator agents and zinc in the initial treatment of Wilson disease, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 29 2009 947–58.

Machado AA, Deguti MM, Genschel J, Cançado EL, Bochow B, Schmidt H, Barbosa ER. Neurological manifestations and ATP7B mutations in Wilson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2008;14: 246-9

Machado, H. Chien, M. Deguti, E. Cançado, R. Azevedo, M. Scaff, E. Barbosa, Neurological manifestations in Wilson's disease: Report of 119 cases, *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 21 2006 2192–6.

Mak CM, Lam CW, Tam S. Diagnostic accuracy of serum ceruloplasmin in Wilson disease: determination of sensitivity and specificity by ROC curve analysis among ATP7B-genotyped subjects. *Clin Chem*. 2008;54: 1356-62.

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: 609-615.

Medici V, Rossaro L, Sturniolo GC. Wilson disease--a practical approach to diagnosis, treatment and follow-up. *Dig Liver Dis*. 2007 ; 39 :601-09

Mehta SH, Parekh SM, Prakash R, Morgan JC, Miyajima H, Sethi KD. Predominant ataxia, low ceruloplasmin, and absent K-F rings: hypoceruloplasminemia or Wilson's disease. *Mov Disord*. 2010 ; 25: 2260-1.

Mercer J, Livingston J, Hall B, Paynter J, Begy C, Chandrasekharappa S, et al. Isolation of a partial candidate gene for Menkes disease by positional cloning. *Nature genetics*. 1992 20-25

Merle U, Schaefer M, Ferenci P, Stremmel W. Clinical presentation, diagnosis and long-term outcome of Wilson's disease: a cohort study. *Gut*. 2007;56: 115-20.

Milkiewicz P, Saksena S, Hubscher SG, Elias E. Wilson's disease with superimposed autoimmune features: report of two cases and review. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000;15: 570-4

Mufti AR, Burstein E, Csomos RA, Graf PC, Wilkinson JC, Dick RD, Challa M, Son JK, Bratton SB, Su GL, Brewer GJ, Jakob U, Duckett CS. XIAP Is a copper binding protein deregulated in Wilson's disease and other copper toxicosis disorders. *MolCell*. 2006;21: 775-85

Muller P, van Bakel H, van de Sluis B, Holstege F, Wijmenga C, Klomp LW. Gene expression profiling of liver cells after copper overload in vivo and in vitro reveals new copper-regulated genes. *J Biol Inorg Chem*. 2007;12: 495-507.

- Nathan BP, Chang KC, Bellosta S, Brisch E, Ge N, Mahley RW, Pitas RE. The inhibitory effect of apolipoprotein E4 on neurite outgrowth is associated with microtubule depolymerization. *J Biol Chem*. 1995 ; 270:19791-99
- Nazer H, Ede RJ, Mowat AP, Williams R. Wilson's disease: clinical presentation and use of prognostic index. *Gut*. 1986;27:1377-81.
- Okada T, Shiono Y, Hayashi H, Satoh H, Sawada T, Suzuki A, et al. Mutational analysis of ATP7B and genotype-phenotype correlation in Japanese with Wilson's disease. *Human mutation*. 1999; 15:454–62.
- Palsson R, Jonasson J, Kristjansson... M. Genotype-phenotype interactions in Wilson's disease: insight from an Icelandic mutation. 2001.
- Panagiotakaki E, Tzetis M, Manolaki N, Loudianos G, Papatheodorou A, Manesis E, Nousia-Arvanitakis S, Syriopoulou V, Kanavakis E. Genotype-phenotype correlations for a wide spectrum of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B). *Am J Med Genet A*. 2004 ; 131:1 68-73
- Petrukhin K, Lutsenko S, Chernov I, Ross BM, Kaplan JH, Gilliam TC. Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure/function predictions. *Hum Mol Genet*. 1994;3: 1647-56
- Pilloni L, Lecca S, Van Eyken P, Flore C, Demelia L, Pilleri G, Nurchi AM, Farci AM, Ambu R, Callea F, Faa G. Value of histochemical stains for copper in the diagnosis of Wilson's disease. *Histopathology*. 1998;33: 28-33.
- 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- 78
- pseudosclérose. In. Masson et Cie, Paris, 1921 pp 190-92

R. Bem, D. Muzzillo, M. Deguti, E. Barbosa, L. Werneck, H. Teive, Wilson's disease in southern Brazil: a 40-year follow-up study, *Clinics (São Paulo, Brazil)*, 66 2010 411–16

Roberts EA, Sarkar B. Liver as a key organ in the supply, storage, and excretion of copper. *Am J Clin Nutr.* 2008;88: 851S-54S

Rodriguez-Granillo A, Sedlak E, Wittung-Stafshede P. Stability and ATP binding of the nucleotide-binding domain of the Wilson disease protein: effect of the common H1069Q mutation. [Internet]. *Journal of molecular biology.* 2008; 383:1097–111

Rosencrantz R & Schilsky M. Wilson disease: pathogenesis and clinical considerations in diagnosis and treatment. *Semin Liver Dis.* 2011;31: 245-59.

S. Kenney, D. Cox, Sequence variation database for the Wilson disease copper transporter, ATP7B, *Human Mutation*, 28 2007 1171–7.

Schaefer M, Roelofsen H, Wolters H, Hofmann WJ, Müller M, Kuipers F, Stremmel W, Vonk RJ. Localization of the Wilson's disease protein in human liver. *Gastroenterology.* 1999;117:1380-85

Scheinberg, IH. Sternlieb I. Wilson's disease. *Major problems in internal medicine.*, ed. L. Smith. 1984, Philadelphia: WB Saunders.

Schiefermeier M, Kollegger H, Madl C, Polli C, Oder W, Kühn H, et al. Impact of apolipoprotein E genotypes on age at onset of symptoms and phenotypic expression in Wilson's disease. *Brain.* 2000;123:585-90

Shah AB, Chernov I, Zhang HT, Ross BM, Das K, Lutsenko S, et al. Identification and analysis of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B):population frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analyses. *Am J Hum Genet.* 1997; 61: 317-28

Shim H, Harris ZL. Genetic defects in copper metabolism. *J Nutr.* 2003; 133: 1527S-31S.

Stapelbroek JM, Bollen CW, van Amstel JK, van Erpecum KJ, van Hattum J, van den Berg LH, Klomp LW, Houwen RH. The H1069Q mutation in ATP7B is associated with late and neurologic presentation in Wilson disease: results of a meta-analysis. *J Hepatol.* 2004;41: 758-63

Steindl P, Ferenci P, Dienes HP, Grimm G, Pabinger I, Madl C, et al. A. Wilson's disease in patients presenting with liver disease: a diagnostic challenge. *Gastroenterology.* 1997;113:212-18.

Strümpell A Ueber die Westphal'sche Pseudosklerose und über diffuse Hirnsklerose, insbesondere bei Kindern. *Dtsch Z Nervenheilkd* 1899

T. Maier-Dobersberger, C. Mannhalter, S. Rack, G. Granditsch, K. Kaserer, L. Korninger, P. Steindl, A. Gangl, P. Ferenci, Diagnosis of Wilson's disease in an asymptomatic sibling by DNA linkage analysis, *Gastroenterology*, 109 1995 2015–18.

T. Okada, Y. Shiono, Y. Kaneko, K. Miwa, K. Hasatani, Y. Hayashi, H. Mibayashi, H. Aoyagi, S. Tsuji, M. Yoshimitsu, H. Hayashi, M. Yamagishi, High prevalence of fulminant hepatic failure among patients with mutant alleles for truncation of ATP7B in Wilson's disease, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 45 2010 1232–37.

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

Tao T, Gitlin J. Hepatic copper metabolism: insights from genetic disease. *Hepatology* (Baltimore, Md.). 2003; 37:1241–47.

U. Merle, K. Weiss, C. Eisenbach, S. Tuma, P. Ferenci, W. Stremmel, Truncating mutations in the Wilson disease gene ATP7B are associated with very low serum ceruloplasmin oxidase activity and an early onset of Wilson disease, *BMC Gastroenterology*, 10 2009 :8.

van den Berghe PV, Stapelbroek JM, Krieger E, de Bie P, van de Graaf SF, de Groot RE, van Beurden E, Spijker E, Houwen RH, Berger R, Klomp LW. Reduced expression of ATP7B affected by Wilson disease-causing mutations is rescued by pharmacological folding chaperones 4-phenylbutyrate and curcumin. *Hepatology*. 2009;50: 1783-95

Verghese PB, Castellano JM, Holtzman DM. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol*. 2011;10:241-52.

Vieira J, Oliveira PV, Juliano Y, Warde KR, Deguti MM, Barbosa ER, Carrilho FJ, Cancado EL. Urinary copper excretion before and after oral intake of d-penicillamine in parents of patients with Wilson's disease. *Dig Liver Dis*. 2012; 44: 323-27.

Vrabelova S, Letocha O, Borsky M, Kozak L. Mutation analysis of the ATP7B gene and genotype/phenotype correlation in 227 patients with Wilson disease. *Mol Genet Metab*. 2005;86: 277-85

Vulpe C, Levinson B, Whitney S, Packman S, Gitschier J. Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase *Nature genetics*. 1992; 3:7–13

W. Arruda, R. Munhoz, R. de Bem, M. Deguti, E. Barbosa, J. Zavala, H. Teive, Pathogenic compound heterozygous ATP7B mutations with

hypoceruloplasminaemia without clinical features of Wilson's disease, *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 2013;21(2):335-36

W. Oh, E. Kim, K. Park, S. Hahn, O. Yoo, Cloning and Characterization of the Promoter Region of the Wilson Disease Gene, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999. 206–11

Walshe JM. Diagnostic significance of reduced serum caeruloplasmin concentration in neurological disease. *Mov Disord*. 2005;20: 1658-61

Weiss KH, Wurz J, Gotthardt D, Merle U, Stremmel W, Füllekrug J. Localization of the Wilson disease protein in murine intestine. *J Anat*. 2008;213: 232-40

Werlin SL, Grand RJ, Perman JA, Watkins JB. Diagnostic dilemmas of Wilson's disease: diagnosis and treatment. *Pediatrics*. 1978;62:47-51

Westphal CFO Ueber eine dem Bilde der cerebrospinalen grauen Degeneration ähnliche Erkrankung des centralen Nervensystems ohne anatomischen Befund, nebst einigen Bemerkungen über paradoxe Contraction. *Arch Psychiatr Nervenkr* 1883 14:87-134, 767-69.

Wilson, SAK. Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain*. 1912;34:295-04

Y. Clark, T. Collazo, C. Ruenes, E. García, Z. Robaina, T. Fragoso, G. Rodríguez, Y. Piloto, G. Espinosa, C. Maragoto, Detección de cambios conformacionales y mutaciones en el exón 8 del gen *atp7b* en pacientes cubanos con la enfermedad de Wilson, *Biotecnología Aplicada*, 28 2011 87–90.

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 197:271-77

Yener S, Akarsu M, Karacanci C, Sengul B, Topalak O, Biberoglu K, Akpinar H. Wilson's disease with coexisting autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004;19: 114-16

Z. Sauna, C. Kimchi-Sarfaty, Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease, *Nature Reviews. Genetics*, 12 2011 683–91.