

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RICARDO SCHMITT DE BEM

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E GENÉTICA DE UMA AMOSTRA
SUL-BRASILEIRA DE PACIENTES COM DOENÇA DE WILSON**

**CURITIBA
2011**

RICARDO SCHMITT DE BEM

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E GENÉTICA DE UMA AMOSTRA
SUL-BRASILEIRA DE PACIENTES COM DOENÇA DE WILSON**

**Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Medicina Interna do Hospital de Clínicas da
Universidade Federal do Paraná como requisito
parcial para obtenção do grau acadêmico de
doutor.**

Orientador: Profº Drº Hélio Afonso Ghizoni Teive

**Co-orientadora: Profª Drª Dominique Araújo
Muzzillo**

**CURITIBA
2011**



PARECER

Aos vinte e nove dias do mês de abril do ano de dois mil e onze, a banca examinadora constituída pelos Professores Doutores: **Marta Mitiko Deguti, Egberto Reis Barbosa, Salmo Raskin, Odery Ramos Junior e Helio Afonso Ghizoni Teive**, exarou o presente parecer sobre a tese elaborada por **RICARDO SCHMITT DE BEM**, aluno concluinte do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde – nível Doutorado, da Universidade Federal do Paraná, intitulada: "AVALIAÇÃO CLÍNICA E GENÉTICA DE UMA AMOSTRA SUL-BRASILEIRA DE PACIENTES COM DOENÇA DE WILSON". A Banca examinadora considerou que **RICARDO SCHMITT DE BEM**, apresentou trabalho adequado para tese e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua aprovação, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de Doutor em Medicina Interna e Ciências da Saúde e a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

Curitiba, 29 de abril de 2011.

Dra. Marta Mitiko Deguti

Dr. Egberto Reis Barbosa

Dr. Salmo Raskin

Dr. Odery Ramos Junior

Dr. Helio Afonso Ghizoni Teive

*“Procure ser um homem de valor, em vez de ser um homem de sucesso”
Albert Einstein*

AGRADECIMENTOS

Terminada mais esta caminhada, desejo creditar a algumas pessoas e instituições boa parte dos méritos que possam existir neste trabalho acadêmico.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, na pessoa do Dr. Hélio Afonso Ghizoni Teive.

Agradeço profundamente a competente orientação do Dr. Hélio Afonso Ghizoni Teive, pelo auxílio, disponibilidade de tempo e material, atuando sempre de forma incentivadora e positiva.

Um agradecimento a co-orientadora, Dra. Dominique Araújo Muzzillo, que propiciou o aprendizado aprimorado na avaliação clínica dos pacientes deste estudo.

Um especial agradecimento a equipe do Laboratório de Medicina Tropical do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, nas pessoas da Dra. Marta Mitiko Deguti, Thiago Ferreira Araújo e Maria Cristina Nakhle, que viabilizaram a realização dos procedimentos deste estudo com a maior competência e boa vontade.

Agradeço ao Dr. Salmo Raskin, do Laboratório Genetika Curitiba, pela incansável contribuição e auxílio científico no diagnóstico clínico e laboratorial de pacientes deste estudo.

Ressalto, ainda, a brilhante contribuição exercida por todos os meus professores, mestres e doutores, que me acompanharam durante minha formação acadêmica e pós-graduação.

Agradeço aos Doutores Viviane de Hiroki Flumignan Zétola, Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza e Maria Lucia Alves Pedroso pela avaliação detalhada e determinação de críticas construtivas que viabilizaram o engrandecimento desta tese.

Não posso esquecer de forma alguma a razão deste trabalho: um agradecimento aos meus pacientes e seus familiares, pela confiança, receptividade e cooperação no exercício da ciência, aderindo ao estudo em todos os aspectos em que foram requisitados.

Finalmente, não tenho palavras para agradecer minha família e minha esposa, pelo ambiente de carinho, amor, compreensão, solidariedade e apoio, sempre acreditando e incentivando a realização dos meus sonhos.

RESUMO

A doença de Wilson (DW), distúrbio herdado com caráter autossômico recessivo, caracteriza-se pela deficiência de excreção de cobre pelo fígado, originária de mutações do gene *ATP7B*. Foram descritas mais de 400 diferentes mutações causadoras da doença e existem escassas informações sobre o comportamento genético da DW no Brasil.

Este estudo objetiva analisar uma amostra de 36 pacientes com DW provenientes da população sul-brasileira, avaliando as mutações *ATP7B*, as manifestações fenotípicas, caracterizando a região geográfico-continental da família e antepassados e comparando os padrões de manifestações geno-fenotípicas encontrados nesta casuística com os descritos no Brasil e no mundo.

A idade média no início dos sintomas foi de $23,3 \pm 9,3$ anos, com um atraso médio de $27,5 \pm 41,9$ meses para o diagnóstico definitivo. O tempo médio entre o início dos primeiros sintomas clínicos e o diagnóstico definitivo foi $18,5 \pm 12,4$ meses na forma neurológica; $6,7 \pm 5,8$ meses na hepática e; de $51 \pm 59,6$ meses na mista. Houve diferença estatística significativa no intervalo de tempo para o diagnóstico entre a forma hepática e as demais ($p=0,02$ neurológica e $p=0,004$ mista). Ao diagnóstico, nove pacientes (25%) apresentavam quadro clínico exclusivamente neurológico, 14 (38,9%) exclusivamente hepático, 11 (30,6%) características neurológicas e hepáticas (apresentação mista) e 2 (5,5%) eram assintomáticos. Anéis de Kayser-Fleischer foram identificados em 55,6%, com maior frequência nos pacientes com quadro neurológico (77,8%). Dezoito pacientes desenvolveram manifestações neuro-psiquiátricas e alterações neuro-radiológicas foram observadas em 72,2% destes. Doença hepática crônica foi identificada em 68% dos pacientes com manifestação hepática. O tratamento com D-penicilamina foi instituído para 94,2% dos pacientes. Outras terapias empregadas foram os sais de zinco, combinação de drogas e transplante hepático (TH). Após o início do tratamento, 78,8% evoluíram com um quadro estável ou apresentaram melhora clínica e a taxa de sobrevivência global foi de 90,1%. A quase totalidade dos pacientes apresentava ascendência europeia através de pelo menos um dos seus ancestrais. Foram descritos os genótipos em 23 pacientes desta amostra. Encontraram-se 14 mutações diferentes em pelo menos um dos alelos, sendo 2 novas mutações potencialmente causadoras de doença. A substituição c.3207C>A no éxon 14 foi a mais frequente mutação encontrada, com frequência alélica de 28,3%, seguida da mutação c.3402delC no éxon 15, com frequência alélica de 8,7%.

As duas mutações mais frequentes respondem por 37% dos alelos estudados, indicando que estes éxons são importantes para a detecção de mutações em pacientes da população sul-brasileira. Este é o primeiro estudo que avaliou a correlação genótipo/fenótipo de pacientes com DW no sul do Brasil e possibilitou a determinação de um padrão genotípico semelhante ao europeu e diferente do previamente descrito para a população brasileira.

Palavras-chave: Degeneração hepatolenticular. Genética. Mutação - Genética. Fenótipo.

ABSTRACT

Wilson's disease (WD), an inherited autosomal recessive illness, is characterized by the impaired copper excretion and triggered by a mutation of the *ATP7B* gene. Over 400 different disease-causing mutations were already described and there are only few reports of WD genetics' behavior in Brazil.

The aim of this study was to analyze a sample of 36 WD patients from the south of Brazil, *ATP7B* mutations, the phenotypic features, characterizing the continental-geographical origin of relatives and ancestors and comparing the genotypic and phenotypic patterns of this study with the ones previously described in Brazil and in the world.

The mean age at initial symptom presentation was $23,3 \pm 9,3$ years with $27,5 \pm 41,9$ months delay until definitive diagnosis. The mean time between the initial symptom and the definitive diagnosis was $18,5 \pm 12,4$ months in the neurological form; $6,5 \pm 5,8$ months in the hepatic one and $51 \pm 59,6$ months in the mixed one. There was a statistically significant difference in the delay until definitive diagnosis of the hepatic form compared to the other ones ($p=0,02$ neurological; $p=0,004$ mixed form). At presentation, nine patients (25%) presented exclusive neurological clinical features, 14 (38,9%) exclusively hepatic ones, 11 (30,6%) hepatic and neurologic ones (mixed presentation) and two (5,5%) were asymptomatic. Kayser-Fleischer rings were identified in 55,6%, with a higher frequency among those with neuropsychiatric symptoms (77,8%). Eighteen patients developed neuropsychiatric features and neuroradiological imaging abnormalities were observed in 72,2% of them. Chronic liver disease was detected in 68% of the patients with hepatic symptoms. Treatment with D-penicillamine was started with 94,2% of the patients. Other employed therapies were zinc salts, combined drugs and liver transplantation. After initiating therapy, 78,8% had a stable or improved outcome and the overall survival rate was 90,1%. Almost all patients presented European ancestry through at least one of their ancestors. The genetic profile was determined in 23 WD patients of this sample. Fourteen different mutations were found in at least one of the alleles, being two of them novel potentially disease-causing mutations. The most frequent mutation was the c.3207C>A substitution at exon 14, with an allelic frequency of 28,3%, followed by the c.3402delC at exon 15, with an allelic frequency of 8,7%.

The two most frequent mutations account for 37% of the analyzed alleles, therefore indicating that these exons are important for the detection of mutations in south Brazilian WD patients. This is the first study which evaluated the genotypic/phenotypic correlation among southern Brazil WD patients and allowed the determination of a genotypic pattern similar to the European one and different from the previously ones described for the Brazilian population.

Key words: Hepatolenticular degeneration. Genetics. Mutation - Genetics. Phenotype.

LISTA DE ABREVIações

AKF	- Anel de Kayser-Fleisher
ANA	- Anticorpo anti nuclear
Anti LKM-1	- Anticorpo anti microssomal de fígado-rim do tipo 1
Anti-ML	- Anticorpo anti músculo-liso
Anti-MT	- Anticorpo anti mitocondrial
ALT	- Alanina aminotransferase
AST	- Aspartato aminotransferase
ATP	- Adenosina trifosfato
BANPESQ	- Banco de Pesquisas Universidade Federal do Paraná
BD	- Bilirrubina direta
BH	- Biópsia hepática
BI	- Bilirrubina indireta
BT	- Bilirrubina total
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
CLP	- Ceruloplasmina
DW	- Doença de Wilson
FA	- Fosfatase alcalina
GGT	- Gama glutamil-transferase
Hb	- Hemoglobina
HC	- Hospital de Clínicas
HE	- Hematoxilina-eosina
Lc	- Leucócitos
ME	- Microscopia eletrônica
MO	- Microscopia óptica
PAS	- Ácido periódico de Schiff
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
Pt	- Plaquetas
SH	- Serviço de Hepatologia
SN	- Serviço de Neurologia
TAP	- Tempo atividade da protrombina
TG	- Teste genéticos
TH	- Transplante hepático
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
VG	- Volume globular
VHB	- Vírus da hepatite B
YAC	- Cromossomo artificial de leveduras

LISTA DE SÍMBOLOS

%	- Porcento
<	- Menor que
>	- Maior que
±	- Mais ou menos
®	- Marca registrada
°C	- Graus Celsius
µg	- Micrograma
µg/dl	- Micrograma por decilitro
µl	- Microlitro
µmol/g	- Micromol por grama
AgNO ₃	- Nitrato de prata
Cu	- Cobre
dH ₂ O	- Água destilada
g	- Grama
HCl	- Ácido clorídrico
HNO ₃	- Ácido nítrico
Log	- Logaritmo
M	- Moles
mEq/l	- Miliequivalente por litro
mg/dl	- Miligrama por decilitro
MgCl	- Cloreto de magnésio
min	- Minutos
mM	- Mili moles
mUI/l	- Miliunidade por litro
Na ₂ CO ₃	- Carbonato de sódio
NaCl	- Cloreto de sódio
ng/dl	- Nanograma por decilitro
nm	- Nanômetros
pg/ml	- Picograma por mililitro
pM	- Pico moles
rpm	- Rotações por minuto
s	- Segundos
UI/ml	- Unidade por mililitro
V	- Volts
Zn	- Zinco

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	SOLUÇÕES DAS PCRs CONVENCIONAIS DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DO GENE <i>ATP7B</i>	29
TABELA 2	<i>PRIMERS</i> , PROTOCOLOS E TAMANHO DOS PRODUTOS DAS PCRs DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DO GENE <i>ATP7B</i> POR PCR CONVENCIONAL.....	30
TABELA 3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS.....	33
TABELA 4	RESULTADOS DO ESTUDO DE ANATOMIA PATOLÓGICA HEPÁTICA DOS CASOS DE DW.....	34
TABELA 5	GRUPOS CONTINENTAIS E ORIGEM GEOGRÁFICA.....	35
TABELA 6	CARACTERÍSTICAS DAS MUTAÇÕES DO GENE <i>ATP7B</i>	38
TABELA 7	ORIGEM GEOGRÁFICA-CONTINENTAL E CORRELAÇÃO GENOTÍPICA.....	39
TABELA 8	GENOTIPAGEM <i>ATP7B</i> E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS EM 23 PACIENTES SUL-BRASILEIROS COM DW.....	40
TABELA 9	MUTAÇÕES DO GENE <i>ATP7B</i> EM AMOSTRAS DE PACIENTES COM DW EM DIFERENTES PAÍSES.....	52

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	METABOLISMO DO COBRE EM HUMANOS.....	16
FIGURA 2	ANEL DE KAYSER-FLEISCHER.....	19
FIGURA 3	CATARATA EM GIRASSOL.....	19
FIGURA 4	ESTRUTURA BIDIMENSIONAL DA PROTEÍNA ATP7B HUMANA.....	22

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de abreviações

Lista de símbolos

Lista de tabelas

Lista de figuras

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
3 OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL	24
3.2.OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	24
4 PACIENTES E MÉTODOS	25
4.1 CLASSIFICAÇÃO DO TIPO DE PESQUISA	25
4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA	25
4.3 METODOLOGIA	25
5 RESULTADOS	32
5.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	32
5.2 ORIGEM GEOGRÁFICA – GRUPOS CONTINENTAIS – ASPECTOS SOCIAIS ...	34
5.3 TRATAMENTO E EVOLUÇÃO CLÍNICA	36
5.4 ANÁLISE GENÉTICA	37
6 DISCUSSÃO	41
7 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	56
APÊNDICES	66

1 INTRODUÇÃO

O cobre é um elemento fundamental no organismo humano e apresenta relação direta em diversas funções orgânicas, tais como: atividade mitocondrial, biossíntese da melanina, metabolismo da dopamina, homeostase do ferro, ação anti-oxidante, formação do tecido conectivo, entre outras (CULOTTA *et al.*, 2001). Com o objetivo de evitar a toxicidade celular ocasionada pelo cobre, diversos mecanismos permitem a circulação, compartimentalização e excreção deste elemento no organismo, de modo a assegurar que todas as reações que tenham sua dependência ocorram de maneira harmônica (SCHIERFERMEIER *et al.*, 2000).

A doença de Wilson (DW) é um distúrbio herdado com caráter autossômico recessivo que se caracteriza por uma alteração da capacidade de excreção do cobre do organismo com o seu conseqüente acúmulo sistêmico e predileção por alguns sítios corporais. A identificação e isolamento do gene da DW no ano de 1993, designado *ATP7B*, permitiu maior entendimento da gravidade que os erros no metabolismo do cobre podem ocasionar (TANZI *et al.*, 1993), inclusive com desfechos patológicos no fígado, cérebro, rins, olhos e articulações (SCHILSKY *et al.*, 2005).

Os testes genéticos, ou seja, a pesquisa das mutações no gene *ATP7B*, têm extrema aplicabilidade na detecção de pacientes acometidos e famílias portadoras, sendo que o tratamento dietético e farmacológico deve ser instituído tão logo o diagnóstico seja realizado, uma vez que a doença tem comportamento agressivo e em alguns casos a evolução pode ser fatal (SCHILSKY *et al.*, 2005).

Estudos epidemiológicos preliminares demonstraram a raridade da doença, acometendo aproximadamente 1 a cada 30.000 indivíduos. Considerando-se esta taxa, estima-se que existam 6000 casos da doença no Brasil. Mais de 400 mutações foram descritas até o momento, a maioria delas identificadas em heterozigose composta (COX *et al.*, 2009). Esta heterogeneidade acarreta dificuldades em se traçar um paralelo entre a apresentação genética e a expressão fenotípica.

A grande miscigenação populacional brasileira, conseqüência das migrações de várias partes do mundo, tanto Europa ocidental quanto oriental, Ásia e África, associada

ao contato com indígenas, gera o questionamento de que o padrão genético da DW possa apresentar características próprias neste contexto social (DEGUTI *et al.*, 2004).

Além das controvérsias relacionadas ao perfil geno-fenotípico, observa-se também o subdiagnóstico da DW no Brasil, trazendo novamente à tona problemas de qualificação profissional que determinam a exclusão da maior parte dos doentes a serviços de excelência e, por conseguinte, tratamento precoce e adequado que poderia propiciar o restabelecimento do bem-estar biopsicossocial (MACHADO *et al.*, 2008).

Ampliar o entendimento das manifestações clínicas da DW a partir da determinação do perfil genético de diferentes populações é de extrema valia, uma vez que a grande variabilidade de mutações do gene *ATP7B* expõe a complexa interligação entre fatores genéticos e diferentes graus de expressão clínica nos pacientes portadores da doença. Alguns estudos recentes têm procurado explorar a correlação entre as mutações mais freqüentes com as grandes síndromes, ou seja, neurológica e/ou hepática (MACHADO *et al.*, 2008).

Determinadas mutações do gene *ATP7B* (inserções, deleções, códons de parada) ocorrendo em um mesmo indivíduo levam a perda da porção C-terminal da proteína carreadora do cobre, impedindo o funcionamento desta de maneira adequada, e se correlacionam com as manifestações mais precoces e graves da forma hepática da doença (SEIDEL *et al.*, 2001).

Existem relatos de que o fenótipo da DW varie de modo significativo de acordo com a apresentação genotípica. Como exemplo considera-se que a mutação p.H1069Q, encontrada em 35 a 50% na população européia de doentes com DW, esteja associada ao início tardio da DW e com pequenas alterações do metabolismo do cobre (GROMADZKA *et al.*, 2006). Citam-se também estudos realizados em populações chinesas acometidas pela DW nos quais se encontraram a mutação p.R778L como sendo a mais comum do gene *ATP7B*, com taxas aproximadas de 57%, e que existe correlação desta com o surgimento de doença hepática em pessoas jovens (idades inferiores a 18 anos) (LIU *et al.*, 2004; YE *et al.*, 2007).

Na prática clínica, observa-se que uma porcentagem considerável de pacientes portadores de DW em terapia farmacológica adequada apresenta persistência dos sintomas clínicos e inclusive evolução da enfermidade. Há um pressuposto, então, que

determinados pacientes possam apresentar diferentes expressões fenotípicas para uma mesma mutação no gene *ATP7B*.

Considerando as poucas informações da literatura a respeito do comportamento da DW no Brasil associadas às peculiaridades do seu processo de colonização, o presente estudo visa avaliar as manifestações clínicas da DW a partir da determinação do padrão geno-fenotípico de uma população sul-brasileira portadora da doença e questiona se há correlação deste com o observado nos pacientes do restante do Brasil e do mundo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O cobre foi reconhecido como um elemento essencial a partir de 1929, quando Hart *et al.* demonstraram que a sua suplementação era necessária para auxiliar no combate a anemia por carência de ferro em ratos nutridos exclusivamente com um regime lácteo. Logo, pode-se concluir que o cobre era necessário à síntese da hemoglobina. Depois desta data, numerosos estudos científicos mostraram o papel eminente exercido pelo cobre sobre o metabolismo das enzimas fundamentais, facilitando as reações de transferência de elétrons quando incorporado a proteínas cúpricas (CULOTTA *et al.*, 2001).

Aproximadamente 50 % do cobre ingerido (1,5 a 3 mg/dia) é absorvido nas porções iniciais do intestino delgado. Ao atravessar os enterócitos do intestino delgado, ele entra na circulação sanguínea e, finalmente, chega ao fígado, órgão central na homeostase deste metal. Este cobre é extraído da circulação portal pelos hepatócitos. Uma vez intracelular é subseqüentemente utilizado para as necessidades metabólicas do organismo, incorporado a uma glicoproteína secretória denominada ceruloplasmina (CLP) ou excretado junto à bile. Para que todas estas etapas possam ocorrer adequadamente são necessários pelo menos quatro tipos de proteínas: transportador de cobre tipo 1, metalotioneínas, metalochaperonas e ATP7B (BUSH *et al.*, 2003; TANZI *et al.*, 1993; LEE *et al.*, 2001; KLOMP *et al.*, 2002; RAE *et al.*, 1999; PETRUKHIN *et al.*, 1994). O transporte hepatocelular do cobre até a sua excreção na bile envolve um circuito que é dependente diretamente da função da proteína ATP7B.

Na figura 1, adaptada do modelo didático proposto por Penã *et al.*, está representado o metabolismo do cobre em humanos. Caso haja uma ingestão diária excessiva de cobre e sua concentração sérica se elevar, a excreção biliar incrementar-se-á proporcionalmente, de maneira que o cobre corpóreo total permaneça em níveis aceitáveis (2009).

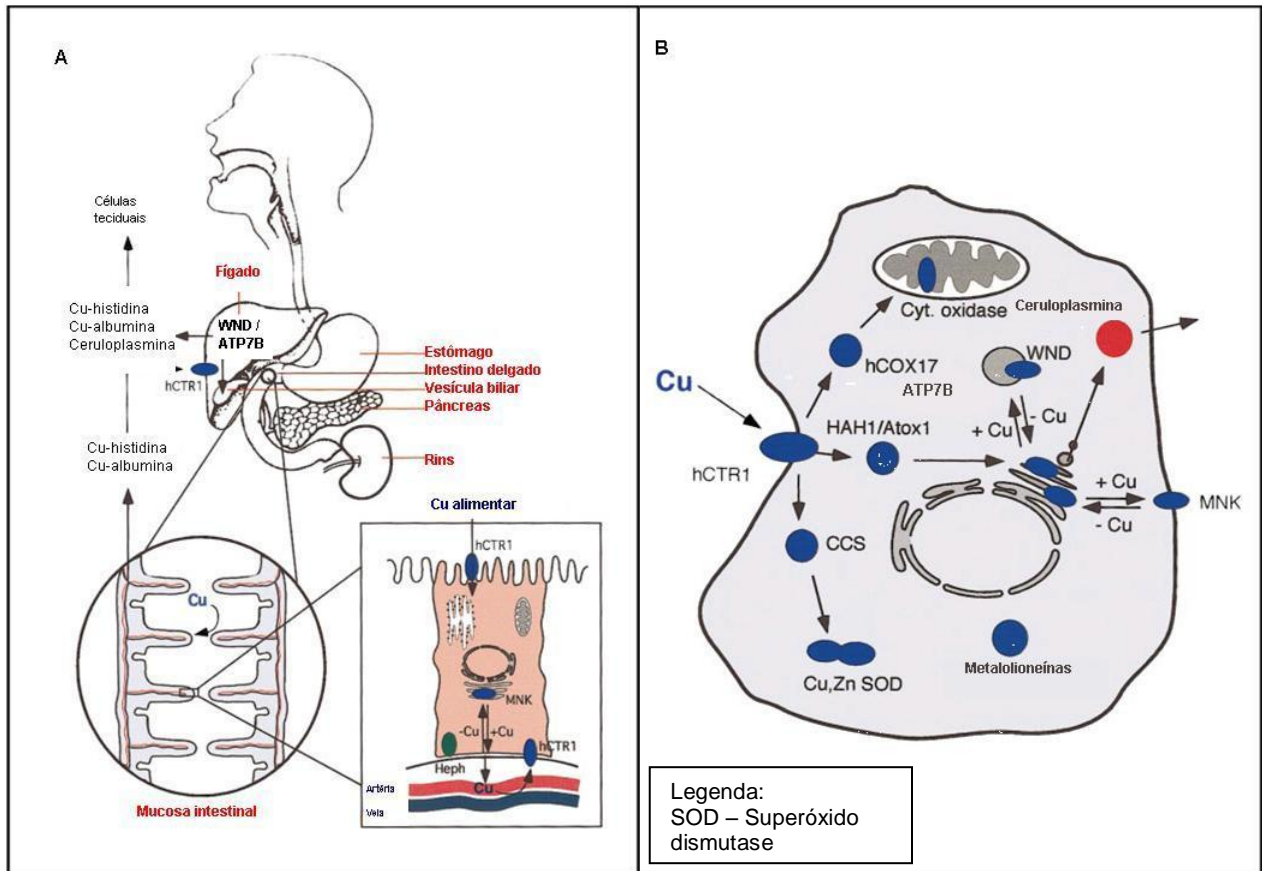


Figura 1. Metabolismo do cobre em humanos. (A) Modelo humano de absorção e distribuição do Cu nos diversos órgãos e tecidos. O Cu dietético é absorvido principalmente no estômago e intestino delgado. hCTR1, um transportador de alta afinidade pelo Cu, é responsável pelo transporte de Cu nas células da mucosa intestinal. MNK é necessário para o transporte de Cu para a circulação portal. MNK é uma ATPase do tipo-P defeituosa nos pacientes com doença de Menkes, nos quais o Cu é acumulado nas células epiteliais intestinais. Uma vez no plasma, o Cu liga-se com a albumina e a histidina na circulação portal e é rapidamente depositado no fígado por intermédio do hCTR1. CLP, a principal proteína plasmática incorporadora de Cu, é sintetizada no fígado com a incorporação do Cu através da proteína WND/ATP7B na via de secreção e exerce uma atividade de oxidação, que é importante no metabolismo do ferro. WND/ATP7B apresenta uma elevada homologia com MNK e se encontra defeituosa nos pacientes com DW que apresentam um acúmulo de Cu hepático. A excreção biliar é o principal mecanismo de eliminação do Cu do organismo e uma pequena quantidade de Cu é detectada na urina. (B) Modelo humano de captação e distribuição do Cu a nível celular. A absorção tissular do Cu é provavelmente mediada pelo transportador de Cu hCTR1. Uma vez transportado pelo hCTR1, as chaperonas citoplasmáticas (hCOX17, HAH1, CCS) distribuem o Cu para compartimentos celulares específicos para que o Cu seja incorporado nas proteínas cúpricas. hCOX17, HAH1 e CCS distribuem o Cu na mitocôndria, compartimento secretório e no canal de zinco-cobre, respectivamente. As chaperonas cúpricas das metalotioneínas e do núcleo ainda não foram identificadas. Em tecidos diversos do fígado, a MNK transporta o Cu entregue pela HAH1 para o complexo de Golgi, onde ele será incorporado às proteínas secretórias. O Cu estimula o trânsito do MNK do complexo de Golgi para a membrana plasmática, local de sua eliminação. Nas células hepáticas, a proteína MNK da DW está localizada no complexo de Golgi e níveis elevados de Cu estimulam o seu transporte deste local para um compartimento vesicular citosólico desconhecido. Adaptado de Penã *et al.*, 1999.

Existem evidências tanto de doenças desenvolvidas por uma deficiência em cobre no organismo, como a doença de Menkes (MENKES *et al.*, 1962), quanto causadas pelo seu acúmulo, a saber a DW (WILSON, 1912). Com o objetivo de evitar a toxicidade e garantir a homeostase celular, diversas vias orgânicas permitem a circulação, compartimentalização e excreção do cobre, assegurando que todas as reações dependentes deste metal aconteçam de maneira harmônica (SCHIERFERMEIER *et al.*, 2000).

A inefetividade ou diminuição funcional da ATP7B resulta no decréscimo da excreção do cobre e, por conseguinte, no seu acúmulo orgânico. Se o quadro acima acontece de maneira completa, ou seja, perda funcional, define-se o diagnóstico de DW. Acredita-se que a síntese de CLP também seja dependente da ATP7B, motivo pelo qual seus níveis estão baixos nos pacientes com a doença (SCHAEFER *et al.*, 1999). É sabido que o cobre é tóxico em níveis elevados e estes efeitos tóxicos incluem a geração de radicais livres (superóxido e hidroxila), a peroxidação lipídica das membranas e do ácido desoxirribonucléico (DNA), inibição da síntese proteica e níveis baixos de agentes celulares anti-oxidantes (DHAWAN *et al.*, 2005). Quando a capacidade de armazenagem hepática do cobre é extrapolada ou quando o dano hepático resulta na liberação do cobre celular para a circulação, os níveis de cobre não ligado a CLP começam a se elevar. A partir deste aporte de cobre há a deposição extra-hepática deste elemento, sendo o cérebro o órgão preferencial para acúmulo, ocasionando injúria neuronal.

“...a doença familiar do sistema nervoso associada à cirrose hepática...” foi a descrição na forma de degeneração hepatolenticular que Samuel Alexander Kinnier Wilson empregou em sua tese de doutorado no *Clinical National Hospital*, Londres, no ano de 1912. Em suas observações reconheceu o papel dos gânglios da base nos sintomas neurológicos e a presença constante de cirrose hepática (WILSON, 1912). Deve ser salientado, todavia, que alguns autores haviam descrito alterações similares previamente a publicação do estudo de Wilson. Gowers (1888) relatara casos de coréia tetanóide associada à cirrose hepática; Westphal (1883) e Strümpell (1889) caracterizaram a pseudoesclerose em prováveis portadores desta condição; Kayser (1902) e Fleischer (1903) descreveram os anéis corneanos associados à doença

neurológica e hepática; e Alzheimer (1912) observara pacientes com pseudoesclerose e alterações intensas das células dos gânglios da base, com neurônios preservados (BARBOSA *et al.*, 2009).

Após estes relatos iniciais, Hall, em 1921, caracterizou a DW como uma enfermidade herdada com caráter autossômico recessivo, relacionada à alteração do metabolismo do cobre. Em seus estudos descreveu a perda da capacidade de excreção deste elemento do organismo com o seu conseqüente acúmulo em tecidos.

Nos anos que se seguiram, os estudos foram todos dirigidos ao encontro da determinação da etiopatogênese da doença. A prioridade concentrava-se no estudo do metabolismo do cobre e de como impedir que seu acúmulo implicasse em um estado patológico (WALSHE, 1956).

Após um longo período sem descobertas, no ano de 1993 deu-se a identificação e isolamento do gene da DW, designado *ATP7B*, o que permitiu um maior entendimento da gravidade dos distúrbios que os erros no metabolismo do cobre podem ocasionar (BULL *et al.*, 1993; YAMAGUCHI *et al.*, 1993; TANZI *et al.*, 1993; BUSH *et al.*, 2003).

A DW pode envolver alguns sítios corporais, havendo predileção pelo fígado, cérebro, rins, olhos e articulações (SCHILSKY *et al.*, 2005). As principais manifestações estão discriminadas a seguir:

- hepáticas: nos primeiros estágios o fígado pode estar discretamente aumentado de tamanho e as alterações à microscopia óptica (MO) são inespecíficas e consistem em macro e micro-esteatose. À microscopia eletrônica (ME) o desarranjo mitocondrial já é percebido. Com o progredir da doença, a proteína cúprica é estocada nos lisossomos e pode ser detectada por técnica de imunistoquímica. Nos estágios intermediários e finais há sinais de hepatite crônica ativa, caracterizada por inflamação periportal, hepatite de interface e pontes fibrosas, além de nódulos definidores de cirrose;

- neurológicas: a maioria das alterações ocorre nos núcleos lenticulares os quais se mostram atroficos e com palidez, recebendo a denominação de degeneração cística. Há uma possibilidade de progressão da doença neurológica no sentido tálamo, putâmen e córtex cerebral, com um aumento significativo dos astrócitos, as células de

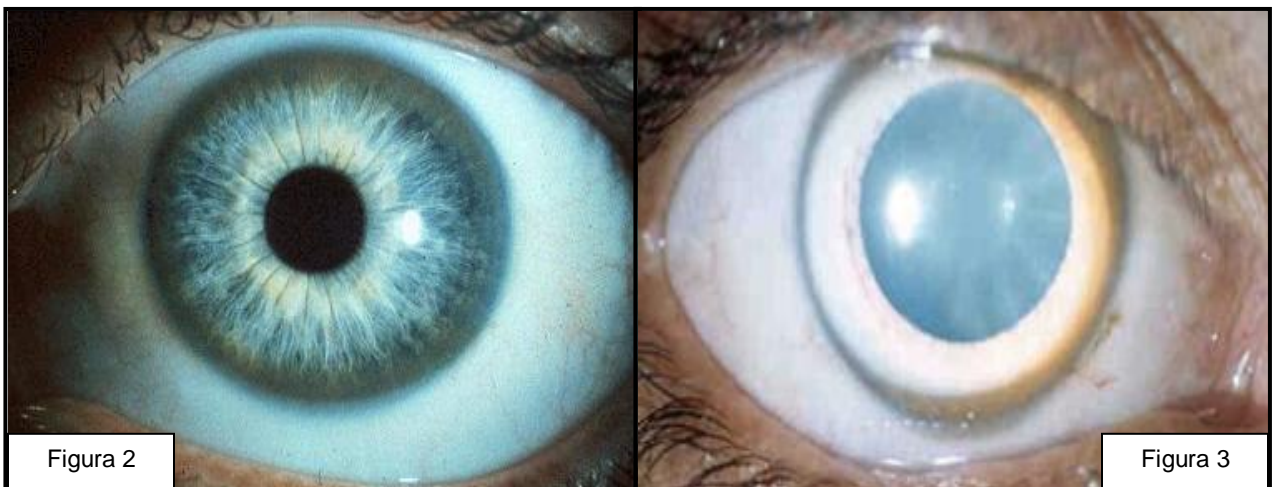
Opalski. Na seqüência o edema tecidual gera liquefação e surgimento de pequenas cavidades.

As manifestações renais, articulares e oculares não seguem padrão patológico, havendo destaque para:

1. Renais: disfunção tubular proximal ou distal, acidose metabólica, aminoacidúria, glicosúria, hiperfosfatúria, uricosúria e hipercalcúria;

2. Osteoarticulares: osteoporose, osteomalácia, condrocalcinose, sendo que a coluna dorsal e os joelhos são as estruturas mais acometidas;

3. Oculares: formação do AKF, que se caracteriza pela deposição de grânulos de cobre elementar na periferia da córnea, especificamente na membrana de Descemet; catarata em girassol. Nas figuras 2 e 3 são demonstradas as manifestações oculares.



Figuras 2 e 3. Anel de Kayser-Fleischer e Catarata em Girassol.

Cortêsias: Serviço de Neurologia – HC-UFPR e Serviço de Gastroenterologia – HC-FMUSP (2010).

Muitas das manifestações da DW são sutis e inespecíficas, contribuindo para o diagnóstico tardio em várias ocasiões. Os sintomas são raros nos primeiros cinco anos de vida e aproximadamente metade dos afetados tornam-se sintomáticos na adolescência. Os sintomas iniciais usualmente são hepáticos, com o quadro clássico aparente ocorrendo após a deposição de cobre em outros sítios, sobretudo no sistema nervoso central (cérebro) e córneas. Acredita-se que raramente a doença se manifesta após a quarta década de vida (NARATA *et al.*, 2002; SCHILSKY *et al.*, 2005).

Ao se caracterizarem as duas principais maneiras de manifestação clínica, pode-se dividir em duas grandes síndromes: hepática e neurológica (PFEIFFER, 2007).

A doença hepática possui quatro formas: forma assintomática, hepatite wilsoniana aguda, hepatite fulminante e hepatite wilsoniana crônica com evolução para cirrose. Este estágio pode se apresentar de maneira semelhante a outras formas de cirrose: hipoalbuminemia, alargamento do tempo de atividade da protrombina, aumento dos valores de bilirrubina sérica, sinais de hipertensão porta (ascite, hemorragia digestiva) e também surgimento de hepatocarcinoma.

Já as manifestações neurológicas são bastante variadas e mais comuns em pacientes com maior idade. Dá-se destaque para características de parkinsonismo: bradicinesia, hipertonia, rigidez, instabilidade postural; além de outras como coréia, tremores, distonias e disartria. Sinais e alterações de caráter psicológico e psiquiátrico também podem ocorrer, variando desde retardo mental leve até psicose grave (MACHADO *et al.*, 2006).

O diagnóstico de DW é estabelecido pela combinação de dados clínicos, bioquímicos e histológicos. A presença de cobre no fígado, a partir da obtenção de uma amostra tecidual por biópsia hepática (BH) é o método padrão-ouro de diagnóstico. O cobre pode ser evidenciado através da coloração com rodanina ou ácido rubeânico (análise histológica) ou pela análise quantitativa, sendo que acima de 3,9 μmol de cobre por grama de peso seco hepático (normal: 0.2-0.6 $\mu\text{mol/g}$) tem-se o diagnóstico. Salienta-se, todavia, que as colorações são menos sensíveis em estágios mais precoces da doença, havendo maior acurácia no momento que o cobre atinge o interior dos lisossomos (BREWER, 2000). A dosagem de atividade da CLP inferior a 20 mg/dl sugere o diagnóstico de DW. Ressalta-se que a CLP pode estar normal em 5 - 20% dos casos e baixa em 10% dos heterozigotos. A biomicroscopia oftalmológica com a lâmpada de fenda deve ser realizada visando à pesquisa de AKF.

A dosagem de cobre sérico, da quantidade de cobre excretada em urina de 24 horas e a realização de testes genéticos naqueles indivíduos assintomáticos ou pré-sintomáticos de famílias de portadores de DW podem ser utilizados como métodos auxiliares de diagnóstico (KITZBERGER *et al.*, 2005; FERENCI, 2005).

O tratamento da DW deve ser instituído tão logo o diagnóstico seja realizado, uma vez que a doença pode ter evolução fatal se não tratada em um período aproximado de 3 anos após o início dos sintomas clínicos (SCHILSKY *et al.*, 2005).

Dentre os tratamentos farmacológicos disponíveis podem-se enumerar quelantes do cobre: D-penicilamina (3-mercaptop-D-valina) e diidrocloridrato de trientine, sais de zinco (acetato ou gluconato ou sulfato) que promovem o aumento da eliminação de cobre pelas fezes e o tetratiomolibdato de amônio. Quaisquer associações terapêuticas destes medicamentos podem ser empregadas, além de medidas dietéticas (dieta pobre em cobre, a saber, exemplos de alimentos ricos em cobre: fígado, chocolate, café, nozes, feijão, mariscos e cogumelos) e transplante hepático nos casos com evolução desfavorável. A monitorização do tratamento é realizada pela verificação da quantidade urinária de cobre excretado e pelas dosagens de aminotransferases hepáticas (ALT e AST). Ressalta-se que este tratamento medicamentoso deve ser realizado durante toda a vida e que existe possibilidade de regressão de sintomas e sinais neurológicos e hepáticos em alguns pacientes (PRASHANTH *et al.*, 2005).

Os testes genéticos têm extrema aplicabilidade na detecção de familiares acometidos e com a elucidação do componente genético responsável pela doença, este campo tem sido objeto de cada vez mais estudos uma vez que se procura a correlação geno-fenotípica nos acometidos, visando o desenvolvimento de terapêuticas específicas.

A partir da descoberta do gene da doença de Menkes em 1993 houve condições mais objetivas para a identificação do gene da DW. A proteína codificada por esse gene (ATP7A) revelou ser uma ATPase do tipo P (MERCER *et al.*, 1993; VULPE *et al.*, 1993). As ATPases do tipo P são um grupo de proteínas transportadoras de cátions que têm algumas características em comum, independentemente do tipo de cátion que transportam.

Baseados no conhecimento de que tanto a doença de Menkes como a DW decorrem de prejuízo no transporte de cobre dos enterócitos à circulação sangüínea, Bull *et al.*, em 1993, utilizaram YACs da região 13q14.3 e identificaram um gene com 57% de homologia com o *ATP7A*. Paralelamente, Tanzi *et al.*, também no ano de 1993, estudando diversos cDNAs isolados por hibridização, também observaram um clone parcial de um gene com características de ATPase transportadora de metal pesado e com 76% de homologia com o gene da doença de Menkes. Assim identificado, o gene da DW foi denominado *ATP7B*.

Até o presente existem mais de 400 mutações identificadas no gene *ATP7B* (<http://www.medicalgenetics.med.ualberta.ca/wilson/index.php>). A raridade da doença (1: 30.000 indivíduos, sendo o estado de portador do gene *ATP7B* defeituoso 1: 90) e o grande número de mutações, a maioria expressas em heterozigose composta, torna difícil a associação genética com a expressão clínica, histológica, radiológica e laboratorial.

Existem determinadas mutações mais prevalentes em algumas regiões do mundo como, por exemplo: Europa Oriental substituição p.H1069Q (FERENCI, 2006), Ásia substituição p.R778L (YE *et al.*, 2007), Ilhas Canárias substituição p.L708P (GARCIA-VILLAREAL *et al.*, 2000), Espanha continental substituição p.M645R (MARGARIT *et al.*, 2005), Arábia Saudita substituição p.Q1399R (AL JUMAH *et al.*, 2004), Índia mutação p.C271X (GUPTA *et al.*, 2005). Deguti *et al.* questionam que o padrão genético brasileiro dos pacientes portadores de DW seja peculiar em decorrência da grande miscigenação populacional brasileira, secundária à migrações de várias partes do mundo (2004).

Destaca-se a carência de publicações brasileiras e latino-americanas sobre esse tema na literatura especializada, tornando a realização deste estudo uma ferramenta na complementação dos conhecimentos do comportamento da DW no Brasil.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar as mutações do gene *ATP7B* nos portadores de DW de uma população sul-brasileira.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Avaliar manifestações fenotípicas na população estudada;
- Caracterizar região geográfica de origem da família e antepassados;
- Comparar os padrões genotípicos com as manifestações fenotípicas encontradas nesta casuística com os descritos no Brasil e no mundo.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 CLASSIFICAÇÃO DO TIPO DE PESQUISA

Este estudo é retrospectivo e prospectivo, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas – UFPR, com protocolo CEP: 1216.064/2006-05 e registro no Banpesq: 2006019287 (apêndice 1), não intervencionista, laboratorial, observacional e documental.

4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA DA PESQUISA

Foram incluídos todos os pacientes com diagnóstico de DW em acompanhamento ou que iniciaram acompanhamento nos Serviço de Neurologia (SN) e Serviço de Hepatologia (SH) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) desde a data de aprovação deste estudo pelo CEP-HC-UFPR (30 de maio de 2006 – apêndice 2) até junho de 2010.

Todos os incluídos na pesquisa concordaram com os termos do consentimento livre e esclarecido (apêndices 3 e 4). Determinou-se como critério de exclusão os pacientes que não apresentassem naturalidade sul-brasileira.

4.3 METODOLOGIA

O diagnóstico de DW foi baseado em dados clínicos, bioquímicos, histológicos e exames de imagem, tendo como base os critérios estabelecidos no *8th International Meeting on Wilson disease and Menkes disease*, que se realizou na cidade alemã de Leipzig, no ano de 2002 (FERENCI *et al.*, 2003). As manifestações neurológicas de linha extrapiramidal ou cerebelar (bradicinesia, rigidez, hipertonia, instabilidade postural,

distonia, coréia, atetose, tremor, distúrbios cerebelares, disartria, disfagia e alteração da marcha) e as manifestações hepáticas agudas, crônicas ou crônicas agudizadas foram consideradas compatíveis com a doença. Os AKF (verificados à lâmpada de fenda por médico oftalmologista), ceruloplasmina sérica < 20 mg/dl, cuprúria > 100 µg/ 24 horas, cuprúria após administração oral de penicilamina > 1000 µg/ 24 horas também foram considerados compatíveis.

A partir da comprovação do diagnóstico, os pacientes e/ou seus responsáveis legais assinaram os termos de consentimento e foram submetidos às etapas consequentes da pesquisa (n=36). Não houve recusa por parte de nenhum paciente e/ou responsável legal na participação no estudo e nenhum contemplava o critério de exclusão. Dezesesseis pacientes foram do sexo masculino e 20 do sexo feminino, com idade variando de 12-63 anos ($34,6 \pm 10,8$ anos).

4.3.1 Avaliação Clínico-Laboratorial-Histológica

Na visita inicial os pacientes foram submetidos aos seguintes procedimentos:

- anamnese e exame clínico completo por um único pesquisador médico (investigador principal – Ricardo Schmitt de Bem)
- preenchimento do questionário específico (apêndice 5) com revisão do prontuário médico da instituição;
- os dados demográficos colhidos foram: gênero, etnia, cidade e estado de procedência do paciente e familiares, escolaridade, profissão, estado civil, prole, fluxo migratório dos familiares, antecedentes de consangüinidade entre os pais, presença de outros membros da família com diagnóstico de DW e as idades no início dos sintomas e no momento do diagnóstico. A raça foi definida em branca, negra, amarela, parda e indígena, baseada nos caracteres físicos e na informação do paciente; a procedência familiar foi a mais remota que o paciente soube relatar, e as idades foram definidas em anos, considerando-se preferencialmente a idade do registro hospitalar;
- revisão das informações laboratoriais e de métodos complementares registradas em prontuário médico por ocasião do diagnóstico de DW e

encaminhamento para coleta de amostras de sangue em jejum e urina para a verificação laboratorial dos seguintes exames na data de assinatura do termo de consentimento: hemograma completo, bilirrubinas totais e frações (BT), proteínas totais e frações (PT), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama glutamil-transferase (GGT), tempo de atividade da protrombina (TAP), ácido úrico, creatinina, índice de saturação da transferrina, ferritina, sorologias para hepatite virais A, B e C, alfa-1 antitripsina, anticorpo anti-núcleo (ANA), anticorpo anti-mitochondrial (AMA), anticorpo anti-músculo liso (ASM), anticorpo anti-fígado-rim do tipo 1 (LKM-1), ceruplasmina (CLP), cobre sérico total, cobre urinário em amostra de 24 horas e cálcio urinário.

- de acordo com critérios clínicos e baseados em informações de prontuários médicos visando complementação diagnóstica e auxílio na condução dos casos eventualmente os pacientes foram submetidos a exames de imagem (ultrassonografia de abdome, tomografia computadorizada de crânio, ressonância nuclear magnética de encéfalo) e/ou histológicos (biópsia hepática). O material encaminhado para estudo histológico seguiu a rotina preconizada pelo Serviço de Anatomia Patológica do HC-UFPR que inclui colorações de hemotoxícila-eosina (HE), Gomori, reticulina, azul da Prússia, ácido periódico de Schiff (PAS) com digestão e PAS sem digestão. Colorações específicas para depósitos cúpricos hepáticos não são realizados como rotina.

4.3.2 Avaliação genética

- obtenção das amostras: coleta de 10 ml de sangue periférico total, em tubo com EDTA, de 36 indivíduos. O material biológico estudado foi o DNA. Os pacientes foram regularmente acompanhados no SN e SH do HC-UFPR, sendo que a amostra de sangue foi armazenada no SH (freezer a -80°C). As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), aos cuidados da Doutora Marta Mitiko Deguti (CRM-SP 78.966), Médica Assistente do Serviço de Gastroenterologia HC-FMUSP, onde foram realizadas as etapas seguintes da

pesquisa genética (apêndices 6, 7 e 8), por projeto orçamentário junto a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Projeto 2006/00499-1).

- extração de DNA (apêndice 9 – glossário de termos de biologia molecular): a extração de DNA foi realizada a partir de sangue total de cada paciente utilizando kit QIAmp® DNA Mini (Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme recomendações do fabricante.

As amostras de DNA tiveram sua concentração determinada pela medição da densidade óptica a 260-280 nm no aparelho Gene Quant RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech, New Jersey, Estados Unidos).

- reação em cadeia da DNA polimerase (PCR): extraído DNA das amostras, cada éxon do gene *ATP7B* foi submetido à técnica de PCR. A PCR se baseia na amplificação seletiva *in vitro* de regiões específicas de DNA (SAIKI *et al.*, 1986) e consiste em sucessivos ciclos de desnaturação da dupla fita, hibridação (anelamento) com oligonucleotídeos e extensão da cadeia de DNA mediante a ação da *Taq* polimerase. A PCR permite a amplificação de fragmentos desde aproximadamente 50 pares de bases até mais de 3.000 pares de base. Para cada fragmento de DNA que se quer amplificar deve-se ter em conta suas características próprias, principalmente as quantidades das diferentes bases que contidas em cada molécula, que incidem sobre as distintas variáveis do processo. É preciso, portanto, aperfeiçoar as condições para cada fragmento em particular. As condições de amplificação dos éxons do gene *ATP7B* foram aquelas otimizadas por Liechti-Gallati *et al.* (1999).

- amplificação dos éxons do gene *ATP7B*: primeiramente foram realizadas amplificações de cada um dos éxons do gene *ATP7B* pela técnica de PCR usando *primers* e protocolos previamente descritos (LIECHTI-GALLATI *et al.*, 1999). Os componentes específicos para este processo estão listados na Tabela 1.

TABELA 1 – SOLUÇÕES DAS PCRs CONVENCIONAIS DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DO GENE *ATP7B*

Reagente	Volume ((μ L)
H ₂ O deionizada e destilada	46,36
Tampão para PCR (10X)	6,0
MgCl ₂ 50mM	1,8
dNTP mix (2 mM cada)	1,2
DNA Taq polimerase (5 U/ μ L)	0,24
<i>Primer</i> F (20 μ M)	1,2
<i>Primer</i> R (20 μ M)	1,2
<u>Template DNA</u>	2,0

Fonte: Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical – FMUSP (2011).

O éxon 2 do gene *ATP7B* foi subdividido, 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 pré-amplificação a 95°C por 30 segundos, seguindo-se de 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. A extensão final foi realizada a 72°C por cinco minutos.

Todos os produtos de PCR, após amplificação, foram submetidos à purificação enzimática utilizando o kit ExoSAP-IT PCR Clean-up Kit (GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, Reino Unido), conforme recomendações do fabricante.

- seqüenciamento: todos os indivíduos que apresentaram padrões anômalos em um determinado éxon do gene *ATP7B* tiveram este éxon seqüenciado. É este processo que permite conhecer a ordem ou seqüência de um fragmento de DNA e determinar qual (is) o(s) nucleotídeo(s) é (são) diferente(s) em relação à seqüência normal.

Os produtos de PCR após purificação enzimática foram submetidos à reação de *cycle sequencing*, utilizando os *primers* conforme descritos na Tabela 2 e o kit *ABI Prism^R BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready* (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos).

A reação de *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 2) por quatro minutos e extensão a 55°C por quatro minutos. A extensão final foi realizada a 72°C por cinco minutos.

TABELA 2 – *PRIMERS*, PROTOCOLOS E TAMANHO DOS PRODUTOS DAS PCRs DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DO GENE *ATP7B* POR PCR CONVENCIONAL

Éxon	Sequência de <i>primers</i>	T.H (°C)	Mix	Prod (pb)
1	(F) 5'- TTC CCG GAC CCC TGT TTG CT -3' (R) 5'- AAT CCT CCT GGT GGG AGT GAG CAC -3'	54	1	262
2a	(F) 5'- TGA CAC CAG TGG CAT TGT TT -3' (R) 5'- GAG GCT GCC TTT CCT TCT G -3'	60	2	450
2b	(F) 5'- CAT TGA GGA CAG GAT TTC CAA T -3' (R) 5'- ATA TCA ATT GGT CCC AGG CTT A -3'	60	3	447
2c	(F) 5'- GTA AAT GAC ATG GGA TTT GAA G -3' (R) 5'- AGA ACT GGA AGA CCT GTG ATC T -3'	57	2	496
2d	(F) 5'- GAA GAA AAT ATT GGC CAG CTC -3' (R) 5'- AAG AGA AAA GGA GAC AAG CTC A -3'	58	3	508
3	(F) 5'- GAT ATT TCT GAC ATT TTA TCC -3' (R) 5'- GCA GCA TTC CTA AGT TCA -3'	57	2	323
4	(F) 5'- GCA GCC TCA TTT TCA AAC AGT G -3' (R) 5'- CGG CTT CAA AGG AAA GTG AAA C -3'	62	3	460
5	(F) 5'- CCT GGG TCT GTG GGA TTC T -3' (R) 5'-AAA GGT GAC TAC AAT TTT TAA TGATGA-3'	57	1	233
6	(F) 5'- CTG CCA ATG CAT ATT TTA AC -3' (R) 5'- GGT AGA GGA AGG GAC TTA GA -3'	54	3	199
7	(F) 5'- TGT GAC AAA GGC AGG TCT TAA A -3' (R) 5'- GAA ACC AGG CCC TTA GTA GTC C -3'	60	3	503
8	(F) 5'- AGC TAG AGG CTT TGC CAT CC -3' (R) 5'- CAT GGT GTT CAG AGG AAG TGA G -3'	60,5	3	
9	(F) 5'- TTT CGA TAG CTC TCA TTT CAC A -3' (R) 5'- AAA CCA CAT GGG CAT CTG AT -3'	55	2	209
10	(F) 5'- AGT CGC CAT GTA AGT GAT AA -3' (R) 5'- CTG AGG GAA CAT GAA ACA A -3'	57	3	193
11	(F) 5'- GCT GAG CAA GTG ACA GTT -3' (R) 5'- CGA GGA AGA TGA AGT TAG TT -3'	57	3	231
12	(F) 5'- TCC ATG CTT GTG GTG TTT TAT T -3' (R) 5'- TCT GGC TTA GAT TTT GCT GTC A -3'	60	3	358
13	(F) 5'- AGT TCG TCA CGT TGT GTC CAG T -3' (R) 5'- GAG TGG CTC TCA GGC TTT TCT C -3'	62	3	396
14	(F) 5'- GCA GGT TGG GTG AAG TTC TG -3' (R) 5'- GGG CCC TCT AAG TGG TTT TC -3'	60,5	2	399
15	(F) 5'- CTT TCT CTC AGT TCC CGC TTT C -3' (R) 5'- TCT GTG GTT TGA CCC ACC TCT A -3'	62	3	358
16	(F) 5'- GCT GTT AAA AGG ATT GCA TGG -3' (R) 5'- AGG AGG ACT CTT TTG CCT GA -3'	60	1	300
17	(F) 5'- AAC TTG GTA GCT GCT GAT -3' (R) 5'- TTT TGT CTC TAA CTG CTT TTA TGA -3'	57	3	239

continua

Éxon	Sequência de <i>primers</i>	T.H (°C)	conclusão	
			Mix	Prod (pb)
18	(F) 5'- TAA CTT GAG GTT TCT GCT GCT ATC -3' (R) 5'- GGA GCA CAC AGT GAG GAA GG -3'	60	1	345
19	(F) 5'- GGC AGA CCC CTT CCT CAC -3' (R) 5'- CCT GGG AGA GAG AAG CCT TT -3'	54		
20	(F) 5'- CTA GGT GTG AGT GCG AGT T -3' (R) 5'- CAG CAT TTG TCC CAG GT -3'	53	1	392
21	(F) 5'- AAT GGC TCA GAT GCT GTT -3' (R) 5'- GCT TGT GGT GAG TGG AGG -3'	53	1	361

Fonte: Laboratório de Medicina Tropical – Departamento Gastroenterologia – USP (2011).

Legenda: TH: temperatura de hibridização; Mix: solução utilizada (vide Tabela 1), Prod: tamanho do produto.

No desenvolvimento deste projeto o seqüenciamento foi realizado em seqüenciadores automáticos ABI 3100 (*AME Bioscience A/S*, Torøed, Noruega) e 373A (*Applied Biosystems*, Foster City, Estados Unidos), compostos por um equipamento de eletroforese, por um *laser* e por um computador que recolhe e analisa os dados enviados por este. Como sistemas de detecção foram utilizados dideoxynucleotídeos marcados com fluorescências distintas, que posteriormente foram lidos e reconhecidos pelo *laser*. As seqüências obtidas foram, então, analisadas para que a mutação fosse identificada. A seqüência original do gene *ATP7B* foi obtida dos bancos de dados EMBL (www.ensembl.org, código de acesso: ENSG00000123191) e NIH (www.ncbi.nlm.nih.gov, número OMIN: *606882).

Até o término desta tese foram avaliados 23 pacientes para mutações do gene *ATP7B*.

4.3.3 Análise Estatística e Interpretação de Dados

Os dados obtidos receberam tratamento estatístico (programa *Statistica* versão 6.0, *StatSoft*, Oklahoma, Estados Unidos), utilizando o teste *t-Student*, com posterior interpretação dos resultados e comparação com os dados disponíveis na literatura. O nível de significância estatística considerado foi de 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A idade média de apresentação da clínica foi de $23,2 \pm 9,3$ (10-41) anos e o intervalo médio de tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico de $27,5 \pm 41,9$ (1-194) meses. História familiar para DW em 16 (44,4%) casos e consangüinidade em dois (5,5%).

Na ocasião do diagnóstico, nove (25%) apresentavam quadro clínico exclusivamente neurológico, 14 (38,9%) exclusivamente hepático, 11 (30,6%) características neurológicas e hepáticas (apresentação mista) e 2 (5,5%) eram assintomáticos. Os diagnósticos nestes dois últimos casos se deram através de triagem genética familiar.

A idade de início dos sintomas foi similar (sem diferença estatística) entre os três diferentes grupos, a saber: $21,1 \pm 8,9$ anos nos pacientes com forma neurológica; $20,6 \pm 7,2$ anos na hepática e; $26,8 \pm 9$ anos na mista.

O tempo médio entre o início dos primeiros sintomas clínicos e o diagnóstico definitivo foi $18,5 \pm 12,4$ (1-36) meses na forma neurológica; $6,7 \pm 5,8$ (1-16) meses na hepática e; de $51 \pm 59,6$ (1-194) meses na mista. Houve diferença significativamente estatística no intervalo de tempo para o diagnóstico entre a forma hepática e as demais ($p=0,02$ neurológica e $p=0,004$ mista).

Dados da avaliação clínico-laboratorial-radiológica pormenorizada detectaram outras manifestações correlacionadas a DW, sendo: presença de anel de Kayser-Fleischer 20 casos (55,6%), alterações neurológico-psiquiátricas 18 (50%), hepáticas 25 (69,4%), renais 6 (16,7%), hematológicas 8 (23,2%) e outros sítios (pele, anexos, ossos) 11 (30,5%).

Os pacientes com achados neurológicos e/ou psiquiátricos ($n=18$) realizaram exames radiológicos (tomografia computadorizada de crânio e/ou ressonância nuclear magnética de encéfalo) para avaliação do sistema nervoso, sendo verificadas anormalidades significativas em 13 casos (72,2%). Os achados encontrados nos

exames foram sinais hiperintensos na substância branca periventricular e nos gânglios da base, redução volumétrica dos hemisférios cerebrais e sinal da “face do panda gigante”.

Na tabela 3 estão apresentadas as manifestações clínicas detectadas nesta população.

TABELA 3 – MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS

Neurológicas/ Psiquiátricas	Hepáticas	Oftalmológicas	Renais	Hematológicas	Outras Manifestações
Síndrome cerebelar* (38,9%)	Cirrose (44,4%)	Anel de Kayser-Fleisher (55,6%)	Hipercalcúria (11,1%)	Anemia hemolítica (16,6%)	Dor articular (5,6%)
Tremor de extremidades (27,7%)	Hipertensão portal (36,1%)		Litíase renal (8,3%)	Trombocitopenia (5,6%)	Rigidez matinal (5,6%)
Distonia (11,1%)	Icterícia (16,6%)				Hiperpigmentação cutânea (11,1%)
Parkinsonismo (11,1%)	Astenia (8,8%)				Rarefação de fâneros (8,3%)
Outras (cefaléia/síncope) (5,6%)	Insuficiência hepática aguda (11,1%)				
Alterações psiquiátricas# (16,6%)	Hemorragia digestiva alta (5,5%)				

FONTE: O autor (2011).

NOTA: n = 36; porcentagem em relação ao número total de casos.

*Síndrome cerebelar: perda de equilíbrio, dificuldade em se manter em pé, marcha com base alargada, ataxia de marcha, dismetria, disdiadocinesia, rechaço, tremor, decomposição, tremor, nistagmo.

#Alterações psiquiátricas: déficit de atenção, alterações de personalidade, negligência corporal, irritabilidade, hipersonia.

O exame ultrassonográfico de abdome demonstrou sinais de hepatopatia crônica em 17 (68%) dos 25 pacientes com alterações hepáticas e em 3 (27,2%) pacientes do restante da amostra (p=0,03). Da totalidade dos casos com alterações ultrassonográficas, 13 (65%) possuíam sinais de hipertensão portal. Em decorrência da necessidade de complementação diagnóstica ou para obtenção de informações que auxiliassem na condução clínica, 16 pacientes foram submetidos à biópsia hepática e os resultados histopatológicos estão descritos na tabela 4.

TABELA 4 – RESULTADOS DO ESTUDO DE ANATOMIA PATOLÓGICA HEPÁTICA DOS CASOS DE DW

Paciente	Sexo	Idade	Histologia
1	M	26	Cirrose hepática micronodular com infiltrado inflamatório monomorfonuclear
2	F	17	Cirrose hepática pós-necrótica
3	F	29	Mínimo infiltrado inflamatório monomorfonuclear incharacterístico
4	F	21	Cirrose hepática pós-necrótica
5	M	22	Alargamento fibroso do espaço porta e infiltrado inflamatório monomorfonuclear
6	F	32	Cirrose hepática com infiltrado inflamatório monomorfonuclear
7	M	55	Hepatite crônica ativa com infiltrado monomorfonuclear
8	M	29	Necrose hepática sub-maciça
9	F	39	Hepatite crônica colestática
10	M	30	Hepatite crônica ativa com mínimo infiltrado monomorfonuclear
11	M	38	Cirrose hepática micronodular com infiltrado monomorfonuclear
12	M	22	Cirrose hepática micronodular com infiltrado monomorfonuclear
13	F	27	Hepatite crônica ativa com infiltrado monomorfonuclear
14*	M	33	Cirrose hepática com hepatite crônica de interface compatível com infecção pelo vírus da hepatite B (VHB)
15	F	20	Necrose hepática maciça
16	F	40	Portite crônica inespecífica com colestase moderada

FONTE: Serviço de Anatomia Patológica do HC-UFPR (2011).

NOTA: n = 16; * paciente infectado pelo VHB, mas com carga viral baixa e sem atividade inflamatória hepática laboratorialmente verificada.

5.2 ORIGEM GEOGRÁFICA - GRUPOS CONTINENTAIS – ASPECTOS SOCIAIS

Os pacientes incluídos no estudo foram avaliados quanto aos seus dados demográficos, de origem geográfica/continental e aspectos sociais. Trinta e três indivíduos (91,7%) eram da raça branca e três (8,3%) eram pardos. Dentre os 31 casos cuja ascendência geográfica/continental pode ser identificada, 96,8%% apresentavam ascendência europeia através de pelo menos um dos seus ancestrais. Em oito (25,8%) pacientes observou-se miscigenação na ascendência continental, sendo um dos progenitores de origem europeia e o outro de origem brasileira. Três pacientes reportaram possuírem ancestrais indígenas. Na tabela 5 estão descritos todos os pacientes classificados de acordo com a raça e ascendência geográfica/ continental.

TABELA 5 – GRUPOS CONTINENTAIS E ORIGEM GEOGRÁFICA

Paciente	Raça	Ascendência Geográfica/Continental
1	Branca	Brasil, Itália, Portugal
2	Branca	Polônia
3	Branca	Itália, Ucrânia
4	Branca	Alemanha, Itália, Polônia
5	Branca	Brasil, Itália, Portugal
6	Parda	Alemanha, Brasil (indígena), Itália, Irlanda, Polônia, Portugal
7	Parda	Brasil (indígena)
8	Branca	Polônia
9	Branca	Portugal
10	Branca	Portugal
11	Branca	Itália
12	Branca	Itália
13	Branca	Itália
14	Branca	Polônia
15	Branca	Polônia
16	Branca	Itália, Polônia
17	Parda	Brasil (indígena), Espanha, Itália
18	Branca	Desconhecida
19	Branca	Desconhecida
20	Branca	Brasil, Itália, Portugal
21	Branca	Itália
22	Branca	Ucrânia
23	Branca	Suíça
24	Branca	Suíça
25	Branca	Suíça
26	Branca	Itália
27	Branca	Brasil, Espanha, Itália
28	Branca	Brasil, Espanha, Itália
29	Branca	Alemanha, Polônia
30	Branca	Alemanha
31	Branca	Alemanha
32	Branca	Desconhecida
33	Branca	Desconhecida
34	Branca	Desconhecida
35	Branca	Itália
36	Branca	Itália, Portugal, Rússia

FONTE: O autor (2011).

NOTA: n = 36.

Dentre os casos com idade superior a 25 anos (n=26), 14 são casados e oito (57,2%) possuem filhos. Destaca-se que após o diagnóstico uma paciente com forma neurológica apresentou oito abortos de primeiro trimestre e outras duas pacientes também com forma neurológica apresentam dois abortos de primeiro trimestre cada, após uma gestação a termo.

Dentre os 33 pacientes maiores de idade, 14 exercem atividades laborais, a maioria em subempregos, e dois obtiveram diploma de nível superior. Dois indivíduos em idade economicamente ativa foram aposentados por invalidez em decorrência de

limitações secundárias a seqüelas neurológicas pela DW. Os três pacientes menores de idade freqüentam escolas regulares e apresentam concordância entre idade e ano escolar.

5.3 TRATAMENTO E EVOLUÇÃO CLÍNICA

Trinta e cinco pacientes foram submetidos à terapia farmacológica. Inicialmente, 33 (94,2%) foram tratados com D-penicilamina e somente dois (5,8%) com acetato de zinco. Um dos casos utilizando sal de zinco se trata de um adolescente assintomático diagnosticado através de triagem genética familiar, enquanto o outro se refere a uma mulher jovem com doença neurológica rapidamente progressiva na qual o agente quelante poderia ser potencialmente deletério como terapia de primeira escolha.

No grupo que iniciou tratamento com D-penicilamina houve necessidade em quatro casos (12,1%) de substituição por acetato de zinco. No primeiro caso em decorrência de gestação, no segundo pelo desenvolvimento de parkinsonismo, no terceiro pelo desenvolvimento de elastose perfurante serpiginosa e no quarto por segurança para o paciente, tendo em vista sua aderência muito irregular as posologias prescritas e baixo grau de comparecimento as consultas ambulatoriais.

Durante o período de seguimento, dois (6,1%) pacientes em tratamento com D-penicilamina apresentaram progressão da doença e optou-se por acréscimo de acetato de zinco à terapêutica. A terapia dupla foi capaz de estabilizar o processo, todavia não houve recuperação clínica dos sintomas.

Transplante hepático foi indicado em um paciente que desenvolveu falência hepática crônica progressiva após oito anos de tratamento com D-penicilamina.

Um indivíduo assintomático diagnosticado por triagem genética familiar permanece por opção sem terapia farmacológica e mantém acompanhamento regular periódico tanto clínico quanto radiológico-laboratorial.

O tempo médio de tratamento com D-penicilamina foi de $129,9 \pm 108,3$ (5-468) meses.

Todos os pacientes foram avaliados quanto à resposta clínica ao tratamento proposto. Seis (18,2%) indivíduos demonstraram melhora dos sinais e sintomas hepáticos e/ou neuropsiquiátricos, 20 (60,6%) permaneceram clinicamente estáveis e outros seis (18,2%) apresentaram piora progressiva do quadro clínico (quatro com doença neurológica e dois com doença hepática). Um paciente que demonstrou piora progressiva da hepatopatia era etilista crônico e apresentava pobre aderência ao tratamento e acompanhamento. Três pacientes faleceram, sendo um em decorrência do desenvolvimento de um quadro de leucemia e dois por falência hepática.

Todos os pacientes portadores de doença hepática crônica foram periodicamente rastreados para avaliar o desenvolvimento de hepatocarcinoma, o qual não foi detectado em nenhum caso. O paciente submetido ao transplante hepático permanece clinicamente estável quatro anos após o procedimento.

5.4 ANÁLISE GENÉTICA

Foram descritos os genótipos *ATP7B* em 23 dos 36 pacientes desta população, sendo 20 casos-índice.

Quatorze mutações diferentes foram detectadas em pelo menos um dos alelos (tabela 6). A substituição c.3207C>A no éxon 14 foi a mais freqüente mutação encontrada, apresentando uma frequência alélica de 28,3%, seguida da mutação c.3402delC no éxon 15, com frequência alélica de 8,7%. Estas duas mutações respondem por aproximadamente 37% dos alelos estudados, indicando que estes éxons são regiões importantes para a detecção de mutações em pacientes da população sul-brasileira.

De acordo com bases de dados sobre mutações em DW (COX, 2009), relata-se que as mutações c.2018-2030del13 no éxon 7 e c.4093InsT no éxon 20 são reportadas pela primeira vez. Estas duas novas mutações são potencialmente patogênicas uma vez que ambas resultam em um desvio no processo de transcrição gênica com conseqüente formação de uma proteína truncada.

A primeira mutação (c.2018-2030del13) foi detectada em uma mulher de 28 anos na qual o diagnóstico de DW foi suspeitado a partir dos 16 anos em decorrência de sinais de anemia hemolítica e hepatite. O metabolismo anormal do cobre foi detectado por uma combinação de baixos níveis séricos de CLP e elevados níveis de cobre urinário. A paciente apresentou excelente resposta ao tratamento medicamentoso instituído com D-penicilamina. A análise genética demonstrou uma deleção de 13 pares de bases no éxon 7 (c.2018-2030del13), associado a uma mutação gerando uma interrupção de transcrição no éxon 8 do gene *ATP7B* (c.2363G>A), confirmando o diagnóstico molecular de DW.

A segunda mutação (c.4093InsT) foi detectada em uma mulher de 22 anos admitida no hospital com edema generalizado, ascite e icterícia. O diagnóstico de DW foi sugerido pela detecção de AKF, baixos níveis séricos de CLP e histórico de consangüinidade com seu esposo (primo em primeiro grau). A BH demonstrou cirrose origem indeterminada. O resultado do seqüenciamento genético direto demonstrou que a paciente apresenta uma inserção afetando a região transcritora no éxon 20 (c.4093InsT) e, em outro alelo, a substituição de um nucleotídeo no éxon 11 (c.2672G>T), confirmando o diagnóstico molecular de DW em heterozigose composta. A mesma análise de DNA foi realizada em seu esposo, verificando-se que é heterozigoto para a mesma mutação no éxon 20.

TABELA 6 – CARACTERÍSTICAS DAS MUTAÇÕES DO GENE *ATP7B*

Alteração de nucleotídeo	Alteração no Aminoácido	Tipo de Mutação	Éxon	Frequência alélica (n=46)
c.51 + 4 A --> T		inserção	Intron 1	1/ 2,17%
c.1934T>G	Met645Arg	substituição	6	1/ 2,17%
c.2018-2030		deleção	7	1/ 2,17% (nova)
c.2123T>C	Leu708Pro	substituição	8	1/ 2,17%
c.2304delC	Met769CysfsX38	deleção	8	1/ 2,17%
c.2304dupC	Met769HisfsX26	duplicação	8	3/ 6,52%
c.2305A>G	Met769Val	substituição	8	1/ 2,17%
c.2336G>A	Trp779Stop	substituição	8	3/ 6,52%
c.2672G>T	Gly891Val	substituição	11	1/ 2,17%
c.2762G>A	Ser921Asn	substituição	12	1/ 2,17%
c.3207C>A	His1069Gln	substituição	14	13/ 28,26%
c.3402del C	Ala1135Glnfs	deleção	15	4/ 8,69%
c.3818C>T	Pro1273Leu	substituição	18	2/ 4,34%
c.4093InsT		inserção	20	2/ 4,34% (nova)

FONTE: O autor (2011).

NOTA: n = 23.

Dados da correlação entre a origem geográfica/continental de acordo com as mutações do gene *ATP7B* estão demonstradas na tabela 7.

TABELA 7 – ORIGEM GEOGRÁFICA-CONTINENTAL E CORRELAÇÃO GENOTÍPICA

Mutação do gene <i>ATP7B</i>	Origem geográfica/continental
heterozigoto c.2762G>A	Alemanha, Polônia
heterozigoto c.3207C>A	Brasil (indígena)
heterozigoto c.3207C>A	Alemanha, Brasil (indígena), Irlanda, Itália
homozigoto c.3207C>A	Polônia
homozigoto c.3207C>A	Suíça
homozigoto c.3207C>A	Suíça
homozigoto c.3207C>A	Suíça
homozigoto c.3207C>A	Itália, Ucrânia
heterozigoto c.3402delC	Brasil, Itália, Portugal
heterozigoto c.3402delC	Desconhecida
homozigoto c.3402delC	Brasil, Itália, Portugal
homozigoto c.3818C>T	Desconhecida
heterozigoto c.4093insT	Itália
[c.4093insT] / [c.2672G>T]	Itália
[c.2336G>A] / [c.2018-2030del13]	Itália
heterozigoto c.2304delC	Polônia
heterozigoto c.2305A>G	Itália, Polônia
heterozigoto c.2123T>C	Desconhecida
[c.2304duplC] / [c.3207C>A]	Alemanha, Itália, Polônia
homozigoto c.2336G>A	Polônia
heterozigoto c.2304duplC	Alemanha
heterozigoto c.2304duplC	Desconhecida
[Intron 1 c.51 / 4 A --> T] + [c.1934T>G]	Itália, Portugal, Rússia

FONTE: O autor (2011).

NOTA: n = 23.

A análise de correlação geno-fenotípica está detalhada na tabela 8. Indivíduos homozigotos para a mutação mais comum, c.3207C>A, (n=5) apresentaram uma idade média de apresentação clínica de $33,4 \pm 4,82$ anos (mediana=33), comparado com $15,7 \pm 3,21$ anos (mediana=17 anos) para heterozigotos compostos (n=3) e $19,5 \pm 8,55$ anos (mediana=18 anos) para o restante dos casos (n=15). Todos os cinco pacientes homozigotos para a mutação c.3207C>A apresentavam doença hepática, observando-se também manifestações neurológicas em três destes.

TABELA 8 – GENOTIPAGEM *ATP7B* E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS EM 23 PACIENTES SUL-BRASILEIROS COM DW

Genotipagem	Caso- índice, Caso não- índice (n)	Idade média apresentação clínica, diagnóstico (anos)	Principal órgão afetado		Órgãos Afetados
			Fígado (n)	Cérebro (n)	
[c.51+4A>T] / [c.1934T>G]	1, 0	41, 44	0	1	C
[c.2336G>A] / [c.2336G>A]	1, 0	15, 16	1	0	F
[c.2336G>A] / [c.2018-2030del13]	1, 0	15, 15	1	0	F
[c.2123T>C] / [-]	1, 0	18, 21	0	1	C
[c.2304delC] / [-]	1, 0	12, 19	1	0	C, F
[c.2672G>T] / [-]	1, 0	19, 20	1	0	F, R
[c.2304dupC] / [-]	2, 0	14, 15	1	1	C, F, R
[c.2304dupC] / [c.3207C>A]	1, 0	12, 13	0	1	C
[c.2762G>A] / [-]	1, 0	26, 27	1	0	F
[c.3818C<T] / [-]	1, 0	34, 36	0	1	C
[c.3402delC] / [-]	1, 1	A, 12	2	0	C, F
[c.3402delC] / [c.3402delC]	1, 0	16, 17	0	1	C
[c.4093InsT] / [c.2672G>T]	1, 0	22, 22	1	0	F
[c.4093InsT] / [-]	1, 0	A, 26	0	0	A
[c.3207C>A] / [-]	2, 0	17, 18	1	1	C, F
[c.3207C>A] / [c.3207C>A]	3, 2	33, 36	2	3	C, F, R

FONTE: O autor (2011).

NOTA: n = 23.

LEGENDA: A= assintomático; F= fígado; C= cérebro; R= rim.

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo descrevem uma população portadora de DW com divisão homogênea entre os sexos. A idade média de apresentação clínica (23,2 anos) equipara-se às descrições da literatura, demonstrando que o quadro clínico geralmente se aflora entre a segunda e terceira décadas de vida (STRICKLAND *et al.*, 1975; RUBINSTEIN *et al.*, 1987; BONO *et al.*, 2002). Outros estudos, todavia, descrevem o início das manifestações clínicas em extremos de idade (STRICKLAND *et al.*, 1975; ALA, 2005).

As informações mais recentes da literatura demonstram redução progressiva do tempo decorrido entre o início da sintomatologia e o diagnóstico da DW (MACHADO *et al.*, 2006). Em nosso meio percebe-se, entretanto, um intervalo médio (2,3 anos) entre a clínica inicial e o diagnóstico relativamente prolongado para os tempos atuais. Este fato pode refletir apresentações clínicas mais brandas e inespecíficas na população estudada e/ou estar relacionado a uma falha na disseminação do conhecimento médico, gerando diagnósticos tardios ou errôneos que acarretam prejuízo no tratamento e potencializam o desenvolvimento de lesões irreversíveis ou mesmo a necessidade de encaminhamento precoce para TH. De modo similar ao observado em nossa população, Merle *et al.* ressaltam em seu estudo as dificuldades para se obter o diagnóstico de DW, detectando um intervalo de tempo médio de 2,1 anos (2007).

No presente estudo as apresentações neurológicas e mistas da DW estiveram significativamente associadas a um maior intervalo de tempo para o diagnóstico quando comparadas à apresentação hepática. Corroborando estes dados, Merle *et al.*, no ano de 2007, demonstraram que a apresentação neurológica também esteve associada

com um tempo significativamente maior para o diagnóstico do que a forma hepática (44,4 *versus* 14,4 meses, $p=0,004$). Outros relatos da literatura descrevem achados similares (DEGUTI *et al.*, 2004; SCHIEFERMEIER *et al.*, 2000). Embora tenha existido menor intervalo de tempo para o diagnóstico dos pacientes com apresentação hepática, não se observa nesta população diferença entre as idades médias ao diagnóstico das diferentes formas clínicas.

Apesar do defeito patogênico fundamental da DW se concentrar no sistema hepato-biliar, as conseqüências do acúmulo de cobre disseminado são demonstradas em diversos órgãos e tecidos. Estas manifestações multi-sistêmicas produzem um quadro clínico de ampla variabilidade determinando um desafio ao diagnóstico clínico.

Corroborando as descrições de inúmeros estudos da literatura verificou-se ampla variabilidade de manifestações clínicas na população estudada. Salienta-se que a maior parcela dos pacientes possuía sinais e sintomas de doença hepática (69,5%). Alguns autores acreditam que todos os pacientes com DW, sintomáticos ou não, apresentam algum grau de disfunção hepática e que esta esteja presente entre 40 e 50% dos casos por ocasião do diagnóstico inicial (BREWER *et al.*, 2001).

As manifestações hepáticas na DW podem assumir diversas formas, com o espectro de sinais variando desde uma simples hepatomegalia até quadro graves de insuficiência hepática aguda (PFEIFFER, 2007). Entretanto, o modo mais freqüente de apresentação da doença hepática na DW é o desenvolvimento de cirrose progressiva e silenciosa.

Assim como foi demonstrado no presente estudo, dados da literatura comprovam que a cirrose não apresenta características específicas na DW e o quadro histológico,

histoquímico e ultraestrutural do parênquima hepático é multi-variável (FAA *et al.*, 1996).

AKF foram detectados em 55,6% dos pacientes, com uma maior frequência entre aqueles com alterações neuro-psiquiátricas (77,8%). Relatos da literatura descrevem a presença do AKF em frequências que variam de 66,3 a 95% (FINELLI, 1995; MERLE *et al.*, 2007; WIEBERS *et al.*, 1977). Teoricamente este achado seria virtualmente observado em todos os pacientes com doença neurológica, com uma menor frequência nos com doença hepática (ROSS *et al.*, 1985).

Neste estudo 55,6% dos pacientes com DW apresentavam sinais e sintomas neurológicos por ocasião do diagnóstico. Dados da literatura demonstram que ao diagnóstico, 40-50% dos pacientes de DW apresentam sintomas neurológicos e/ ou neuro-psiquiátricos (ALA *et al.*, 2007). Avanços nas técnicas de neuroimagem, sobretudo o advento da ressonância nuclear magnética (RNM), auxiliaram na compreensão da patofisiologia da DW. De fato, além do sinal da face do panda gigante, sinais hiperintensos envolvendo gânglios da base, tálamo e tronco cerebral são extremamente sugestivos de DW (PRASHANTH *et al.*, 2010). As alterações na RNM normalmente são mais intensas e disseminadas em pacientes com apresentação neurológica (KOZIC *et al.*, 2003), correlacionando-se fortemente com a gravidade da doença (SINHA *et al.*, 2006).

A população brasileira é constituída por uma grande mistura racial. Segundo Moraes e Moraes (1996), dentre os países tropicais, o Brasil é aquele que apresenta maior população caucasóide, descendente principalmente dos colonizadores portugueses, mas também, de espanhóis, italianos, alemães, holandeses, entre outros. A população negra é descendente de africanos das regiões da Nigéria e do Congo ou

da África Equatorial, os índios originaram-se principalmente dos grupos Tapuias e Tupis e ocorreu uma grande colonização japonesa. A colonização do Estado do Paraná apresenta essa heterogeneidade e pode ser revista em artigo publicado por Probst *et al.* (2000).

A amostra de população avaliada neste estudo, todavia, é predominantemente da raça branca e com uma marcante característica de ascendência européia. Estes achados refletem o padrão populacional sul-brasileiro secundário ao processo migratório que se iniciou em meados do século XIX com o estabelecimento de políticas governamentais de incentivo à implantação de núcleos de colonos imigrantes no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (CORRÊA, 2005).

No Paraná os imigrantes alemães marcaram forte presença em todas as regiões do Estado. Em 1855 alemães originários da Prússia fundaram colônias localizadas na atual região de Castro. Entre 1877 e 1879 houve migração de alemães oriundos da Rússia (região do Rio Volga). Entretanto, a maior parte dos imigrantes chegou no início do século XX vindos diretamente do norte da Alemanha e se estabeleceram sobretudo nas regiões leste e sul (municípios de Curitiba, Ponta Grossa, Rio Negro, Irati, entre outros). Na mesma época, suábios da região do Rio Danúbio (na atualidade Suíça e Norte da França) colonizaram Guarapuava e imigrantes poloneses ocuparam as regiões de Cambé e Rolândia (norte do estado do Paraná) (IBGE, 2000).

Os primeiros colonos italianos chegaram ao Paraná em 1878 e se fixaram no litoral, porém pouco tempo após, migraram para a região de Curitiba. Salienta-se que em Santa Catarina imigrantes italianos provenientes da Sardenha já habitavam a região conhecida como Nova Itália (atuais Nova Trento e São João Batista) desde 1836 (IBGE, 2000).

Os povos eslavos (poloneses e ucranianos) formaram a maior corrente imigratória do estado do Paraná. Entre 1869 e 1920, estima-se que 60 mil poloneses entraram no Brasil, dos quais 95% se estabeleceram no Paraná. Houve também migração de russos, todavia em menor quantidade (IBGE, 2000).

No ano de 2000, visando definir a micro evolução populacional e traçar o perfil genético aproximadamente um século após o término do processo de colonização, Braun-Prado *et al.* estudaram os genes do HLA-A, -B e -C de 150 caucasianos, 158 mulatos, 40 negros e 15 orientais provenientes de toda a região metropolitana de Curitiba, capital do Estado do Paraná. Os resultados obtidos demonstraram que na atualidade a população branca possui herança genética européia em 94,4%, negra-africana em 2,5% e ameríndia em 3,1%; já os mulatos possuem herança européia em 57,2%, negra-africana em 38,7% e ameríndia em 4,1% e; os negros herança européia em 24,8%, negra-africana em 74% e ameríndia em 1,2%.

Baseado nos dados históricos de colonização e nas informações recentes do padrão genético evolutivo foi possível determinar que a população avaliada no presente estudo compartilhe características genéticas mais similares às da população setentrional européia e difere, em sua grande maioria, das características genéticas do restante da população brasileira na qual a influência indígena, africana e portuguesa é predominante.

Neste estudo observamos uma elevada taxa de abortamento (12 casos). Até o presente momento poucos trabalhos da literatura avaliaram a fertilidade e a evolução de gestações em pacientes com DW (SHAGEN VAN LEEUEWEN *et al.*, 1991; SINHA

et al., 2004). Estes autores relatam que abortamentos recorrentes são comuns, especialmente na ausência de tratamento adequado para DW. Entretanto, gestações a termo e bem-sucedidas podem ocorrer (SINHA *et al.*, 2004).

Informações sobre qualidade de vida e aspectos sociais em pessoas com DW são escassos na literatura (KOMAL KUMAR *et al.*, 2008), todavia, com a disponibilidade de tratamento adequado para a doença, o tempo de sobrevivência é prolongado e estes fatores tornam-se cada vez mais relevantes. Dados do presente estudo demonstram que é possível para pacientes com DW atingirem um nível adequado de qualidade de vida, atuação profissional e inclusão social.

O tratamento medicamentoso para DW é necessário por toda a vida. As opções terapêuticas atuais incluem a D-penicilamina, trientine, sais de zinco e tetratiomolibdato de amônio. D-penicilamina e trientine agem como quelantes do cobre aumentando a sua excreção urinária. A melhor estratégia terapêutica permanece controversa e não há um regime universalmente aceito (ALA *et al.*, 2007). Entretanto, a D-penicilamina é a droga mais comumente utilizada e considerada a terapia de primeira linha, apesar de não haverem estudos demonstrando sua superioridade ou inferioridade aos sais de zinco e trientine (FERENCI, 2004; LOWETTE *et al.*, 2010).

No presente estudo descreve-se a análise de uma população tratada e acompanhada por um período superior a 10 anos. A maioria dos pacientes foi tratada com D-penicilamina (n=33). A escolha por sais de zinco foi realizada em paciente assintomático, durante gestação, na tentativa de coibir evolução rápida de doença neurológica e por efeitos colaterais da D-penicilamina. Apesar de não ser consenso,

alguns autores sugerem que a D-penicilamina não deveria ser a droga de escolha para pacientes com quadro neurológico uma vez que este agente poderia ser capaz de induzir o desenvolvimento ou agravamento de sintomas neurológicos (MERLE *et al.*, 2007).

A D-penicilamina é um medicamento com alta incidência de efeitos indesejáveis, alguns dos quais potencialmente fatais. Desta forma, torna-se necessária a vigilância e rastreamento constantes nas avaliações de pacientes em tratamento crônico. Alguns dos eventos adversos mais comuns incluem: erupções cutâneas, prurido (5%), dor epigástrica, náuseas e diarreia ocasional (17%), alterações da percepção do paladar (12%), leucopenia (2%), trombocitopenia (4%), proteinúria, glomerulopatia membranosa (6%), entre outros com menor prevalência.

O desenvolvimento de elastose perfurante serpiginosa associado ao uso de D-penicilamina é raro, e foi descrito em pacientes portadores de DW em terapia crônica com a medicação. A elastose perfurante serpiginosa é uma dermatose perfurante caracterizada pela eliminação transepidérmica anormal de fibras elásticas. O mecanismo pelo qual a D-penicilamina desencadeia a doença permanece incerto (NA *et al.*, 2010; DEGUTI *et al.*, 2002).

A terapia medicamentosa e o transplante hepático promoveram a estabilização ou melhora do quadro clínico em 72,2% dos pacientes. No estudo de Rodrigo Agudo *et al.* (2008) esta porcentagem foi de 62%, enquanto no estudo de Merle *et al.* (2007) foi 76,1%.

O desenvolvimento de novos sintomas ou a progressão de pré-existentes foi mais comumente detectado em pacientes com manifestação neurológica (4/6) do que com manifestação hepática (2/6). De forma semelhante à observada em nosso estudo, a deteriorização do quadro clínico, apesar de terapêutica apropriada, parece ser altamente dependente da aderência do paciente, do início precoce do tratamento e da resposta individual à terapia (LOWETTE *et al.*, 2010).

Três pacientes faleceram durante o seguimento, um por desenvolvimento de câncer (leucemia) e dois em decorrência de falência hepática aguda. O desenvolvimento de carcinoma hepatocelular e outros tumores hepáticos em pacientes com DW é extremamente raro, apesar de existir um mecanismo comum de acúmulo de cobre na DW e também em algumas formas de neoplasias malignas. Embora a patogênese do câncer difira da patogênese da DW, ambas possuem defeitos similares na homeostasia do cobre e alguns agentes quelantes do cobre também são empregados como quimioterápicos (DANIEL *et al.*, 2004).

O gene *ATP7B* relacionado ao defeito básico na DW está localizado no braço longo do cromossomo 13 (*locus* 13q 14-21) e codifica uma proteína homônima, do padrão ATPase do tipo P, relacionada ao transporte de metais, que se expressa em maiores níveis no fígado e rins e em menor proporção no cérebro. Esta proteína transporta e liga o cobre e intermedeia a sua excreção na bile.

O presente estudo analisou as mutações do gene *ATP7B* em 23 pacientes de uma população com DW do sul do Brasil. Quatorze diferentes mutações foram encontradas, refletindo a heterogeneidade genética desta doença. A mutação mais

comumente detectada foi a substituição c.3207C>A no éxon 14, também denominada p.H1069Q. A segunda mutação mais prevalente foi a deleção c.3402delC no éxon 15 (p.A1135fs). Estas duas mutações respondem por aproximadamente 37% dos alelos estudados. Também foram descritas duas novas mutações potencialmente patogênicas: a c.2018-2030del13 no éxon 7 e a c.4093InsT no éxon 20.

As mutações mais prevalentes variam entre as populações. A substituição c.3207C>A no éxon 14 representa 35-50% dos alelos afetados em pacientes com DW na população europeia (BEHARI *et al.*, 2010). A sua frequência é maior em países do leste europeu (Alemanha, Polônia, Rússia, Ucrânia), apresentando decréscimo ao se avaliarem populações situadas a oeste e sul daquele continente (FERENCI, 2006). A alta ocorrência desta mutação na Europa setentrional e central provavelmente reflete sua origem nesta região (CACA *et al.*, 2001; GROMADZKA *et al.*, 2006).

No mediterrâneo europeu verifica-se uma ampla variabilidade de mutações com frequências variáveis entre cada país. Observam-se duas mutações mais prevalentes, uma deleção na 5' UTR (-441/-427del) e a substituição p.M645R no éxon 6 (FERENCI, 2006). Na Itália continental, todavia, Loudianos *et al.*, detectaram novamente a mutação c.3207C>A como a mais comum, com uma frequência alélica de 13-17% (1999).

Dados de países não europeus também são descritos na literatura, havendo na Ásia, especificamente na China, Coréia do Sul e Japão, predomínio da mutação p.R778L no éxon 8, com frequência alélica entre 27 e 74% (YE *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2004; CHUANG *et al.*, 1996).

Apesar do expressivo número de pacientes com as duas mutações acima discriminadas (p.H1069Q e p.R778L), há estudos como o realizado por Kumar *et al.* na população indiana no qual as mesmas não foram detectadas em nenhum caso (2005). De fato, na Índia, vários grupos reportaram 51 diferentes mutações, incluindo 34 não descritas anteriormente e originadas de diferentes partes do país (BEHARI *et al.*, 2010).

Os estudos de frequência de mutações em pacientes com DW provenientes dos Estados Unidos da América, Canadá e Austrália possuem limitações em decorrência da heterogeneidade étnica dos imigrantes destes países. Um estudo realizado com pacientes caucasianos norte-americanos demonstrou a mutação p.H1069Q como a mais prevalente, com uma frequência alélica de 35,2% (SHAH *et al.*, 1997), possivelmente refletindo aspectos da colonização européia.

Destaca-se que, apesar de inúmeras mutações descritas em todo o mundo, não existem informações a respeito destas nos portadores de DW do continente africano até o presente momento.

O primeiro estudo realizado na América do Sul, por Deguti *et al.* no ano de 2004, avaliou 60 brasileiros, encontrando 25 mutações distintas, das quais 12 descritas pela primeira vez, sendo a mais freqüente a c.3402delC no éxon 15 (30,8%), seguida da p.L708P (16,7%). No ano de 2008, Machado *et al.*, avaliando 41 pacientes com manifestação neurológica, encontrou como mutação mais prevalente c.3402delC (31,7%), seguida da p.L708P (15,8%).

Em nossa casuística, envolvendo pacientes do sul do Brasil, a mutação mais prevalente foi a p.H1069Q, encontrada em 28,3% dos indivíduos. Salieta-se que no

estudo de Deguti *et al.* (2004) não se encontrou esta mutação e no estudo de Machado *et al.*, (2008) apenas 3 pacientes (6%) apresentavam a mesma. Provavelmente, em decorrência do padrão de colonização a que se submeteu o sul-brasileiro, parece existir uma semelhança maior com o padrão de mutação europeu do que com o padrão descrito previamente em outras amostras de pacientes brasileiros.

Diversos padrões regionais de mutações do gene *ATP7B* são observados em países com grandes extensões territoriais, tais como Índia, China e Estados Unidos da América. Considerando que o Brasil é um país continental, o estudo da distribuição regional das freqüências das mutações torna-se importante devido aos diferentes padrões de imigração associado à alta miscigenação populacional.

A tabela 9 demonstra o padrão mais freqüente de mutação do gene *ATP7B* em diferentes amostras de pacientes com DW e determina o contexto genético em que se situam os pacientes desta amostra.

TABELA 9 – MUTAÇÕES DO GENE *ATP7B* EM AMOSTRAS DE PACIENTES COM DW EM DIFERENTES PAÍSES

Mutação <i>ATP7B</i>	País	n	Frequência alélica	Autores	Ano
éxon 2 p.C271X	Índia	62	18%	Gupta <i>et al</i>	2005
éxon 6 p.M645R	Espanha	40	27%	Margarit <i>et al</i>	2005
éxon 8 p.L708P	Ilhas Canárias	24	64%	Garcia-Villareal <i>et al</i>	2000
éxon 8 p.R778L	China	50	64%	Ye <i>et al</i>	2007
	China	75	74%	Liu <i>et al</i>	2004
	Taiwan	22	27%	Chuang <i>et al</i>	1996
éxon 9 p.G591D	Itália	134	38%	Lepori <i>et al</i>	2007
éxon 13 p.2874delC	Japão	23	30%	Shimizu <i>et al</i>	1995
éxon 14 p.H1069Q	Alemanha	82	63%	Caca <i>et al</i>	2001
	Áustria	125	34%	Ferenci <i>et al</i>	2005
	Brasil	23	28%	de Bem*	2011
	Bulgária	89	58%	Todorov <i>et al</i>	2005
	EUA	118	38%	Shah <i>et al</i>	1997
	Grécia	24	28%	Loudianos <i>et al</i>	2000
	Hungria	118	47%	Ferenci <i>et al</i>	2005
	Inglaterra	26	48%	Butler <i>et al</i>	2001
	Itália	99	17%	Loudianos <i>et al</i>	1999
	Polônia	142	72%	Gromadzka <i>et al</i>	2006
	Reino Unido	42	17%	Curtis <i>et al</i>	1999
	República Checa	200	57%	Vrabelova <i>et al</i>	2005
	Rússia	42	60%	Karabanov <i>et al</i>	2001
	Sérvia	35	48%	Loudianos <i>et al</i>	2003
Suécia	42	38%	Shah <i>et al</i>	1997	
éxon 15 p.A1135fs	Brasil	60	31%	Deguti <i>et al</i>	2004
	Brasil	41	32%	Machado <i>et al</i>	2008
éxon 15 p.I1102T	Índia	43	6%	Kumar <i>et al</i>	2005
éxon 21 p.Q1399R	Arábia Saudita	56	32%	Al Jumah <i>et al</i>	2004

FONTE: O autor (2011).

* Os dados são referentes ao presente estudo.

Até o momento, aproximadamente 400 diferentes mutações distribuídas em todo o gene *ATP7B* foram descritas para a DW (COX, 2009). Este grande número de mutações torna a distribuição genotípica da doença complexa. A maior parte dos pacientes é heterozigótico composto, apresentando duas mutações diferentes no gene. Acredita-se que os tipos de mutação e a sua posição provavelmente têm relação direta com o grau de disfunção das proteínas transcritas, resultando em variações amplas no metabolismo do cobre e por fim, a fenótipos diversos (ALA *et al.*, 2007).

Uma ampla variedade de publicações recentes, algumas delas brasileiras, tem avaliado o papel dos diferentes genótipos *ATP7B* na determinação da variabilidade fenotípica na DW. Entretanto, a raridade da doença associado ao número elevado das mutações dificultam a correlação entre genótipo e fenótipo.

Estudos demonstram que a mutação p.H1069Q cursa em sua forma homozigótica com um distúrbio menos grave do metabolismo do cobre, associando-se a um início mais tardio dos sintomas e predominância de clínica neurológica (STAPELBROEK *et al.*, 2004; VRABELOVA *et al.*, 2005). Em contraste, dados da literatura demonstram que determinados padrões de mutação (*nonsense*, *frameshift* e *splice site*, a saber: término de leitura, erro de leitura e mutação intrônica, respectivamente) correlacionam-se com o início mais precoce dos sintomas e com um distúrbio mais significativo do metabolismo do cobre (GROMADZKA *et al.*, 2005).

A investigação da correlação geno-fenotípica no presente estudo foi dificultada pela raridade das mutações e pelo pequeno número de pacientes analisados. Entretanto, pode-se demonstrar que indivíduos homozigóticos para a mutação

p.H1069Q apresentavam uma maior idade de início dos sintomas e ao diagnóstico do que pacientes heterozigóticos ou portadores de outras mutações. Ao contrário do descrito por outros autores, não foi possível correlacionar esta mutação com a predominância de sintomas neurológicos. Alguns grupos também falharam em demonstrar esta correlação (SHAH *et al.*, 1997; THOMAS *et al.*, 1995).

Descreve-se que a apresentação clínica na DW varia mesmo entre pacientes portadores da mesma mutação em sua forma homozigótica. Deste modo sugere-se que fatores genéticos, epigenéticos e ambientais possam influenciar o fenótipo da doença, como a ingestão diária de cobre, a capacidade individual de resposta a sobrecarga de cobre, o genótipo ApoE, capacidade funcional das metalotioneínas, o polimorfismo do gene priônico humano e as mutações no COMMD1 (DEGUTI *et al.*, 2004; PANDIT *et al.*, 2002 e SENZOLO *et al.*, 2007; SCHIEFERMEIER *et al.*, 2000; MERLE *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2010).

Os resultados deste estudo ampliam os conhecimentos sobre o comportamento e o diagnóstico molecular da doença de Wilson em pacientes sul-brasileiros. Nesta população, aproximadamente 40% das mutações do gene *ATP7B* estão localizadas nos éxons 14 e 15. Estes dados podem ser utilizados para o direcionamento da investigação genética em portadores de DW oriundos do sul do Brasil ou de outros países compostos por uma população na qual um número significativo de colonizadores imigrou de países localizados na Europa setentrional.

7 CONCLUSÕES

1. A mutação do gene *ATP7B* p.H1069Q foi a mais freqüente na população estudada, com freqüência alélica de 28,3%. A segunda mutação mais prevalente foi a p.A1135fs em 8,7%;
2. A amostra estudada apresentou discreto predomínio de manifestações hepáticas, sendo que as apresentações neurológicas e mistas da DW estiveram significativamente associadas a um maior intervalo de tempo para o diagnóstico quando comparadas à apresentação hepática;
3. As características de origem geográfica-continental nesta casuística denotaram ascendência européia em sua quase totalidade, havendo estreita correlação do perfil genético desta população com o observado em populações de mesma origem geográfica-continental;
4. A população estudada apresentou características diversas tanto fenotipicamente quanto genotipicamente das populações brasileiras de DW previamente descritas.

REFERÊNCIAS

AL JUMAH, M. *et al.* A clinical and genetic study of 56 Saudi Wilson disease patients: identification of Saudi-specific mutations. **Eur J Neurol**, Reino Unido, v. 11, p. 121-124, 2004.

ALA, A. *et al.* Wilson disease in septuagenarian siblings: raising the bar for diagnosis. **Hepatology**, Estados Unidos, v. 41, p. 668-670, 2005.

ALA, A. *et al.* Wilson's Disease. **Lancet**, Reino Unido, v. 369, p. 397-408, 2007.

BARBOSA, E. R. *et al.* Wilson's disease. A case report and historical review. **Arq Neuropsiquiatr**, Brasil, v. 67, p. 539-543, 2009.

BEHARI, M.; PARDASANI, V. Genetics of Wilson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, Estados Unidos, v. 16, p. 639-644, 2010.

BONO, W. *et al.* La maladie de Wilson. Étude Clinique, thérapeutique et évolutive de 21 cas. **Rev Méd Interne**, França, v. 23, p. 419-431, 2002.

BRAUN-PRADO, K. *et al.* HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. **Tissue Antigens**, Dinamarca, v. 56, p. 417-427, 2000.

BREWER, G. J. Recognition, diagnosis, and management of Wilson's disease. **Proc Soc Exp Biol Med**, Estados Unidos, v. 223, p. 39-46, 2000.

BREWER, G. J. **Wilson's Disease: A clinician's guide to recognition, diagnosis, and management**. Boston: Kluwer Academic Publishers, Estados Unidos, 2001.

BULL, P. C. *et al.* The Wilson Disease Gene is a putative copper transporting p-type ATPase similar to Menkes Gene. **Nat Genet**, Estados Unidos, v.5, p. 327-337, 1993.

BUSH, P. C.; MASTERS, C. L.; TANZI, R. E. Copper, β -amyloid, and Alzheimer's Disease: tapping a sensitive connection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Estados Unidos, v. 100, p. 11193-11194, 2003.

BUTLER, P.; MC INTYRE, N.; MISTRY, P.K. Molecular diagnosis of Wilson Disease. **Mol Genet Metab**, Estados Unidos, v. 72, p. 223-230, 2001.

CACA, K. *et al.* High prevalence of the H1069Q mutation in East German patients with Wilson disease: rapid detection of mutations by limited sequencing and phenotype-genotype analysis. **J Hepatol**, Dinamarca, v. 53, p. 575-581, 2001.

CHUANG, L. M. *et al.* High frequency of two mutations in codon 778 in exon 8 of the ATP7B gene in Twaiwanese families with Wilson Disease. **J Med Genet**, Reino Unido, v. 33, p. 521-523, 1996.

CORRÊA, L. S. As políticas públicas de imigração europeia não portuguesa para o Brasil – de Pombal à República. **Revista geo-paisagem**, Brasil, ano 4, n. 8, 2005.

COX, D. W. **Wilson Disease Mutation Database**. Disponível em <<http://www.medicalgenetics.med.ualberta.ca/wilson/index.php>> Última atualização da base de dados em 10 jul. 2009. Acesso em 01 dez. 2010.

CULOTTA, V. C.; GITLIN, J. D. Disorders of copper transport. *In* (SCRIVER, C. S. *et al.*) **The Molecular and Metabolic Basis of Inherited Disease**. New York: McGraw-Hill, Estados Unidos, p. 3105-3126, 2001.

CURTIS, D. *et al.* A study of Wilson disease mutations in Britain. **Hum Mutat**, Estados Unidos, v. 14, p. 303-311, 1999.

DANIEL, K. G. *et al.* Copper storage diseases: Menkes, Wilsons, and cancer. **Front Biosci**, Estados Unidos, v. 1, p. 2652-2662, 2004.

DEGUTI, M. M. *et al.* Elastosis perforans serpiginosa secondary to D-penicillamine treatment in a Wilson's disease patient. **Am J Gastroenterol**, Estados Unidos, v. 97, p. 2153-2154, 2002.

DEGUTI, M. M. *et al.* Wilson Disease: novel mutations in the ATP7B gene and clinical correlations in brazilian patients. **Hum Mutat**, Estados Unidos, v. 23, p. 398-406, 2004.

DHAWAN, A. *et al.* Genes and metals: a deadly combination. **Acta Gasto-enterologica Belgica**, Bélgica, v. 68, supl. 1, p. 26-32, 2005.

FAA, G. The role of the pathologist in the diagnosis and monitoring of Wilson´s Disease. **Pathologica**, Itália, v. 88, p. 102-110, 1996.

FERENCI, P. Pathophysiology and clinical features of Wilson disease. **Metab Brain Dis**, Estados Unidos, v. 19, p. 229-239, 2004.

FERENCI, P. *et al.* Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. **Liver Int**, Canadá, v. 23, p. 139-142, 2003.

FERENCI, P. *et al.* Phenotype-genotype correlations in Wilson disease (DW) – results of a multinational study. **Hepatology**, Estados Unidos, v. 42, S. 1, p. 258A, 2005.

FERENCI, P. Wilson's Disease. **Clin Gastroenterol Hepatol**, Estados Unidos, v. 3, p. 726-733, 2005.

FERENCI, P. Regional distribution of mutations of the ATP7B gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing. **Hum Genet**, Alemanha, v. 120, p. 151-159, 2006.

FINELLI, P. F. Kayser-Fleischer ring: Hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). **Neurol**, Estados Unidos, v. 45, p. 1261-1262, 1995.

GARCIA-VILLARREAL, L. *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**, Estados Unidos, v. 32, p. 1329-1336, 2000.

GROMADZKA, G.; SCHMIDT, H. H.; GENSCHEL, J. 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**, Estados Unidos, v. 68, p. 524-532, 2005.

GROMADZKA, G. *et al.* p.H1069Q mutation in ATP7B and biochemical parameters of copper metabolism and clinical manifestation of Wilson's disease. **Mov Disord**, Estados Unidos, v. 21, p. 245-248, 2006.

GUPTA, A. *et al.* Molecular pathogenesis of Wilson disease: haplotype analysis, detection of prevalent mutations and genotype-phenotype correlation in Indian patients. **Hum Genet**, Alemanha, v. 118, p. 49-57, 2005.

GUPTA, A. *et al.* A novel COMMD1 mutation Thr174Met associated with elevated urinary copper and signs of enhanced apoptotic cell death in a Wilson disease patient. **Behav Brain Funct**, Reino Unido, v. 6, p. 33, 2010.

HALL, H. C. *La Dégénérescence hépato-lenticulaire*. Paris, Masson, 1921.

HART, E. B. *et al.* Iron in nutrition: IX. Further proof that the anemia produces on diets of whole milk and iron is due to a deficiency of copper. **J Biol Chem**, Estados Unidos, v. 83, p. 251-260, 1929.

IBGE. **Brasil 500 anos de povoamento**. Rio de Janeiro: IBGE, Brasil, 2000.

KARABANOV, A. V. *et al.* Analysis of mutations in ATP7B gene and experience with direct DNA-diagnosis in hepato-lenticular degeneration. **Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova**, Rússia, v. 101, p. 44-47, 2001.

KITZBERGER, R.; MADL, C.; FERENCI, P. Wilson Disease. **Metab Brain Dis**, Estados Unidos, v. 20, p. 295-302, 2005.

KLOMP, A. E. *et al.* Biochemical characterization and subcellular localization of human copper transport 1 (hCTR1). **Biochem J**, Reino Unido, v. 364, p. 497-505, 2002.

KOMAL KUMAR, R. N. *et al.* Quality of life in Wilson's Disease. **Ann Indian Acad Neurol**, India, v. 11, p. 37-40, 2008.

KOZIC, D. *et al.* MR imaging of the brain in patients with hepatic form of Wilson's disease. **Eur J Neurol**, Reino Unido, v. 10, p. 587-592, 2003.

KUMAR, S. *et al.* Identification and molecular characterization of 18 novel mutations in the ATP7B gene from Indian Wilson disease patients: genotype. **Clin Genet**, Estados Unidos, v. 67, p. 443-445, 2005.

LEE, J. *et al.* Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. **J Biol Chem**, Estados Unidos, v. 277, p. 4380-4387, 2001.

LEPORI, M. B. *et al.* Twenty-four novel mutations in Wilson Disease patients of predominantly Italian origin. **Genet Test**, Estados Unidos, v. 11, p. 328-332, 2007.

LIECHTI-GALLATI, S. *et al.* Two buffer PAGE system-based SSCP/HD analysis: a general protocol for rapid and sensitive mutation screening in cystic fibrosis and any other human genetic disease. **Eur J Hum Genet**, Reino Unido, v. 7, p. 590-598, 1999.

LIU, X. Q. *et al.* Correlation of ATP7B genotype with phenotype in Chinese patients with Wilson disease. **World J Gastroenterol**, China, v. 10, p. 590-593, 2004.

LOUDIANOS, G. *et al.* Mutation analysis in patients of Mediterranean descent with Wilson disease: identification of 19 novel mutations. **J Med Genet**, Reino Unido, v. 36, p. 833-836, 1999.

LOUDIANOS, G. *et al.* Delineation of the spectrum of Wilson disease mutations in the Greek population and the identification of six novel mutations. **Genet Test**, Estados Unidos, v. 4, p. 399-402, 2000.

LOUDIANOS, G. *et al.* Characterization of the molecular defect in the ATP7B gene in Wilson Disease patients from Yugoslavia. **Genet Test**, Estados Unidos, v. 7, p. 107-112, 2003.

LOWETTE, K. F. *et al.* Wilson's disease: long-term follow-up of a cohort of 24 patients treated with D-penicillamine. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, Reino Unido, v. 22, p. 564-571, 2010.

MACHADO, A. A. C. *et al.* Neurological manifestations in Wilson's disease: report of 119 cases. **Mov Disord**, Estados Unidos, v. 21, p. 2192-2196, 2006.

MACHADO, A. A. C. *et al.* Neurological manifestations and ATP7B mutations in Wilson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, Estados Unidos, v. 14, p. 246-249, 2008.

MARGARIT, E. *et al.* Mutation analysis of Wilson disease in the Spanish population--identification of a prevalent substitution and eight novel mutations in the ATP7B gene. **Clin Genet**, Estados Unidos, v. 68, p. 61-68, 2005.

MENKES, J. H. *et al.* A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair and focal cerebral and cerebellar degeneration. **Pediatrics**, Estados Unidos, v. 29, p. 764-769, 1962.

MERCER, J. F. B. *et al.* Isolation of a partial candidate gene for Menkes disease by positional cloning. **Nat Genet**, Estados Unidos, v. 3, p. 20-25, 1993.

MERLE, U. *et al.* Influence of homozygosity for methionine at codon 129 of the human prion gene on the onset of neurological and hepatic symptoms in Wilson disease. **Arch Neurol**, Reino Unido, v. 17, p. 549-552, 2006.

MERLE, U. *et al.* Clinical presentation, diagnosis, and long-term outcome of Wilson disease: a cohort study. **Gut**, Reino Unido, v. 56, p. 115-120, 2007.

MORAES, J. R. F.; MORAES, M. E. H. Distribuição dos alelos HLA na população brasileira. **Hematologia Hemoterapia**, Brasil, v. 1, p. 18-23, 1996.

NA, S. Y. *et al.* Penicillamine-induced elastosis perforans serpiginosa and cutis laxa in a patient with Wilson's disease. **Ann Dermatol**, França, v. 22, p. 468-471, 2010.

NARATA, A. P. *et al.* Doença de Wilson: manifestação clínica inicial e apresentação clínica em 30 pacientes. **O Dendrito**, Brasil, v. 8, p. 72-76, 2002.

PANDIT, A. N.; BHAVE, S.A. Cooper metabolic defects and liver disease: environmental aspects. **J Gastroenterol Hepatol**, Austrália, v. 17, p. S403-407, 2002.

PENÃ, M. M. O. *et al.* A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. **J Nutr**, Estados Unidos, v. 129, p. 1251-1260, 1999.

PETRUKHIN, K. *et al.* Characterization of the Wilson's Disease gene encoding a p-type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing and structure/function predictions. **Hum Mol Genet**, Reino Unido, v. 3, p. 1647-1656, 1994.

PFEIFFER, R. F. Wilson's Disease. **Seminars in Neurology**, Estados Unidos, v. 27, p. 123-132, 2007.

PRASHANTH, L. K. *et al.* Prognostic factors in patients presenting with severe neurological forms of Wilson's disease. **QJM – An International Journal of Medicine**. Inglaterra, v. 98, p. 557-563, 2005.

PRASHANTH, L. K. *et al.* Do MRI features distinguish Wilson's disease from other early onset extrapyramidal disorders? An analysis of 100 cases. **Mov Disord**, Estados Unidos, v. 25, p. 672-678, 2010.

PROBST, C. H. *et al.* HLA polymorphism and evaluation of European, African and Amerindian contribution to the White and Mulatto populations from Paraná, Brazil. **Human Biol**, Estados Unidos, v. 72, p. 597-617, 2000.

RAE, T. *et al.* Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. **Science**, Estados Unidos, v. 284, p. 805-808, 1999.

RODRIGO AGUDO, J. L. *et al.* Clinical presentation, diagnosis, and long-term outcome of 29 patients with Wilson's disease. **Rev Esp Enferm Dig**, Espanha, v. 8, p. 456-461, 2008.

ROSS, M. E. *et al.* Late-onset Wilson's disease with neurological involvement in the absence of Kayser-Fleischer rings. **Ann Neurol**, Estados Unidos, v. 17, p. 411-413, 1985.

RUBINSTEIN, S. S. *et al.* Clinical assessment of 31 patients with Wilson's Disease. Correlations with structural changes on magnetic resonance imaging. **Arch Neurol**, Reino Unido, v. 44, p. 365-370, 1987.

SAIKI, R. K. *et al.* Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA DQ alfa DNA. **Nature**, Reino Unido, v. 324, p. 163-166, 1986.

SCHAEFER, M. *et al.* Hepatocyte-specific localizations and copper-dependent trafficking of the Wilson's Disease protein in the liver. **Am J Physiol**, Estados Unidos, v. 276, p. 639-646, 1999.

SCHIERFERMEIER, M. *et al.* The impact of apolipoprotein E genotypes on age at onset of symptoms and phenotypic expression in Wilson's Disease. **Brain**, Reino Unido, v. 123, p. 585-590, 2000.

SCHILSKY. M. L.; OIKONOMOU, I. Inherited metabolic liver disease. **Curr Opin Gastroenterol**, Inglaterra, v. 31, p. 275-282, 2005.

SEIDEL, J. *et al.* Disturbed copper transport in humans. Part 2: mutations of the ATP7B gene lead to Wilson disease (WD). **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**. França, p. 149-157, 2001.

SENZOLO, M. *et al.* Different neurological outcome of liver transplantation for Wilson's disease in two homozygotic twins. **Clin Neurol Neurosurg**, Estados Unidos, v. 109, p. 71-75, 2007.

SHAGEN VAN LEEUWEN, J. H. *et al.* Recurrent abortion and the diagnosis of Wilson Disease. **Obstet Gynecol**, Estados Unidos, v. 78, p. 547-549, 1991.

SHAH, A. B. *et al.* Identification and analysis of mutations in the Wilson Disease gene (ATP7B): population frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analyses. **Ann J Hum Genet**, Estados Unidos, v. 61, p. 317-328, 1997.

SHIMIZU, N. *et al.* A novel RNA splicing mutation in Japanese patients with Wilson disease. **Biochem Biophys Res Commun**, Estados Unidos, v. 217, p. 16-20, 1995.

SINHA, S. *et al.* Successful pregnancies and abortions in symptomatic Wilson's Disease. **J Neurol Sci**, Estados Unidos, v. 217, p. 37-40, 2004.

SINHA, S. *et al.* Wilson's disease: cranial MRI observations and clinical correlation. **Neuroradiology**, Alemanha, v. 48, p. 613-621, 2006.

STAPELBROEK, J. M. *et al.* The H1069Q mutation in ATP7B is associated with late and neurologic presentation in Wilson disease: results of a meta-analysis. **J Hepatol**, Dinamarca, v. 41, p. 758-763, 2004.

STRICKLAND, G. T.; LEU, M. L. Wilson's disease: clinical and laboratory manifestations in 40 patients. **Medicine**, Estados Unidos, v. 54, p. 113-137, 1975.

TANZI, R. E. *et al.* The Wilson Disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes Disease gene. **Nat Genet**, Estados Unidos, v. 5, p. 344-350, 1993.

THOMAS, G. R. *et al.* The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. **Nat Genet**, Estados Unidos, v. 9, p. 210-217, 1995.

TODOROV, T. *et al.* Spectrum of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B) in the Bulgarian population. **Clin Genet**, Estados Unidos, v. 68, p. 474-476, 2005.

VRABELOVA, S. *et al.* Mutation analysis of the ATP7B gene and the genotype/phenotype correlation in 227 patients with Wilson Disease. **Mol Genet Metab**, Estados Unidos, v. 86, p. 277-285, 2005.

VULPE, C. *et al.* Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper transporting ATPase. **Nat Genet**, v.3, p. 7-13, 1993.

WALSHE, J. M. Penicillamine, a new oral therapy for Wilson's disease. **Am J Med**, Estados Unidos, v. 21, p. 487-495, 1956.

WIEBERS, D. O.; HOLLENHORST, R. W.; GOLDSTEIN, N. P. The ophthalmologic manifestations of Wilson's disease. **Mayo Clin Proc**, Estados Unidos, v. 52, p. 409-416, 1977.

WILSON, S. A. K. Progressive Lenticular Degeneration: A Familial Nervous Disease Associated with Cirrhosis of the Liver. **Brain**, Reino Unido, v. 34, p. 295, 1912.

YAMAGUCHI, Y. *et al.* Isolation and Characterization of a Human Liver cDNA as a Candidate Gene for Wilson Disease. **Biochem Biophys Res Commun**, Estados Unidos, v. 197, p. 271-277, 1993.

YE, S. *et al.* Wilson disease: identification of two novel mutations and clinical correlation in Eastern Chinese patients. **World J Gastroenterol**, China, v. 13, p. 5147-5150, 2007.

APÊNDICE 1



Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação Guia de Fontes em Pesquisa

Sábado, 29/04/2006 - 14:33

Pesquisador por palavra-chave | Pesquisador pelo Nome | [Busca Pesquisa](#)

Busca pesquisas da UFPR

Número da Pesquisa: 2006019287

Título da Pesquisa:

Avaliação genética de pacientes com Doença de Wilson e seus familiares

Nome do Pesquisador: RICARDO SCHMITT DE BEM

Área do Conhecimento: Gastroenterologia

Local da Pesquisa: DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

Data da Aprovação: 19/04/2006

Situação da Pesquisa: PROJETO NOVO

Ementa:

A Doença de Wilson (DW) é uma enfermidade herdada por caráter autossômico recessivo e que se caracteriza por um desarranjo no metabolismo do cobre, resultando no acúmulo deste metal de maneira patológica em diversos tecidos. Tendo em vista as inúmeras mutações descritas nesta doença, objetivamos traçar o perfil genó e fenotípico de 20 pacientes com DW e seus familiares de I Grau (n= 80) por meio de investigação clínica, laboratorial, histopatológica e genética, possibilitando um melhor entendimento desta doença em nosso meio (Sul do Brasil) em decorrência da grande miscigenação populacional.

CAAE - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

Página 1 de 2



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PROJETO RECEBIDO NO CEP		CAAE - 0060.0.208.000-06	
Projeto de Pesquisa AVALIAÇÃO GENÉTICA DE PACIENTES COM DOENÇA DE WILSON E SEUS FAMILIARES.			
Área(s) Temática(s) Especial(s) Genética Humana		Grupo Grupo II	Fase Não se aplica
Pesquisador Responsável			
CPF 02196835900	Pesquisador Responsável Ricardo Schmitt de Bem	<i>Ricardo Schmitt de Bem</i> Assinatura	
Comitê de Ética			
Data de Entrega 11/05/2006	Recebimento:	<i>[Assinatura]</i> Assinatura	

Este documento deverá ser, obrigatoriamente, anexado ao Projeto de Pesquisa.

APÊNDICE 2



Curitiba, 20 de dezembro de 2006

Ilmo (a) Sr. (a)
Ricardo Schmitt de Bem
Nesta

Prezado Pesquisador:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO GENÉTICA DE PACIENTES COM DOENÇA DE WILSON E SEUS FAMILIARES", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião extraordinária realizada no dia 30 de maio de 2006. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0060.0.208.000-06

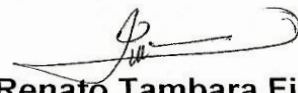
Registro CEP: 1216.064/2006-05

Protocolo versão I – 10/maio/2006, Termos de Consentimentos Livres e Esclarecidos versão I de 10/maio/2006.

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 20 de junho de 2007.

Atenciosamente,



Renato Tambara Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

APÊNDICE 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – **PACIENTE**

- a) Você tem tipo de doença denominado de: **DOENÇA DE WILSON** e está sendo convidado a participar de um estudo intitulado **Avaliação Genética de Pacientes com Doença de Wilson e seus Familiares**. É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços na medicina, e sua participação é de fundamental importância.
- b) O objetivo desta pesquisa é TRAÇAR O PERFIL GENO E FENOTÍPICO (INVESTIGAR A MUTAÇÃO GENÉTICA E CORRELACIONÁ-LA COM AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-LABORATORIAIS DA DOENÇA DE WILSON)
- c) Caso você participe da pesquisa, será necessário fazer UMA COLETA DE SANGUE (QUANTIDADE DE 15 MILILITROS).
- d) Você poderá experimentar alguns desconfortos no local de coleta da amostra (dor, prurido, edema), diretamente relacionados À COLETA DE SANGUE.
- e) Os riscos que envolvem o seu tratamento são: NÃO EXISTEM RISCOS, POIS NÃO SERÁ SUBMETIDO A NENHUM TIPO DE TRATAMENTO.
- f) Para tanto você deverá comparecer no HOSPITAL DE CLÍNICAS (ambulatórios de Hepatologia e Neurologia) para consultas médicas de acompanhamento, sendo que será coletada a amostra de sangue para o estudo por ocasião da consulta médica.
- g) Contudo os benefícios esperados são: CORRELACIONAR A EVOLUÇÃO DA DOENÇA COM O TIPO DE MUTAÇÃO APRESENTADA.
- j) Estão garantidas todas as informações que você queira, antes, durante e depois do estudo.
- l) Neste estudo NÃO será utilizado um grupo controle ou placebo.
- m) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar do estudo, ou se aceitar a participar, retirar seu consentimento a qualquer momento. Este fato não implicará na interrupção de seu atendimento, que está assegurado.
- n) As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer

informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.

o) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames) NÃO são da responsabilidade do paciente.

p) Pela sua participação no estudo, você **NÃO RECEBERÁ QUALQUER VALOR EM DINHEIRO**. Você terá a garantia de que qualquer problema decorrente do estudo será tratado no próprio H.C.

q) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá meu nome, e sim um código.

Eu, _____

_____li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento com o meu médico.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Paciente

Pesquisador
Dr. Ricardo Schmitt de Bem

Local/Data

Local/Data

Telefones: 3360-7841 / 9963-6019

APÊNDICE 4

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – **MENOR DE IDADE (18 ANOS)**

- a) Você é o **responsável legal por um paciente (indivíduo do estudo)** que tem um tipo de doença denominado de: **DOENÇA DE WILSON** o qual está sendo convidado a participar de um estudo intitulado **Avaliação Genética de Pacientes com Doença de Wilson e seus Familiares**. É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços na medicina, e sua participação é de fundamental importância.
- b) O objetivo desta pesquisa é **TRAÇAR O PERFIL GENO E FENOTÍPICO (INVESTIGAR A MUTAÇÃO GENÉTICA E CORRELACIONÁ-LA COM AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-LABORATORIAIS DA DOENÇA DE WILSON)**
- c) Caso seu parente (filho/filha – **indivíduo do estudo**) menor de 18 anos participe da pesquisa, será necessário fazer **UMA COLETA DE SANGUE (QUANTIDADE DE 15 MILILITROS)**.
- d) O **indivíduo do estudo** poderá experimentar alguns desconfortos no local de coleta da amostra (dor, prurido, edema), diretamente relacionados À **COLETA DE SANGUE**.
- e) Os riscos que envolvem o seu tratamento são: **NÃO EXISTEM RISCOS, POIS NÃO SERÁ SUBMETIDO A NENHUM TIPO DE TRATAMENTO**.
- f) Para tanto o **indivíduo do estudo** deverá comparecer no **HOSPITAL DE CLÍNICAS** (ambulatórios de Hepatologia e Neurologia) para consultas médicas de acompanhamento, sendo que será coletada a amostra de sangue para o estudo por ocasião da consulta médica.
- g) Contudo os benefícios esperados são: **CORRELACIONAR A EVOLUÇÃO DA DOENÇA COM O TIPO DE MUTAÇÃO APRESENTADA**.
- j) Estão garantidas todas as informações que **indivíduo do estudo e seu responsável legal** queiram, antes, durante e depois do estudo.
- l) Neste estudo **NÃO** será utilizado um grupo controle ou placebo.
- m) A participação **indivíduo do estudo** é voluntária. O **indivíduo do estudo e seu responsável legal** têm a liberdade de recusar participar do estudo, ou se aceitarem a

participar, retirarem seu consentimento a qualquer momento. Este fato não implicará na interrupção de atendimento, que está assegurado.

n) As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.

o) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames) NÃO são da responsabilidade do **indivíduo do estudo ou de seu responsável legal**.

p) Pela sua participação no estudo, **indivíduo do estudo e seu responsável legal NÃO RECEBERÃO QUALQUER VALOR EM DINHEIRO** e terão a garantia de que qualquer problema decorrente do estudo será tratado no próprio H.C.

q) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá nenhum nome, e sim um código.

Eu, _____, **responsável legal** pelo paciente _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo a que ele foi convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper a participação de meu dependente no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete o tratamento que está sendo realizado com o médico.

Eu concordo voluntariamente que meu dependente participe deste estudo.

Responsável Legal

Pesquisador

Dr. Ricardo Schmitt de Bem

Local/Data

Local/Data

Telefones: 3360-7841 / 9963-6019

APÊNDICE 5**INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS****DOENÇA DE WILSON**

Caso Nº.: _____

Data: _____

Nome: _____ Registro: _____

Idade: _____ Data de Nascimento : _____

Local de Nascimento: _____ Cidade de Origem: _____

Escolaridade: _____ Profissão: _____

Estado Civil: _____ Prole: _____

Telefone para contato: _____

Endereço: _____ CEP: _____

Raça: () Branca () Negra () Amarela () Parda () Indígena

Origem étnica / familiar: _____

Período e fluxo migratório familiar: _____

- **ACHADOS FÍSICOS**

EXAMES COMPLEMENTARES

HMG/plaq.: VG: _____ BD: _____ TP: _____
 Hb: _____ BI: _____ Alb.: _____
 Leuc.: _____ BT: _____
 Plaq.: _____ ALT (TGP): _____
 AST (TGO): _____
 FA: _____
 γ GT _____

Ca⁺⁺ urinário: _____ Ultrassom de Abdome: () normal () alterado
 Ác. Úrico: _____ TAC de crânio: () normal () alterado
 Creatinina: _____ RNM de crânio: () normal () alterado

() Anti HAV total
 () Anti HBC () Anti HBC confirmatório
 () HBsAg
 () HBeAg
 () Anti HBe
 () Anti HBs

() Anti HCV
 () Alfa 1 antitripsina
 () ANA
 () AMA
 () SMA
 () LKM

Ceruloplasmina: _____ Cu sérico total: _____ Cu urinário: _____
 Diagnóstico genético: _____

TRATAMENTO

() D-penicilamina - Cuprimine® _____
 () Acetato de Zinco _____

APÊNDICE 6



FACULDADE DE MEDICINA
da Universidade de São Paulo

Disciplina de Gastroenterologia Clínica

São Paulo, 11 de Dezembro de 2006.

Ao Hospital das Clínicas
Da Universidade Federal do PR
a/C Dr. Ricardo De Bem

Ref: Termo de Concordância de Cooperação em Projeto de Pesquisa

Atualmente conduzimos o projeto de pesquisa intitulado “DOENÇA DE WILSON: ASPECTOS DEMOGRÁFICOS E FENOTÍPICOS RELACIONADOS AO GENÓTIPO *ATP7B*”, com o apoio financeiro da Fundação para o Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Buscamos firmar um núcleo laboratorial no Brasil, considerando que existe aqui uma casuística expressiva a ser estudada. Visamos também congrega a experiência dos diversos centros nacionais que atendem pacientes com esse mesmo diagnóstico, e melhor compreender as associações entre fenótipo e genótipo na doença de Wilson. Trata-se da continuidade de nossa linha de pesquisa em hepatopatias metabólicas, derivado do projeto “Doença de Wilson: pesquisa das mutações do gene *ATP7B* e correlação fenotípica em pacientes brasileiros”, executado entre 2002 e 2004, envolvendo portadores brasileiros desta doença e um laboratório de biologia molecular em Berlim, Alemanha.

Sendo o Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná um núcleo de assistência a portadores desta doença, estabelecemos acordo de mútua cooperação. Caberá a nós realizar a genotipagem *ATP7B* utilizando a estrutura de nosso laboratório de biologia molecular. Em contrapartida, teremos acesso aos dados dos pacientes, resguardados os aspectos éticos, que nos permitam realizar correlações de fenótipo e genótipo. Os resultados desta pesquisa deverão ser gerar pelo menos uma publicação científica em revista internacional, constando a co-autoria dos pesquisadores envolvidos de ambas as instituições, HC-FMUSP e HC-UFPR, além da menção do apoio financeiro da FAPESP 06/00449-1.

Atenciosamente,

Dra. Marta Mitiko Deguti
Doutor em Ciências pela FMUSP
Laboratório de Gastroenterologia e
Hepatologia Tropical (IMT II)
Grupo de Hepatopatias Metabólicas

APÊNDICE 7



FACULDADE DE MEDICINA
da Universidade de São Paulo

Disciplina de Gastroenterologia Clínica

São Paulo, 18 de Dezembro de 2006.

Ao Hospital das Clínicas
Da Universidade Federal do PR
a/C Dr. Ricardo De Bem

Ref: Termo de Concordância de Recebimento de Material Biológico

Conforme acordo estabelecido de mútua colaboração no projeto intitulado "Doença de Wilson: aspectos demográficos e fenotípicos relacionados ao genótipo *ATP7B*", colocamo-nos à disposição para recebimento do material biológico (sangue total ou DNA extraído), desde que cumpridas todas as condições orientadas pelas comissões de ética de ambas as instituições, HC-FMUSP e HC-UFPR.

O material deverá ser enviado ao endereço abaixo especificado. Estão habilitadas a receber o material as biologistas Maria Cristina Nakhle, Clarice Pires Abrantes Lemos e Alessandra Stilhano do Nascimento.

Dra. Marta Mitiko Deguti
Doutor em Ciências pela FMUSP

Endereço:

Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical - Instituto de Medicina Tropical II - Av Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 500, 2.andar - Cerqueira César, São Paulo, SP - CEP 054053-000
Tel: 11-3061-7065 11-3061-7067 Fax:11-3064-5132

APENDICE 8



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

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

APÊNDICE 9

GLOSSÁRIO DE TERMOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

alelo: forma alternativa de um *locus* genético; um simples alelo para cada *locus* é herdado de cada genitor.

cDNA: DNA complementar, um fragmento de DNA copiado de um RNAm.

chaperona: proteína que auxilia o enovelamento de outras proteínas, evitando vias incorretas que produziriam estados inativos ou agregados.

cycle sequencing: método de seqüenciamento que utiliza uma polimerase termoestável para o DNA, o que permite a amplificação do segmento a ser analisado por ciclos de temperatura a partir de uma quantidade reduzida de *template*.

dNTP: trifosfato de deoxirribonucleosídeos, refere-se aos nucleotídeos adenina (A), guanina (G), timidina (T) e citosina (C).

éxon: porções da seqüência do DNA genômico que serão representadas no RNA mensageiro maduro. Pode também ser usado em referência aos segmentos equivalentes no RNA final.

frameshift: tipo de mutação derivada de deleções ou inserções que não são múltiplas de três pares de base; elas alteram as tríades de nucleotídeos; conseqüentemente, a seqüência de aminoácidos que são traduzidas a proteína altera-se do ponto da mutação até a terminação carboxila.

íntron: porções do DNA genômico que são transcritas, mas depois, deixam de ser expressas por fenômeno de *splice*. Não ocorrem, portanto, no RNAm maduro.

locus : a posição de um gene em um cromossomo. Alelos diferentes do mesmo gene ocupam o mesmo *locus*. (Do latim *locus*. lugar.)

mutação: qualquer alteração permanente e herdável na seqüência de DNA. Os tipos de mutações incluem: mutações pontuais, deleções, inserções, alterações no número e na estrutura dos cromossomos.

PCR (*polymerase chain reaction*): Uma técnica de replicação de um fragmento específico de DNA *in-vitro*, mesmo na presença de um excedente de DNA não específico. Na presença de *primers*, dNTP e *Taq* polimerase, por ciclos de temperatura, a seqüência-alvo é repetidamente desnaturada e copiada. Quando a PCR é usada para amplificar uma seqüência de RNA, realiza-se inicialmente a conversão para DNA via transcriptase reversa, e este procedimento é denominado RT-PCR.

pb (par de base): Dois nucleotídeos numa molécula de RNA ou DNA que estão emparelhados por pontes de hidrogênio - por exemplo, G com C e A com T ou U.

polimorfismo: diferença na seqüência do DNA entre indivíduos saudáveis. Variações genéticas que ocorrem em mais de 1% de uma população podem ser consideradas polimorfismos úteis para a análise de ligação gênica.

primer: um oligonucleotídeo curto usado para iniciar a síntese de DNA, através do pareamento com uma fita de DNA. O *primer* possui uma terminação 3' OH livre, onde se inicia a síntese da cadeia de deoxirribonucleotídeo pela DNA polimerase. O primer *forward (F)* se estende na direção 5' do gene; o *reverse (R)*, na direção 3'.

splicing : Processo pelo qual seqüências de íntrons são removidas (por excisão) de moléculas de RNA, no núcleo, durante a formação do RNA mensageiro.

stop codon: qualquer das três seqüências de RNAm (UGA, UAG, UAA) que não codificam nenhum aminoácido e, portanto, sinalizam o fim da síntese proteica.

região promotora: seqüência que flanqueia o gene, correspondendo aos 100 primeiros nucleotídeos do DNA no lado 5'. Embora não seja transcrita a RNA, exerce papel fundamental para que o gene seja funcional.

Taq polimerase: polimerase para DNA isolada da bactéria *Thermophilis aquaticus*, muito estável em temperaturas elevadas.

template: uma seqüência de nucleotídeos da qual pode-se produzir uma segunda estrutura complementar à primeira.

APÊNDICE 10

APOIO CIENTÍFICO E FINANCEIRO

**FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Projeto 2006/00449-1**

**Genetika – Centro de Aconselhamento e Laboratório de Genética – Curitiba –
PR – Brasil**

**Serviço de Gastroenterologia – Departamento de Clínica Médica – Hospital de
Clínicas – Universidade Federal do Paraná**

**Serviço de Neurologia – Departamento de Clínica Médica – Hospital de Clínicas
– Universidade Federal do Paraná**