

KARINA LUCIO DE MEDEIROS BASTOS

**Detecção de deficiência de lipase ácida nos pacientes
submetidos a transplante hepático**

São Paulo

2023

KARINA LUCIO DE MEDEIROS BASTOS

**Detecção de deficiência de lipase ácida nos pacientes
submetidos a transplante hepático**

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

Programa de Pediatria

Orientador: Profa. Dra. Chong Ae Kim

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bastos, Karina Lucio de Medeiros
Detecção de deficiência de lipase ácida nos
pacientes submetidos a transplante hepático /
Karina Lucio de Medeiros Bastos. -- São Paulo, 2023.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.
Orientadora: Chong Ae Kim.

Descritores: 1.Deficiência de lipase ácida
2.Teste do gene LIPA 3.Transplante de fígado
4.Aconselhamento genético

USP/FM/DBD-487/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

HOMENAGEM

Aos pacientes, grandes guerreiros, que viabilizaram a realização deste Projeto de Pesquisa. A vocês, meu muito obrigada e meus votos de muita saúde e felicidades.

Aos pais dos pacientes, que permitiram a coleta dos dados e colaboraram irrestritamente com a realização do Projeto de Pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, Criador do Universo, porque sem Ele nada seria possível. Agradeço pela vida que Ele me concedeu; pelos dons que Ele me deu, que servem para ajudar àqueles que precisam de cuidados de saúde. Sua luz sempre me guia pelo caminho certo, de acordo com Seus preceitos; Sua força me ajuda a ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da vida e durante a realização deste trabalho, e me mantém com saúde para chegar até o final.

Gratidão eterna à minha família, pelo apoio que sempre me forneceram durante toda a minha trajetória de vida, e por servirem de alicerce para as minhas realizações.

Aos meus pais, que tanto amo, por terem investido na minha educação e nunca terem medido esforços para me proporcionar um ensino de qualidade durante todo o meu período escolar. À minha amada mãe, por sempre ter me incentivado e acreditado no meu potencial; por ter abdicado de suas próprias conquistas para proporcionar as minhas; por ser quem viabilizou tudo de bom que já conquistei ao longo da vida; por ser meu exemplo de mulher: corajosa, batalhadora, humana e caridosa; ao meu amado pai, por ser meu eterno protetor e amigo.

Às minhas amadas irmãs, que são parte da minha existência, da minha alma e do meu coração; obrigada por sempre estarem ao meu lado, me apoiando emocionalmente e torcendo por mim, mesmo que distantes fisicamente...

Aos homens da minha vida: meu marido e meus filhos. Meu amado marido Fernando, que sempre me incentiva a seguir em busca dos meus sonhos; acredita em meu potencial como profissional e ser humano; compartilha comigo os sentimentos de humanidade e altruísmo inerentes e necessários à minha profissão; e segue ao meu lado, sendo meu cúmplice e vivenciando as ricas experiências de alegrias e tristezas que a vida nos impõe. Meus amados filhos Lucas e Felipe, que me mostraram o verdadeiro sentido da palavra AMOR, tornam meus dias mais felizes, dão sentido à minha existência, me ensinam a amar incondicionalmente, e me ajudam, a cada dia, a tornar-me uma médica melhor, por projeta-los em cada paciente e, desta forma, ampliar o cuidado e a atenção a estes.

A minha querida orientadora, Prof. Dra Chong, por ter aceitado conduzir meu Projeto de Pesquisa; por seus conselhos e toda dedicação, ajuda e paciência com as quais guiou meu aprendizado; por ter estado ao meu lado, auxiliando-me, amparando-me e incentivando-me durante o processo de finalização da Tese; por ter se mostrado tão humana, amiga e parceira ao longo da minha trajetória acadêmica; pela confiança, apoio e ensinamentos, tanto a nível profissional como pessoal; por ter compartilhado comigo seus vastos conhecimentos na área de Genética Médica , que fizeram grande diferença na elaboração e finalização desta Tese.

Aos estimados colegas da Unidade de Genética : Bruno de Oliveira Stephan, Bianca Linnenkamp, Larissa Athayde Costa e Rachel Sayuri Honjo Kawahira foram fundamentais na elaboração da Tese.

Ao estimado Prof. Dr. Uenis Tannuri, grande Mestre, alvo de extensa admiração e grande respeito de minha parte. Deixo registrado, neste momento, toda a gratidão por ter compartilhado comigo sua vasta experiência na área de Transplante Hepático, por ter-me dado a honra de lhe acompanhar no cuidado aos pacientes transplantados; por ter-me permitido acessar os dados dos pacientes transplantados para a realização deste Projeto, e por ter-me fornecido, ao longo da minha trajetória de trabalho na USP, grande aprendizado, como médica e como ser humano; apoio ao meu trabalho e à minha pessoa, e, enfim, sua amizade. Suas valiosas contribuições para a Universidade e para a vida dos pacientes que receberam seus cuidados nunca serão esquecidas.

A toda a Equipe de Transplante Hepático do Serviço de Cirurgia Pediátrica do ICr-HC-FMUSP, especialmente aos médicos: Prof. Dra. Ana Cristina Aoun Tannuri , Dr. Nelson Elias Gibelli , Dr. Wagner de Castro Andrade ,Dr. Ali Ayoub , Dr. Fábio de Barros , Dr. Luiz Roberto Ricardi , Dra. Ana Caroline Dantas Marques , Dr. Manoel Carlos Velhote, Dra. Maria Mercês dos Santos , Dr. Marcos Marques da Silva , Dr. Guilherme Paganoti, pela inspiração, apoio e aprendizado; pela oportunidade do convívio e pela cooperação mútua durante estes vários anos; vocês são exemplos de grandes profissionais, pela extrema competência e dedicação; e grandes seres humanos, pelo altruísmo e comprometimento com os pacientes.

A Helena Miyatani, enfermeira coordenadora da Equipe de Transplante Hepático do Serviço de Cirurgia Pediátrica do ICr-HC-FMUSP, pela ajuda irrestrita e extrema eficiência; ao enfermeiro Paulo, por toda sua disponibilidade.

A Rosangela Fernandes de Souza e Mariza Kazue Umetsu Yoshikawa que ajudaram na formatação e revisão das referências para Tese.

A Universidade de São Paulo, todo seu corpo docente e todos seus funcionários, pelo apoio técnico prestado durante todo o desenvolvimento do projeto, pelo fornecimento de dados e materiais que foram fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa que possibilitou a realização desta Tese.

A todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste Projeto, e participaram, direta ou indiretamente, do seu desenvolvimento, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

Às pessoas com quem convivi ao longo destes anos em que o Projeto foi desenvolvido, que me incentivaram, me inspiraram, e que certamente tiveram impacto na minha formação profissional e pessoal.

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

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo. Divisão de Biblioteca e Documentação: 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. JUSTIFICATIVA.....	23
3. OBJETIVOS.....	25
4. MÉTODOS.....	27
5. RESULTADOS.....	30
6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÕES.....	43
8. REFERÊNCIAS.....	45

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCA1=	ATP-binding cassette transporter A1
ABraOM=	Arquivo Brasileiro On-line de Mutações
ALT=	Alanina aminotransferase
ApoA1=	Apolipoproteína A1
ApoB=	Apolipoproteína B
AST=	Aspartato aminotransferase
CAPPesq=	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CESD=	Choleteryl Ester Storage Disease
DAEC=	Doença de armazenamento de éster de colesterol
DBS=	Amostras de sangue fixadas em papel filtro
DHGNA=	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DLA=	Deficiência de lipase ácida
DLAL=	Deficiência de lipase ácida lisossomal
DW=	Doença de Wolman
EC=	Ésteres de colesterol
EDA=	Endoscopia digestiva alta
EUA=	Estados Unidos da América
FDA=	Federal Drug Administration
gnomAD=	The Genome Aggregation Database
HDL=	Lipoproteína de alta densidade
HDL-C=	Níveis elevados de colesterol lipoproteico de alta densidade
HMG-CoA=	hidroximetilglutaril-coenzima A
IC-HCFMUSP	Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
ICR- HCFMUSP=	Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LAL=	Lipase ácida lisossomal

LAMP1=	Proteína lisossômica luminal e membranosa 1
LAMP2=	Proteína de membrana lisossomal integral 2
LDL=	Lipoproteína de partículas de baixa densidade
MELD=	Modelo para doença hepática crônica em estágio final
NASH=	Esteatose hepática não alcoólica
NPC1L1=	Niemann-Pick C1-like 1
PBE=	Peritonite bacteriana espontânea
RM=	Ressonância magnética
SNC=	Sistema nervoso central
SREBPs=	Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol
TC=	Tomografia computadorizada
TCLE=	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TCTH=	Tratamento com transplante de células-tronco hematopoiéticas
TER=	Terapia de reposição enzimática
TG=	Triglicerídeos
VLDL=	Lipoproteína de densidade muito baixa
VLDL-C=	Lipoproteína de densidade muito baixa colesterol
α -HDL=	Partículas de redução da formação de HDL madura

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- A- O explante hepático de 2010 revelou fibrose avançada em fase cirrótica micronodular (H&E, 25X). B- Grande número de macrófagos espumosos e levemente pigmentados eram visualizados em espaços-porta (H&E, 200X). C- Havia áreas com esteatose microvesicular e mediovesicular no fígado, além de agregados de volumosas células de Kupffer xantomatosas (H&E, 200X), as quais exibiam raras fendas finas (setas). D- Ductopenia em trato portal devido à rejeição crônica na biópsia de 2015 (H&E, 200X), sem evidência de recidiva da doença de base. E- Componente de rejeição aguda com inflamação portal linfomononuclear leve (H&E, 100X) na mesma biópsia. F- Alterações epiteliais degenerativas em ducto biliar (H&E, 200X)..... 35
- Figura 2- A- Amostra de mucosa duodenal realizada em 2016 exhibia lâmina própria preenchida por células volumosas e perda parcial de glândulas (H&E, 50X). B- Abundante número de macrófagos xantomatosos distribuídos difusamente no córion da mucosa duodenal (H&E, 200X). C- Aspecto espumoso e microvacúolos no citoplasma dos numerosos macrófagos duodenais, por vezes com núcleos picnóticos (H&E, 400X). D- Na panorâmica da biópsia hepática realizada em 2017, visualiza-se fibrose portal em fase de transformação nodular (Picrossírius Vermelho, 10x). E- Havia múltiplos macrófagos portais espumosos (H&E, 400X) sugerindo provável recidiva da doença de base no enxerto, além de sinais de rejeição crônica e outras alterações. F- Escassas células de Kupffer xantomatosas foram identificadas em sinusoides (H&E, 500X)..... 36

RESUMO

Bastos KLM. Detecção de deficiência de lipase ácida nos pacientes submetidos a transplante hepático [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Introdução: O espectro clínico de Deficiência de Lipase Ácida Lisossomal (DLAL) varia de forma infantil grave de início precoce (doença de Wolman) a forma tardia conhecida como Doença de Armazenamento de Éster de Colesterol (DAEC), ambos de herança autossômica recessiva. Esta doença é muito rara e subdiagnosticada e poucas famílias brasileiras foram relatadas com variantes do gene *LIPA*. **Objetivo:** Descrever aspectos de quadro clínico, laboratorial e molecular de pacientes com DLAL nos pacientes que foram submetidos a transplante hepático ou que estão em lista de espera para transplante hepático no Instituto da Criança – HCFMUSP. **Métodos:** Desde Jan/ 2015 a Julho/ 2019, 54 dos 224 pacientes foram submetidos a transplante hepático de etiologia desconhecida, outros 19 pacientes da lista de espera a transplante foram testados para dosagem enzimática de LAL e análise do gene *LIPA* pelo sequenciamento de Sanger (total de 73 pacientes). **Resultado:** Apenas um paciente foi diagnosticado com DLAL. Ele apresentou desde 4 meses de idade sintomas de diarreia recorrente e evoluiu com déficit de crescimento, hepatomegalia e dislipidemia. O diagnóstico de Niemann-Pick tipo B foi estabelecido baseado em baixa dosagem de esfingomielinase e achados patológicos da biópsia hepática. Aos 13 anos, ele apresentou falência hepática com ascite, peritonite e esplenomegalia. Foi submetido ao transplante hepático aos 18 anos e apresentou vários episódios de rejeição hepática. Finalmente em 2017, aos 26 anos, o diagnóstico de DLAL foi estabelecido. Enzima de LAL estava ausente e teste do gene *LIPA* mostrou variante c.266T>C em homozigose. O tratamento com Sebelipase alfa foi iniciado mas infelizmente o paciente faleceu aos 27 anos, no pós-operatório de 2º transplante hepático. **Conclusão:** O diagnóstico de DLAL é ainda tardio e esta doença rara deve ser incluída nos diagnósticos diferenciais na investigação de pacientes com hepatomegalia, enzimas hepáticas aumentadas e dislipidemia.

A dosagem baixa ou ausente da atividade de enzima LAL e sequenciamento do gene *LIPA* são essenciais para confirmação diagnóstica e aconselhamento genético adequado. O diagnóstico precoce e tratamento com Sebelipase alfa podem melhorar o prognóstico de pacientes afetados.

Palavras-chave: Deficiência de lipase ácida. Teste do gene *LIPA*. Transplante de fígado. Aconselhamento genético.

ABSTRACT

Bastos KLM. *Detection of lysosomal acid lipase deficiency in patients submitted to liver transplant [thesis]*. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

Introduction: The clinical spectrum of Lysosomal Acid Lipase Deficiency (LALD) varies from severe infantile-onset form (Wolman disease) to late-onset form known as cholesteroester storage disease (CESD), both autosomal recessive inheritance disorders. This condition is very rare and underdiagnosed so only few families in Brazil carrying *LIPA* variants have been reported to date.

Objective: To describe the clinical, laboratory and molecular aspects of LALD patients among those who had a liver transplant or were on a waiting list for a liver transplant from unknown etiology at Instituto da Criança – HCFMUSP - Brazil. **Method:** Since Jan/2015 to July/2019, 54 out of 224 patients who were submitted to liver transplant due to hepatic failure of unknown etiology, and other 19 patients from the waiting list were tested to enzyme assay of LAL dosage and *LIPA* gene analysis by Sanger sequencing (total of 73 patients).

Results: Only one male patient was diagnosed with LALD. Since 4 months old he presented symptom of recurrent diarrhea and evolved with failure to thrive, hepatomegaly and dyslipidemia. He was misdiagnosed with Niemann-Pick type B, based in enzymatic testing and pathological findings. At 13 years old, he presented liver failure with ascites, peritonitis and splenomegaly. He was submitted to liver transplant at 18 years old and presented several rejection episodes. Finally in 2017, at 26 years, he was diagnosed with LALD. LAL enzyme was absent and *LIPA* gene testing showed homozygous variant c.266T>C. Treatment with Sebelipase alfa was adopted, but unfortunately the patient died at 27 years old from acute post-operative complications after a second liver transplant. **Conclusion:** LALD diagnosis is still late, so this rare condition should be included in the differential diagnoses when investigating patients with hepatomegaly, elevated liver enzymes and dyslipidemia. Low level or absence of LAL activity and *LIPA* gene sequencing are essential for the confirmation of the diagnosis and allow proper genetic counseling. The

precocious diagnosis and treatment with Sebelipase alfa may improve the prognosis of affected patients.

Keywords: Acid lipase deficiency. *LIPA* gene testing. Liver transplantation. Genetic counseling.

1. INTRODUÇÃO

Conceitos- Deficiência de Lipase Ácida Lisossomal

As doenças de depósito lisossomal são um grupo de aproximadamente 50 distúrbios que resultam de mutações que geram defeitos em enzimas ou proteínas lisossomais¹⁻³. Estes defeitos se expressam como redução da atividade enzimática de uma hidrolase lisossomal específica, causando a interrupção de uma via catabólica; o bloqueio desta via metabólica leva ao acúmulo de um tipo particular de material não degradado, cujo acúmulo dentro dos lisossomos leva à disfunção celular em vários órgãos⁴⁻⁹.

A deficiência de lipase ácida lisossomal (DLAL) é um tipo de Doença de Depósito Lisossomal. Considerada ultrarrara, tem caráter autossômico recessivo e é progressiva⁴⁻⁸, sendo causada por mutações no gene *LIPA* (HGNC 6617; MIM# 613497), que codifica a enzima lipase ácida lisossomal (LAL), responsável por hidrolisar os ésteres de colesterol (EC) e triglicerídeos (TG) em colesterol livre e ácidos graxos livres, dentro da lipoproteína de partículas de baixa densidade (LDL)^{4,9-11}.

O gene *LIPA* está localizado no braço longo do cromossomo 10, nos locus 10q23.31. É composto por 10 éxons¹² e codifica uma proteína de 399 aminoácidos, conhecida como lipase ácida lisossomal A (LAL). A expressão desta proteína ocorre em diversos tecidos e o RNA pode ser detectado principalmente em macrófagos e células de Hofbauer^{6, 10,13,15}.

Mutações no gene *LIPA* resultam em perda de função da proteína LAL, gerando distúrbios genéticos raros com acúmulo maciço de ECs e TGs nos lisossomos do fígado, baço, glândulas adrenais, medula óssea, linfonodos, trato gastrointestinal e células do sistema macrófago-monócito em todo o corpo^{10,17,18}, causando danos subsequentes a estas células, tecidos e órgãos e

interferindo com a função básica destes^{6,14,17-22}. A LAL atua com uma enzima que desempenha um papel fundamental no metabolismo do colesterol²⁰.

A DLAL é uma doença autossômica recessiva e os indivíduos afetados podem apresentar homocigotos ou heterocigotos compostos de variantes patogênicas¹⁴. A presença de uma cópia intacta é suficiente para manter as funções fisiológicas³⁴⁻³⁶. Ainda não está estabelecido se os portadores heterocigotos de variantes patogênicas de *LIPA* apresentam risco aumentado de doença hepática progressiva em combinação com outros insultos ao parênquima hepático, nem se o fato do indivíduo ser heterocigoto influencia o seu perfil lipídico^{12,37,38}. Mutações no gene *LIPA* manifestam um espectro de doença hepática e dislipidemia, cuja apresentação e gravidade variam de acordo com a quantidade de atividade residual da enzima^{13,14}.

Epidemiologia

A prevalência da DLAL em diferentes populações é provavelmente desconhecida devido ao subdiagnóstico, mas acredita-se variar entre 1/40.000 a 1/300.000 indivíduos adultos e crianças, dependendo da localização geográfica e origem étnica¹²⁻¹⁹.

O estudo da prevalência de CESD em diferentes populações de afro-americanos, asiáticos, caucasianos, hispânicos e judeus Askenazi na cidade Metropolitana de Nova York e também de Dallas, a prevalência estimada em caucasianos e hispânicos foi de ~0,8 por 100.000³⁶.

A prevalência de nascimento de 0,27 por 100.000 (~1 em 370.000) foi estimado para a República Tcheca³⁹ para ambas as formas de deficiência de LAL.

Em contraste, a prevalência de DLAL nos dois grupos de pacientes na Alemanha foi estimada em 2,5 em 100.000 (1 em 40.000)³⁰.

Scott e colaboradores⁴⁰, relataram uma prevalência estimada de DLAL nestes grupos de aproximadamente 1,2 por 100.000 nas populações caucasianas, e de aproximadamente 0,8 por 100.000 nas populações combinadas de caucasianos e hispânicos nos Estados Unidos da América (EUA).

Muntoni et al. (2007)³⁰ e Scott et al. (2013)⁴⁰ estudaram a frequência da mutação E8SJM (*Exon 8 Splice Junction Mutation*) na população e observaram que esta variante representava cerca de metade dos alelos causadores de DLAL em adultos e crianças.

Na Austrália a incidência encontrada foi de 1 em 700.000. Vázquez e colaboradores³⁶, propuseram que haveria de 750 a 1.500 pacientes com DLAL somente nos EUA, reforçando a hipótese de que a doença é subdiagnosticada e frequentemente passa despercebida³⁶. As frequências de alelos da mutação c.894G> A da região metropolitana de Nova York (envolvendo indivíduos multiétnicos não relacionados) variaram de 0,0005 a 0,0015, que se traduziu em frequências portadoras de 1 em 1000 a 1 em 333, respectivamente⁴⁰.

Estas estimativas estão em conflito aparente com o pequeno número de pacientes DLAL relatados na literatura, e isso provavelmente se deve a casos grosseiramente subdiagnosticados ou penetrância incompleta da doença⁴¹.

Um estudo multicêntrico estimou a prevalência de nascimentos de DLAL usando a caracterização funcional da variante LIPA e encontrou 3,45-5,97 por milhão na população europeia^{4,44}.

Carter et al¹³ descobriram, usando sequenciamento de nova geração, que a DLAL afeta 1 em 177.452 indivíduos, em toda a população global.

Não existem trabalhos que mensurem precisamente a incidência e prevalência da DLAL no Brasil.

Na forma de início precoce, a prevalência em bebês estimada é de 1 em 528.000^{4,43}.

A correlação entre a idade ao diagnóstico e a atividade LAL mostrou uma relação direta moderadamente significativa (Pearson's $r=0.46$, $P < 0.005$)⁴⁵.

Quando avaliamos a prevalência na população pediátrica, a idade média em que os primeiros sintomas foram relatados foi de 1,5 meses para pacientes de início precoce e 48 meses para CESD. A mediana de idade no momento do diagnóstico foi de três meses e 96 meses para DLAL e CESD de início infantil, respectivamente. A mediana da idade de morte foi de quatro meses para a Doença de Wolman (DW) de 162 meses para a CESD⁶.

Patogênese

O equilíbrio lipídico é intrinsecamente coordenado em vários níveis, incluindo absorção celular, síntese, armazenamento, metabolismo e exportação. Todas as classes de lipídios, incluindo ácidos graxos, esfingolipídios, esteróis e os fosfolipídios sofrem regulação dinâmica, cuja extensão depende do tipo de tecido específico e estado nutricional da célula⁴⁶.

O colesterol apresenta um papel essencial na regulação da estrutura e função da membrana celular^{47,48}. Ele modula a atividade das proteínas transmembranas e facilita a transdução de sinal e processos de tráfico intracelular. O colesterol é um componente de todas as membranas celulares e é o precursor do oxisterol, hormônio esteroide, ácido biliar e da síntese de vitamina D⁴⁹.

O colesterol e os triglicerídeos são os principais lipídeos em humanos; provenientes da dieta, são absorvidos no intestino pelos enterócitos intestinais, que expressam uma proteína de membrana de translocação de colesterol conhecida como Niemann – Pick C1-like 1 (NPC1L1) em suas membranas apicais^{50,51}. Os enterócitos empacotam os lipídios derivados da dieta em quilomícrons, que são transportados para o fígado⁵²; no plasma, este transporte se dá através das lipoproteínas. Uma lipoproteína é composta de colesterol, triglicerídeos e uma única molécula de apolipoproteína B₁₀₀ (apoB), quando secretada no plasma pelo fígado, é chamada de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL). Os triglicerídeos são rapidamente removidos pela enzima lipoproteína lipase e usados para consumo e armazenamento de energia. Como os triglicerídeos estão sendo progressivamente removidos, a lipoproteína é chamada de partícula remanescente de VLDL. Depois que a maioria dos triglicerídeos foi removida, a lipoproteína torna-se mais densa e é referida como uma LDL. No entanto, uma partícula VLDL, uma partícula remanescente e uma partícula LDL são apenas nomes diferentes para a mesma lipoproteína apoB circulante em diferentes estágios de seu ciclo de vida, dependendo do conteúdo lipídico que ela carrega⁵³. No fígado, os hepatócitos empacotam o colesterol, os fosfolipídios e os triglicerídeos em VLDLs⁵².

O fígado é responsável pela maior parte da biossíntese do colesterol e tem sido considerado o principal local de controle na manutenção da homeostase do colesterol, embora a capacidade de sintetizar o colesterol endógeno seja comum à maioria dos tipos de células^{47-48, 50-51}. O fígado facilita a depuração de partículas de lipoproteína de baixa densidade e remanescentes

de quilomícrons contendo colesterol, sintetiza colesterol, sintetiza e secreta partículas de lipoproteína de alta densidade, secreta colesterol e sais biliares para a bile e está envolvido no transporte reverso de colesterol⁴⁸. A homeostase equilibrada do colesterol é essencial para o crescimento celular e manutenção da capa fosfolipídica da célula. O fígado tem um papel importante no metabolismo lipídico, pois recebe colesterol exógeno do intestino e reduz as quantidades de LDL e remanescentes de VLDL^{47,52}. Os lipídeos complexos são hidrolisados por lipases dentro dos lisossomos, gerando ácidos graxos não esterificados, e este metabolismo lipídico envolve várias vias⁵³. Os ácidos graxos são as formas de energia armazenadas e circulantes mais comumente utilizadas, e triacilgliceróis são a forma não tóxica mais comum de ácidos graxos. Ácidos graxos e triacilgliceróis também podem ser usados de diferentes maneiras. Os triacilgliceróis podem se acumular nos hepatócitos ou serem exportados como constituintes de lipoproteínas de muito baixa densidade^{54, 55}.

Os lisossomos são organelas pequenas, caracterizadas por um interior ácido, que permite a atividade de até 60 enzimas hidrolíticas diferentes, incluindo proteases, lipases e nucleases. Possuem proteínas transmembranas, que são transportadores que medeiam a exportação de produtos da digestão lisossomal para o citoplasma^{56,57,58}. O lisossoma é o ponto final de numerosas vias de tráfego de vesículas, incluindo as endocíticas, fagocíticas e vias autofágicas. Sua capacidade de se fundir com endossomos, fagossomas e autofagossomos permite que o lisossoma decomponha uma ampla gama de cargas endógenas e exógenas, incluindo macromoléculas, certos patógenos e organelas velhas ou danificadas^{59,60-62}.

A convergência de várias vias metabólicas no lisossoma torna esta organela essencial na coordenação da classificação e distribuição de lipídios para vários compartimentos de membrana, e na reciclagem de lipídeos endógenos. Esteróis exógenos, triglicerídeos e fosfolipídios transportados por LDL entram na célula via endocitose mediada por receptor e são processadas pelo lisossoma⁴⁷. Os lisossomas desempenham um papel crítico na manutenção da homeostase celular global por digerir e reciclar lipídios e macromoléculas através do sistema endossomal-autofágico-lisossomal. Pela macroautofagia, microautofagia, fusão endossomo-lisossomal e autofagia mediada por chaperona, o lisossoma é responsável por lidar com a degradação de dezenas de substratos¹; a redução na atividade enzimática de uma hidrolase lisossomal específica, causando a interrupção de uma via catabólica, leva ao acúmulo de um tipo particular de material não degradado, cujo acúmulo dentro dos lisossomas leva à disfunção celular em vários órgãos⁴⁻⁹.

A LAL desempenha um papel fundamental no metabolismo lipídico através da hidrólise de ésteres de colesterol e triglicerídeos³¹. A ausência ou quantidades reduzidas de lipase ácida lisossomal diminuem o metabolismo de ésteres de colesterol e triglicerídeos, que se acumulam nos lisossomas, especialmente nos hepatócitos e células do sistema mononuclear fagocitário. Com a hidrólise prejudicada, ocorre redução da geração de colesterol livre e diminuição da inibição de feedback (e, portanto, aumento da expressão) de hidroximetil glutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase. HMG-CoA promove a biossíntese de colesterol, VLDL e ApoB, e regula negativamente a síntese de Lipoproteína de alta densidade (HDL), apolipoproteína A1 (ApoA1) e apolipoproteína A2 (ApoA2)⁶³⁻⁶⁴. A expressão dos receptores celulares de LDL

é regulada positivamente em pacientes com deficiência de lipase ácida lisossomal e os triglicerídeos plasmáticos estão frequentemente elevados⁶⁴. Os perfis lipídicos destes pacientes são frequentemente semelhantes aos de pacientes com hiperlipidemia familiar tipo 2a e 2b de Fredrickson¹⁸.

Colesterol livre e ácidos graxos e seus metabólitos estimulam fatores de transcrição (proteína de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBPs), que regulam a expressão de genes controlados na síntese e absorção de colesterol^{49,65}. O excesso de colesterol livre gera redução da entrada de colesterol na célula, à medida que SREBP-2 regula negativamente os receptores de LDL. A síntese de colesterol é diminuída como resultado da inibição por feedback de HMG-CoA redutase. Níveis reduzidos da atividade da LAL ou a ausência desta, estão associados com acúmulo de ésteres de colesterol e triglicerídeos dentro dos lisossomas. Além disso, a escassez de colesterol livre intracelular leva à regulação positiva mediada por SREBP de produção de colesterol endógeno por HMG-CoA redutase, endocitose aumentada via receptores de LDL, síntese aumentada de apolipoproteína B (ApoB) e lipoproteína de densidade muito baixa colesterol (VLDL-C)⁶⁶⁻⁶⁷. Os pacientes com DLAL apresentam perfil lipídico anormal (dislipidemia) caracterizado por colesterol total sérico elevado, altas quantidades de LDL, baixas quantidades de HDL e triglicerídeos elevados⁶⁸. A diminuição dos valores de níveis elevados de colesterol lipoproteico de alta densidade (HDL-C) pode ser explicada por uma redução na formação de lipoproteína de alta densidade madura (HDL), chamadas partículas α -HDL^{69,70, 71}.

Na DLAL, a retenção dos ésteres de colesterol nos lisossomas leva à redução da concentração do colesterol celular livre e, conseqüentemente, à

diminuiu na formação de oxisterol e, conseqüentemente, redução na ativação de *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1), bem como diminuição do colesterol livre nos compartimentos subcelulares e na membrana plasmática que está disponível para a formação da partícula de HDL^{70,71}.

Quadro Clínico

A DLAL mostra dois fenótipos diferentes, que se situam em um continuum clínico, dependendo da quantidade de enzima funcional produzida in vivo^{14, 17, 22}. No decorrer da infância, o curso da doença pode ser grave e associado a altas taxas de mortalidade devido à ausência completa ou redução substancial da atividade da enzima^{32,72-76}. Por outro lado, crianças mais velhas e adultos com mutações *LIPA* e níveis mais elevados da atividade residual da enzima LAL podem ter um curso mais suave da doença. Portanto, a doença em pacientes mais velhos pode facilmente passar despercebida ou ser diagnosticada erroneamente, porque as manifestações podem ser muito semelhantes a doenças mais comuns, como doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), síndrome metabólica e dislipidemias hereditárias^{17,76,77}. A extensão da deposição de ésteres de colesterol no tecido e triglicerídeos parece ser diretamente proporcional à gravidade da doença e inversamente proporcional à idade de apresentação¹⁸.

A Forma de Início Precoce

A DLAL Infantil ou de início precoce, referida como DW, é decorrente de mutações do gene *LIPA* que geram ausência completa ou quantidades mínimas (de 1-2%) da atividade normal da lipase ácida lisossomal^{5,6,14,17-22}.

Clinicamente apresenta-se como uma doença com curso rapidamente progressivo e fatal no primeiro ano de vida, caso não tratada; o óbito destas crianças ocorre principalmente dentro dos primeiros 3-6 meses de vida^{5-6,14,17-22}. A mediana de morte é de 3,7 meses^{5,15,78-79}. A doença surge já nas primeiras semanas de vida e a morte ocorre devido à falência de múltiplos órgãos^{15, 80}. Durante a gravidez já podem surgir sinais clínicos da doença, com presença de ascite fetal, polidrâmnio e necrose adrenal.^{15,18,81-82}. Infiltração adrenal lipídica levando a necrose na fase fetal, pode ser o precursor da calcificação adrenal descrita em cerca de 50% dos bebês nascidos com a doença^{9,44,75,83-88}.

Neste subtipo infantil fulminante ocorrem depósitos maciços de ésteres de colesterol e triglicérides no fígado, baço, glândulas suprarrenais, medula óssea, nódulos linfáticos, macrófagos. Mucosa intestinal, endotélio vascular e, músculo esquelético e macrófagos. Os bebês apresentam vômitos recorrentes, diarreia aquosa decorrente da infiltração de lipídeos no trato gastrointestinal e consequente espessamento das paredes do intestino, síndrome de má-absorção, esteatorreia, levando à caquexia, “*failure to thrive*”, dificuldade de ganho de peso, distensão abdominal, desnutrição, perda de gordura subcutânea e de músculo; quase todas as crianças apresentam hepatoesplenomegalia importante, e icterícia colestática e febre podem estar presentes; Estas crianças desenvolvem rapidamente fibrose hepática e cirrose, podendo cursar com falência hepática^{9,18,44,79,88-95}. Má absorção intestinal, juntamente com insuficiência hepática e insuficiência adrenal, explicam o prognóstico ruim desses pacientes^{79,77,83,90}.

O acúmulo de CEs e TGs foi observado no sistema nervoso central (SNC) em células como astrócitos e oligodendrócitos de pacientes com DW. Estes bebês apresentam declínio cognitivo após o início da doença, mas não se sabe se isso é devido ao acúmulo no SNC ou é uma consequência secundária da doença devido à má absorção. O acúmulo de TGs e CEs também pode ser encontrado nos neurônios do plexo mioentérico, causando dano neuronal grave, e pode contribuir para a patologia gastrointestinal encontrada em pacientes com DW; o comprometimento da mielinização de neurônios no cérebro possivelmente é consequência do comprometimento do metabolismo de CE e TG. Não está claro se a DW cursa com neurodegeneração pela perturbação das vias lisossomais normais^{81,96-99}.

Laboratorialmente observa-se níveis reduzidos de HDL e níveis aumentados de colesterol total, LDL, triglicérides, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), bilirrubina total (às custas de bilirrubina direta), hemograma apresentando anemia e trombocitopenia, aumento de ferritina, redução no valor da albumina sérica^{3,6,67}. Alguns pacientes apresentam aumento importante, rápido e progressivo nos valores das transaminases séricas ao longo do tempo, acompanhados por outros indicadores de lesão hepática progressiva e disfunção, incluindo concentrações elevadas de bilirrubina total, valores anormais de coagulação e concentrações reduzidas de albumina sérica. Esses achados sugerem doença hepática rapidamente progressiva com insuficiência hepatocelular⁷⁹.

Os exames de imagem mostram a presença de hepatomegalia e esplenomegalia volumosas; as glândulas suprarrenais podem estar

aumentadas de tamanho e apresentar calcificações, confirmadas através de radiografias abdominais ou exame histológico^{3,77,79,93,94,100-104}.

A Forma de Início Tardio

A doença de armazenamento de éster de colesterol (DAEC) é a forma da doença de início tardio, que pode se apresentar na primeira infância, infância ou idade adulta; é encontrada nos pacientes com mutações heterozigotas complexas, que levam a uma redução na atividade da LAL, que geralmente varia de 1% a 12% do normal^{6,9,10,15,22-31,89,105,106}. Geralmente a idade de início da doença e a gravidade da evolução clínica refletem a quantidade de atividade residual enzimática presente^{6,9,23-31}, podendo manifestar-se na infância ou na idade adulta como uma doença multiorgânica progressiva, apresentando manifestações clínicas muito variáveis e, portanto, apresentação clínica menos definida^{3,107,105}; frequentemente o diagnóstico é feito incidentalmente através de exames de rotina, que mostram alteração de transaminases, esteatose hepática ou dislipidemia^{105,106,108}.

A idade média de início dos sintomas é de 5 anos, podendo variar de início muito precoce, por volta dos 2 anos, até acima de 60 anos. Em crianças, a maioria (62%) apresenta idade de início dos sintomas entre 3 e 12 anos, e 11% apresenta início dos sintomas ou diagnóstico da doença durante a adolescência ou na fase adulta^{74,105,109,110-111}. Embora possa se apresentar na infância de maneira semelhante à DW, com apresentação clínica mais grave e envolvendo deficiência de crescimento e atraso nos marcos, êmese, distensão abdominal e até calcificações adrenais¹¹², também foi identificada em indivíduos com fenótipos atípicos, como enzimas hepáticas elevadas ou anormalidades lipídicas séricas identificadas na triagem de rotina¹¹³

e hipercolesterolemia autossômica recessiva aparente, sem mutação do gene esperado¹¹⁴.

A doença hepática está frequentemente presente. Alteração das enzimas hepáticas estão presentes em praticamente todos os casos^{89,105,106,115}. Hepatomegalia é encontrada em 99,3% dos casos, com ou sem esplenomegalia associada (74% dos casos), e a organomegalia é decorrente do acúmulo de ésteres de colesterol e triglicerídeos nos macrófagos¹⁰⁵, podendo estar presente por anos antes da definição diagnóstica^{28,116}. Existem relatos de casos em que não se observa organomegalia, apenas elevação de transaminases e patologia hepática¹¹⁷. Indivíduos com esplenomegalia podem desenvolver anemia e/ou trombocitopenia devido ao hiperesplenismo secundário¹¹⁵. A hepatopatia pode evoluir com alteração da função hepática, com ou sem icterícia associada, esteatose, fibrose ou cirrose, com evolução para hipertensão portal e presença de varizes esofágicas. A deposição progressiva de lipídeos leva à fibrose, cirrose micronodular e, por fim, insuficiência hepática^{115,118-119}, com necessidade de transplante hepático^{89,105}. A presença de carcinoma hepatocelular está relacionada à evolução para cirrose avançada^{115,120}.

A deposição de lipídios na parede do trato intestinal pode contribuir para diarreia, perda de peso, dor abdominal, dor epigástrica, disfunção da vesícula biliar e má absorção^{75,106,113}. Ocasionalmente, sinais de hiperlipidemia, como xantelasma, particularmente da área palpebral, podem ser visíveis^{28,121}.

Laboratorialmente, além das transaminases elevadas, os pacientes apresentam dislipidemia, com colesterol total, LDL e triglicerídeos elevados, e diminuição do HDL, caracterizando a dislipidemia do tipo IIb^{63,106,115,122}.

Bernstein et al⁹, relataram em um estudo de 135 casos de pacientes com DAEC, que mais de 95% dos pacientes apresentaram níveis de LDL acima da faixa normal, e destes, 79% apresentaram níveis de LDL acima de 200mg/L⁹; quanto aos valores de HDL, 71% tinham níveis entre 20 e 40mg/dL, 18% níveis abaixo de 20mg/dL e 11% níveis acima de 40mg/dL^{86,108,123-129}. A elevação das taxas de LDL geram uma aceleração do processo de aterosclerose fisiológico, gerando uma aterosclerose precoce; esta é responsável por parte da morbidade associada à DAEC, como doença arterial coronariana e cirurgias de revascularização do miocárdio e eventos vasculares, como acidente vascular cerebral e aneurismas^{18,39,63,105,107-108,115,119,130}.

Diagnóstico

DLAL deve ser suspeitada em casos com elevação de colesterol total e LDL, com diminuição leve a moderada de HDL, elevação de enzimas transaminases hepáticas e hepatomegalia, biópsia hepática com esteatose microvesicular e/ou cirrose micronodular¹⁵.

O diagnóstico é suspeitado através do quadro clínico, alteração nos exames laboratoriais e achados histológicos sugestivos da doença, porém é confirmado pela identificação de variantes patogênicas bialélicas em *LIPA* e/ou atividade enzimática da LAL deficiente em leucócitos do sangue periférico, fibroblastos ou manchas de sangue seco^{15,89,105-106,115,131}.

O ensaio da atividade da enzima LAL em leucócitos do sangue periférico é o teste diagnóstico confirmatório para a deficiência de LAL; no entanto, a atividade enzimática também pode ser medida por diagnóstico em hepatócitos, fibroblastos de pele ou manchas de sangue secas (Dried Blood Spot)¹⁵. Os

níveis de atividade enzimática residual são mais significativamente reduzidos na forma de início precoce ($\leq 1\%$ da atividade residual) em comparação com a forma de início tardio (entre 2% -11% da atividade residual) ^{9,15,41,89,106,115,131}.

As abordagens de teste molecular podem incluir teste de gene único, uso de um painel multigênico e teste genômico mais abrangente:

1- Teste de gene único - é realizada a análise de sequência do gene *LIPA* por Sanger. Caso apenas uma variante patogênica seja identificada, considerar a análise de exclusão ou duplicação direcionada ao gene;

2- Painel multigênico - este painel inclui o estudo de gene *LIPA* e de outros genes que precisem ser pesquisados para descartar possíveis doenças que fazem parte do diagnóstico diferencial;

3- Testes genômicos mais abrangentes - abrangem o sequenciamento do exoma, sequenciamento do genoma e sequenciamento mitocondrial; estes testes podem ser considerados se o teste de gene único ou do painel genético falhar em confirmar o diagnóstico em um indivíduo com características clínicas sugestivas de DLAL ^{9,15,41,89,106,115,131}. O diagnóstico pré-natal da atividade LAL também pode ser determinado de forma confiável testando vilosidades coriônicas em cultura ou fetais células⁴⁵.

A tomografia computadorizada (TC) pode ajudar a estabelecer o diagnóstico de hipertrofia adrenal, hepatoesplenomegalia e portal hipertensão arterial em pacientes com deficiência de lipase ácida lisossomal. O colesterol elevado pode correlacionar-se com densidade hepática na TC, mas esta observação é nem confiável nem exclusiva para pacientes com doença lisossômica deficiência. A ressonância magnética (RM) é um método bem reconhecido para medição do teor lipídico hepático. A ressonância magnética

pode ser usada como método não invasivo para monitorar pacientes que terapia de reposição enzimática para a desordem de armazenamento de éster de colesterol^{18,36,132}.

Os achados de biópsia hepática são clássicos e aparecem independentes da idade ou genótipo, com a apresentação de “fígado gorduroso”^{9,115}. Observa-se uma degeneração gordurosa difusa e proeminente dos hepatócitos, com presença de esteatose microvesicular (gotículas de gordura menores que o núcleo da célula) afetando a maioria das células do fígado. As células de Kupffer são fortemente distendidas pelo acúmulo de grandes quantidades de gordura, com progressão para fibrose e posteriormente cirrose micronodular^{9,88-89,118,133-134}. As células de Kupffer e os macrófagos portais apresentam acúmulo de ceroides, que são destacados por PAS após a coloração por diástase. A coloração de PAS mostra também glicogênio diminuído nos hepatócitos e presença de células de Kupffer “em balão”. Achados patognomônicos incluem demonstração de cristais de éster de colesterol birrefringente em hepatócitos e células de Kupffer em seções frescas de fígado congelado sob luz polarizada. A imunocoloração de CD68 destaca esses lipídios corados negativamente e cristais em forma de agulha dentro dos macrófagos. Em seções fixas embebidas em parafina, esses cristais são vistos como fendas remanescentes. No exame ultraestrutural, essas gotículas lipídicas lisossomais são, em sua maioria, circundadas por uma única membrana e podem ter uma aparência de comidas por traças devido à inclusão de colesterol dentro delas, que é novamente patognomônico^{9,106,115,118,135-137}. A microscopia eletrônica mostra gotículas lipídicas de vários tamanhos e números em hepatócitos, ricos em glicogênio nos lisossomos e

heterolisossomos, que criam um interior "espumoso" em lisossomos menores., além de gotículas lipídicas de diferentes tamanhos, principalmente com diâmetro inferior a 1 μm e uma área de borda semelhante a um halo, cujo interior é predominantemente não homogêneo^{76,105}.

O exame macroscópico do fígado mostra uma aparência difusamente amarelo-alaranjado e brilhante, devido ao acúmulo de lipídeos lisossomais^{106,115,136}.

As análises imunohistoquímicas adicionais com marcadores lisossomais para proteína lisossômica luminal e membranosa 1 (LAMP1), catepsina D, proteína de membrana lisossomal integral 2 (LAMP2)) confirmam o acúmulo de lipídeo lisossomal^{3,9,115}.

Biópsias hepáticas de bebês com DLAL de início precoce evidenciaram achados semelhantes às biópsias de pacientes com DAEC, com presença de fibrose, esteatose e vacúolos lipídicos. Macrófagos espumosos contendo lipídeos e ceroides já estavam presentes nos sinusoides e tratos portais de pacientes jovens. Em exames de autópsia realizados em bebês que faleceram pela doença, foi encontrado aumento do fígado e do baço, descoloração amarelo-laranja, infiltração/esteatose gordurosa, necrose, fibrose e cirrose nos órgãos avaliados, além de anormalidades adrenais, incluindo aumento das glândulas, áreas de necrose e presença de microcalcificações⁷⁹.

O exame histopatológico do baço mostra acúmulos de macrófagos cheios de lipídios, que pode gerar esplenomegalia considerável. Biópsias de mucosa e submucosa do intestino mostram acúmulo de células espumosas, ricas em lipídios^{113,138}. As alterações na glândula adrenal são encontradas principalmente na forma infantil de DLAL (DW); apresentam-se aumentadas,

com macrófagos ricos em lipídios, áreas de necrose e calcificações distróficas na zona reticular, que também podem ser observadas morfológicamente¹³⁸. Outros órgãos, como gânglios linfáticos e medula óssea, também podem ter o acúmulo típico de macrófagos carregados de lipídios¹³⁸. Ocasionalmente pode-se encontrar linfócitos vacuolados no sangue periférico⁸⁸.

Diagnóstico Diferencial

Por tratar-se de uma doença com um quadro clínico muito variável e sintomas clínicos atípicos, pode ser confundida com outras doenças, e muitas vezes o diagnóstico só é definido após muito tempo de início da doença¹⁵. Anormalidades lipídicas mais comumente encontradas e que são um importante diagnóstico diferencial da DAEC, especialmente em adultos, é a Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica DHGNA (forma menos agressiva) e NASH (forma mais agressiva com maior potencial de evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular), síndrome metabólica, hipercolesterolemia autossômica recessiva, sitosterolemia, hipercolesterolemia familiar, cirrose hepática criptogênica^{4,9,15,89,115}. Doença hepática gordurosa associada a um peso corporal adequado à idade do paciente deve ser uma razão para considerações diagnósticas diferenciais^{9,15}.

Outras doenças de depósito lisossomal, como a Doença de Gaucher e a Doença de Niemann-pick, que apresentam quadro clínico e histomorfológico semelhantes à DLAL, devem ser consideradas com diagnóstico diferencial¹³⁹. A hepatopatia glicogênica é observada em pacientes com diabetes mellitus insulino dependente (tipo I) com controle glicêmico insuficiente. Há sobrecarga de glicogênio nos hepatócitos, levando à hepatomegalia e elevação de

transaminases¹⁴. Os distúrbios de armazenamento do glicogênio são um grupo de glicogenoses não lisossomais causadas por defeitos genéticos na via do metabolismo do glicogênio; clinicamente geram hepatomegalia e alteração de enzimas hepáticas, e principalmente as glicogenoses tipos 1 e 3 podem mimetizar esteatose microvesicular, devido ao acúmulo simultâneo de lipídeos neutros e glicogênio⁸⁹. A doença de Wilson é uma doença hereditária autossômica recessiva, decorrente da mutação do gene ATP7B, que codifica uma proteína transportadora de cobre. A acúmulo de cobre decorrente da impossibilidade de excreção gera danos ao fígado, com alteração de enzimas hepáticas, podendo evoluir para cirrose, e histomorfologicamente pode ocorrer esteatose macro e microvesicular^{139,140}.

Tratamento e Manejo

A DLAL é geralmente uma doença de progressão lenta, com cirrose e distúrbios lipídicos que não podem ser completamente curados pela terapia convencional. O tratamento para esta doença consiste em controle da dislipidemia com dieta e medicamentos, como as estatinas. Já foi descrito tratamento para DW através de transplante de células de cordão umbilical e medula óssea^{81,141}. Medicamentos hipolipemiantes (principalmente estatinas) são comumente usados em crianças com DLAL. As estatinas podem ser introduzidas em crianças com menos de 10 anos de idade em caso de hipercolesterolemia significativa que não responda à terapia dietética. Em geral, pacientes com DLAL requerem o monitoramento de seus parâmetros lipídicos e seu teste de função hepática.

O tratamento e o prognóstico da DLAL mudaram de uma forma considerável após a criação da Sebelipase alfa (Kanuma®, Kanuma™), uma terapia de reposição enzimática (TRE) que resultou em melhorias nos danos ao fígado e nas anormalidades lipídicas^{135,138,142-143}.

A Sebelipase alfa é uma LAL humana recombinante que é produzido em ovos brancos de galinhas transgênicas *Gallus domesticus*. O resíduo de mannose-6-fosfato anexado facilita sua captação no lisossomas de hepatócitos e macrófagos onde pode subsequentemente hidrolisar ésteres do colesterol e triglicérides. Foram realizados estudos pré-clínicos em um rato deficiente de LAL e demonstrou 100% de sobrevivência de doentes tratados versus animais não tratados, bem como uma melhoria significativa do armazenamento de lipídios hepáticos¹⁴⁴.

O transplante de fígado para DLAL é outro tratamento possível para casos graves, em que existe evolução para cirrose descompensada. Os pacientes submetidos a transplante hepático melhoraram seu estado clínico, incluindo o metabolismo lipídico. Existe relato de melhora do perfil lipídico após o transplante de fígado. Bernstein et al. publicaram 2 casos de pacientes com DLAL submetidos a transplante de fígado, sendo que em ambos a doença multissistêmica de DLAL recidivou após o transplante. Eles também revisaram a literatura de 18 casos de pacientes com DLAL submetidos a transplante de fígado e descreveram progressão multissistêmica de DLAL em 11 pacientes (66%) e óbito em 6 pacientes (33%)¹⁴⁵.

O tratamento com transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) é o enxerto de leucócitos do doador após transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas requer quimioterapia de condicionamento para

ablação da medula do receptor, para criar espaço para a medula óssea do doador, e para suprimir o sistema imunológico do hospedeiro, para prevenir a rejeição das células do doador. Os pacientes com DW não tratados são candidatos insatisfatórios para TCTH, pois estão gravemente desnutridos, frequentemente apresentam febre, com um processo inflamatório contínuo, e têm doença significativa e rapidamente progressiva. O TCTH na DW tem uma mortalidade relacionada ao tratamento proibitivamente alta^{115,129}.

O TCTH teve resultados mistos e requer mais estudos.¹⁴⁷ Alguns casos bem-sucedidos de transplante de medula óssea DLAL foram relatados; no entanto, a maioria dos casos tem um prognóstico ruim e a TRE imediata é a terapia de escolha^{105,145,148}.

As crianças com DLA geralmente apresentam evolução mais grave que os adultos, que leva à insuficiência hepática precoce e, conseqüente, indicação de transplante hepático. O transplante hepático tem se mostrado efetivo na prevenção do óbito por insuficiência hepática, entretanto mesmo entre os pacientes transplantados o comprometimento extra-hepático pode levar a complicações e são causa de óbito precoce¹⁵.

Prognóstico

A evolução para o óbito está relacionada à presença de desnutrição, doença hepática e insuficiência cortical adrenal. A morte prematura ocorre devido à insuficiência hepática e/ou doença aterosclerótica acelerada, secundária à hiperlipidemia crônica apesar disso, os indivíduos com CESD podem ter uma expectativa de vida normal, dependendo da gravidade das manifestações da doença^{39,115,130}.

2. JUSTIFICATIVA

A DLAL causa lesão hepática que, se não diagnosticada precocemente, pode evoluir para cirrose e necessidade de transplante hepático. Porém, por tratar-se de uma doença ultra rara, é pouco diagnosticada em nosso meio. Sabe-se que 83% dos casos apresentam sintomas de doença hepática até 12 anos de idade e 66% cursam com insuficiência hepática e indicação de transplante.

O Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICR-HCFMUSP) é um Serviço de referência para casos graves e complexos que vêm encaminhados não apenas de São Paulo, mas de todo o Brasil, e seu Serviço de Transplante Hepático Pediátrico é um dos maiores Centros transplantadores de fígado em crianças do país.

Visto que a DLAL apresenta possibilidade de tratamento com terapia de reposição enzimática, é importante identificarmos a patologia e realizarmos o diagnóstico correto destes pacientes para que eles possam se beneficiar do tratamento existente, que tem se mostrado seguro e efetivo^{18,132}. Além disso, a doença pode recidivar no fígado transplantado, sendo fundamental estabelecer o tratamento enzimático para evitar lesão no enxerto hepático⁹.

3. OBJETIVOS

- 1) Identificar os pacientes com deficiência de lipase ácida (DLA);
- 2) Estabelecer um protocolo de busca e identificação dos pacientes com DLA para diagnóstico e tratamento precoce;
- 3) Através da identificação do probando com DLA, realizar um aconselhamento genético sobre a doença e, se possível, busca por outros familiares acometidos.

4. MÉTODOS

Foi realizado um estudo de coorte retrospectivo de pacientes cirróticos submetidos a transplante hepático ou que estavam em fila de transplante, aguardando o transplante hepático, no ICR-HCFMUSP, no período de janeiro de 2015 e julho de 2019.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP (Plataforma Brasil CAAE: 37716214.6.0000.0068).

Participaram do estudo de pesquisa todos os pacientes acompanhados no ambulatório de transplante hepático, transplantados ou aguardando transplante hepático, com diagnóstico de cirrose hepática e sem etiologia definida.

Os critérios de inclusão para o estudo foram:

- Ser acompanhado no Ambulatório de Transplante hepático do ICR-HCFMUSP
- Ter diagnóstico de cirrose ou ter sido transplantado por cirrose sem etiologia definida (criptogênica)

Os critérios de exclusão foram:

- Ter diagnóstico etiológico definido da doença hepática
- Não assinar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE)

Para o diagnóstico de cirrose, utilizou-se a presença de biópsia hepática com fibrose grau 4 ou presença de sinais ao exame físico e alterações nos exames laboratoriais e de imagem que sugerissem a presença de hipertensão portal cirrótica. Para se estabelecer o diagnóstico de cirrose criptogênica, consideramos que o paciente passou por ampla investigação etiológica da doença hepática, incluindo exames laboratoriais, como sorologias virais,

dosagem de alfa-1-antitripsina, dosagem de ceruloplasmina e cobre urinário, dosagem de auto anticorpos para doenças hepáticas autoimunes, eletroforese de proteínas, dosagem de imunoglobulinas; exames de imagem, como ultrassom de abdome com Doppler, colangiressonância; biópsia hepática, quando indicado; exames laboratoriais para diagnóstico de erros inatos do metabolismo, como TANDEM e dosagens enzimáticas específicas, de acordo com a suspeita diagnóstica, e quando indicado.

Após a assinatura do TCLE, foram realizadas as amostras de sangue fixadas em papel filtro (DBS) para envio ao laboratório de referência, onde foram realizadas as análises.

Os testes de atividade da LAL e análises moleculares em DBS foram realizados em Children's Department of Laboratories em Seattle, Estados Unidos.

Os testes de atividade de LAL foram realizados usando o método descrito por Hamilton et al. em 2012: o palmitato de 4-metilumbeliferil foi usado como substrato para determinar a atividade total da lipase; como o sangue total possui outras lipases, Lalistat 2, um inibidor de LAL, foi adicionado à amostra para medir a atividade da lipase pancreática e, finalmente, a atividade de LAL foi calculada. As unidades utilizadas foram pmole/h/spt.

Excepcionalmente, a dosagem enzimática nos leucócitos do sangue foi realizada no Laboratório de Erros Inatos de Metabolismo de Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

O sequenciamento Sanger do gene *LIPA* foi realizado para todos os pacientes com baixa atividade LAL^{145,147}.

5. RESULTADOS

De 1989, ano em que o Programa de Transplante Hepático Pediátrico foi introduzido no Instituto da Criança- ICR-HCFMUSP, até julho de 2019, foram realizados 803 transplantes hepáticos pediátricos.

Do período de janeiro de 2015 a julho de 2019, um total de 224 pacientes foram submetidos a transplante hepático pediátrico. Neste período foram coletados exames de 73 pacientes que eram acompanhados no Ambulatório de Transplante Hepático e que apresentavam cirrose hepática de causa desconhecida e que preencheram os critérios de inclusão e exclusão preconizados no projeto; destes, 54 eram transplantados do fígado e 19 aguardavam o transplante hepático na fila de transplante.

Dos 73 exames colhidos, todos vieram a dosagem de enzima normal, exceto em um paciente, que foi evidenciada atividade de enzima igual a zero, compatível com DLAL no papel de filtro e foi repetido nos leucócitos acrescente o valor.

O estudo do gene pelo método de Sanger revelou variante do tipo missense no gene *LIPA* (NM_000235.4):c.266T>C:p.(Leu89Pro) em homozigose no paciente detectado. Esta variante não foi descrita no banco de controles do Arquivo Brasileiro On-line de Mutações (ABraOM¹⁴⁹) e no banco de controles mundiais The Genome Aggregation Database (gnomAD¹⁵⁰).

Descrição do Caso Clínico do Probando

O paciente masculino, segundo filho de um casal sadio e consanguíneo (mãe G2P2A0; pais são primos de 1º grau). Nasceu de parto cesárea, a termo, com peso de 3400g, em boas condições. A mãe teve gestação sem intercorrências. Pai faleceu com 41 anos de Infarto agudo do miocárdio.

Com 4 meses de vida iniciou episódios de diarreia, com piora progressiva; evoluiu com perda de peso progressiva e aos 8 meses foi identificado “*failure to thrive*”. A pediatra que o acompanhava suspendeu o aleitamento materno e iniciou fórmula de partida; como manteve baixo ganho ponderal, as formulas foram posteriormente trocadas para fórmula de soja e posteriormente leite de cabra, sem melhora; introduzido Pregestimil, com melhora da diarreia. Neste período foram colhidos exames laboratoriais, que mostraram a presença de hipercolesterolemia, e identificado hepatomegalia ao exame físico, sendo encaminhado para hepatologista. Passou em 1ª consulta com hepatologista com 2anos e 8 meses, apresentando peso= 10.100 g (p <2.5) e estatura= 85 cm (p < 2.5). No exame físico apresentava fígado palpável a 7 cm do RCD e a 6 cm do apêndice xifoide, e a 3 cm do RCE, de consistência firme. Baço não palpável, sem ascite. Apresentava desenvolvimento neuro-psicomotor normal; Laboratorialmente apresentava alteração de enzimas hepáticas: AST=87 (3x LSN), ALT=144 (4x LSN), gamaGT= 59 (2x LSN), Fosfatase alcalina= 1014 (4x LSN), com função hepática preservada: TP=15 seg, atividade= 76%, fator V=85%, fibrinogênio= 250, albumina=4 ; hemograma sem alterações, com HB=11,8 e HT=36; glicemia de jejum=94 mg/dL e gasometria venosa normal; perfil lipídico alterado: colesterol total = 428 mg/dL, LDL= 374 mg/dL, HDL= 16 mg/dL, triglicérides= 190 mg/dL.

Pela hipótese diagnóstica de erro inato do metabolismo (Doença de depósito?), foi indicada a realização de biópsia hepática, cuja microscopia

óptica mostrou: arquitetura lobular preservada, espaços-porta alargados, às custas de fibrose discreta, com emissão de septos; presença de esteatose microgoticular e agregados de macrófagos com microvacuolização citoplasmática; discreta fibrose perivascular; achado sugestivos de doença de Niemann-Pick.

A microscopia eletrônica mostrou imagens sugestivas de depósitos de cristais de colesterol nos hepatócitos e histiócitos, compatíveis com doença de acúmulo de colesterol. A dosagem de esfingomielinase ácida veio baixa ($=53.9$; VR= 86-173) e Fosfatase ácida= 37.1 (VR= 0.5-11), sendo feita a hipótese diagnóstica de Niemann-Pick tipo B.

O paciente evoluiu com diarreia crônica intermitente, baixo ganho pômbero-estatural e crises de broncoespasmo, tendo sido internado 3 vezes por crises de broncoespasmo. Apresentava esplenomegalia (em torno de 2cm de RCE) e sinais de cirrose. Realizada endoscopia digestiva alta (EDA), que mostrou presença de varizes de esôfago, com lesões polipoides duodenais e alterações da mucosa do duodeno sugestivas de depósito de colesterol (mucosa com pequenos nódulos de coloração amareladas), que se tornavam confluentes e ocupavam toda a circunferência do órgão nas demais porções duodenais. A biópsia duodenal mostrou espessamento das vilosidades intestinais pela presença de numerosos histiócitos xantomatosos na lâmina própria e em menor quantidade na submucosa; colhido coprologia funcional, que veio normal. Tomografia computadorizada de tórax mostrou pneumopatia intersticial com componente de vias aéreas, sugestiva de doença de depósito. A espirometria mostrou distúrbio ventilatório restritivo. Ecocardiografia com microbolhas veio positivo para a presença de shunt intrapulmonar. A

Gasometria arterial mostrou hipoxemia ($PO_2=68,7$ e saturação de $O_2=93,6\%$), sugerindo presença de síndrome hepatopulmonar. O paciente evoluiu com progressão da hepatopatia e descompensação da hipertensão portal; aos 13 anos apresentou pela primeira vez ascite e foi hospitalizado por peritonite bacteriana espontânea (PBE), e aos 14 anos teve 2 internações por ascite e desconforto respiratório. Em julho de 2005, com 14 anos, foi listado para transplante hepático, apresentando Modelo para doença hepática crônica em estágio final (MELD)= 17. Enquanto aguardava doador cadáver, iniciou quadro de hipoxemia, e aos 17 anos foi relistado na fila de transplante hepático sob situação especial (pela Síndrome hepatopulmonar). Apresentou novo episódio de PBE e evoluiu com insuficiência hepática, necessitando de transplante.

Em fevereiro de 2010, com 18 anos, foi transplantado do fígado através de doador falecido. O anatomopatológico do explante apresentava cirrose micronodular e aspectos característicos da doença, incluindo algumas fendas em forma de agulha dentro das células de Kupffer microvacuoladas (Figura 1 A,B e C).

Evolui com rejeição celular aguda no pós-transplante imediato, controlada adequadamente com terapia específica e sem deixar sequelas para o enxerto. Foi transferido para o Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IC-HCFMUSP) - Unidade de Gastroenterologia e Hepatologia ainda em 2010, onde continuou seu acompanhamento clínico com o Grupo de Transplante Hepático de adultos. No período pós-transplante evoluiu com normalização dos valores da quitotriosidase, mantendo níveis de LAL persistentemente baixos, normalização

do perfil lipídico, com aumento de HDL, redução da esplenomegalia em cerca de 50% e houve melhora acentuada do quadro respiratório. Em 2012 apresentou rejeição celular aguda, com rápida evolução para rejeição celular crônica precoce ainda em 2012. Em 2015 apresentou elevação importante de transaminases; realizada nova biópsia hepática, que mostrou crônica ductopênica, evolução para fibrose, sem sinais sugestivos de recidiva da doença de base (Figura 1 D, E e F).

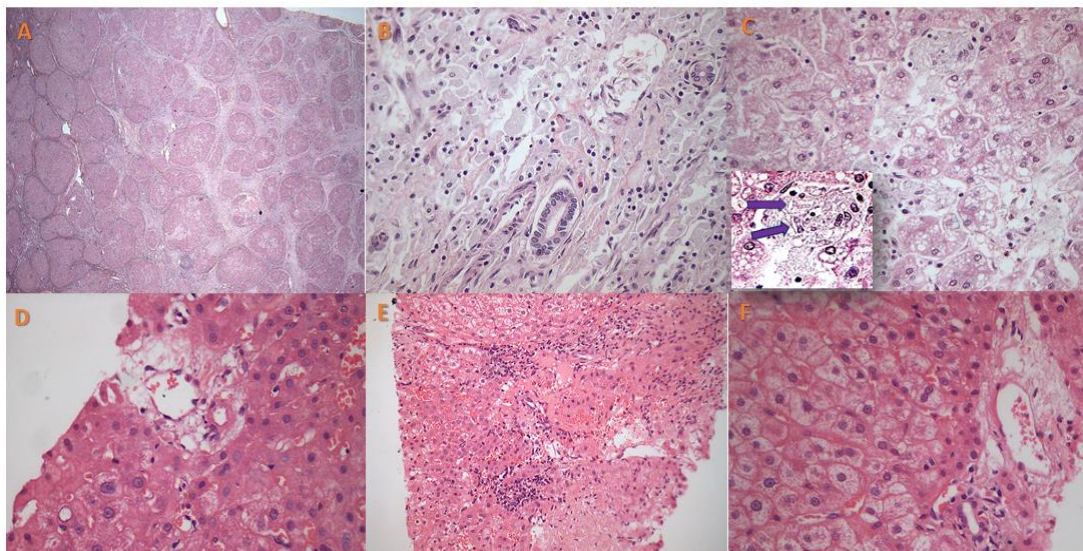


Figura 1. A- O explante hepático de 2010 revelou fibrose avançada em fase cirrótica micronodular (H&E, 25X). B- Grande número de macrófagos espumosos e levemente pigmentados eram visualizados em espaços-porta (H&E, 200X). C- Havia áreas com esteatose microvesicular e mediovesicular no fígado, além de agregados de volumosas células de Kupffer xantomatosas (H&E, 200X), as quais exibiam raras fendas finas (setas). D- Ductopenia em trato portal devido à rejeição crônica na biópsia de 2015 (H&E, 200X), sem evidência de recidiva da doença de base. E- Componente de rejeição aguda com inflamação portal linfomononuclear leve (H&E, 100X) na mesma biópsia. F- Alterações epiteliais degenerativas em ducto biliar (H&E, 200X).

Realizado em 2016 biópsia duodenal, que mostrou inúmeros macrófagos xantomatosos na lâmina própria. Pela manutenção da elevação de enzimas hepáticas, indicado nova biópsia hepática em 2017, que mostrou presença de muitos macrófagos xantomatosos dentro do trato portal, fibrose em ponte acentuada (F3), rejeição crônica e células sinusoidais espumosas raras, sugerindo fortemente a recrudescência da doença (Figura 2).

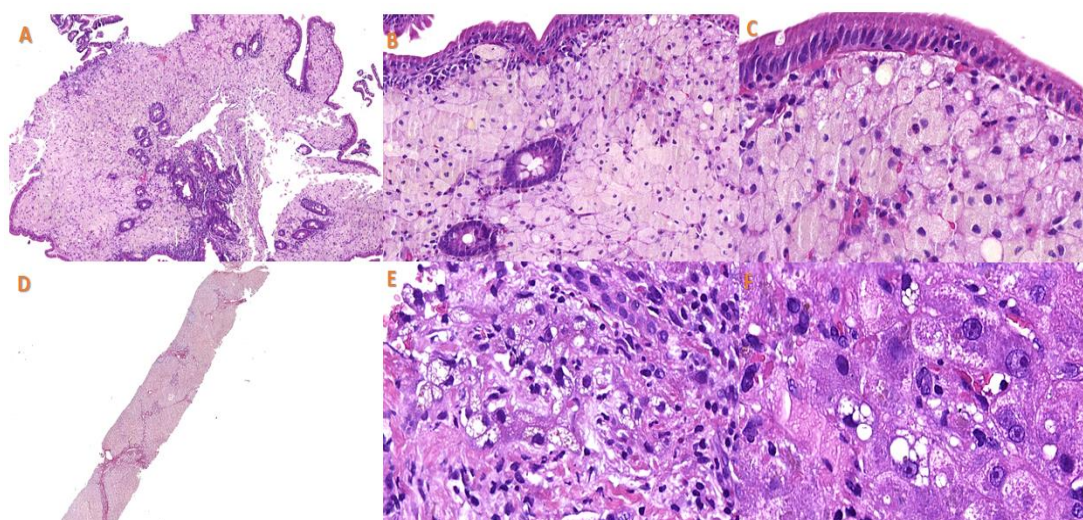


Figura 2. A- Amostra de mucosa duodenal realizada em 2016 exibia lâmina própria preenchida por células volumosas e perda parcial de glândulas (H&E, 50X). B- Abundante número de macrófagos xantomatosos distribuídos difusamente no córion da mucosa duodenal (H&E, 200X). C- Aspecto espumoso e microvacúolos no citoplasma dos numerosos macrófagos duodenais, por vezes com núcleos picnóticos (H&E, 400X). D- Na panorâmica da biópsia hepática realizada em 2017, visualiza-se fibrose portal em fase de transformação nodular (Picrossírius Vermelho, 10x). E- Havia múltiplos macrófagos portais espumosos (H&E, 400X) sugerindo provável recidiva da doença de base no enxerto, além de sinais de rejeição crônica e outras alterações. F- Escassas células de Kupffer xantomatosas foram identificadas em sinusoides (H&E, 500X).

O diagnóstico de DLAL foi confirmado apenas em 2017, aos 26 anos, pela dosagem de enzimática e pelo teste genético do gene *LIPA* e foi iniciado o tratamento com Sebelipase alfa. Manteve alteração de enzimas hepáticas, apesar das imunossupressão adequada, com evolução da fibrose do enxerto. Biópsia de novembro/2018 mostrava rejeição crônica ductopênica, com fibrose avançada associada à rejeição aguda tardia e presença de agregados macrofágicos e células de Kupffer xantomatosos, sugerindo recidiva da doença de base. Pela piora progressiva da função hepática, foi listado para retransplante em setembro de 2019. Em novembro de 2019 foi hospitalizado com quadro de encefalopatia associada à infecção, evoluindo para insuficiência hepática. Foi retransplantado neste mesmo mês, porém evoluiu com complicações clínicas no pós-operatório recente, indo a óbito aos 28 anos.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo destaca todas as dificuldades no diagnóstico e tratamento de uma condição rara, como a DLAL. Apesar de ser referência em transplantes de fígado ao longo dos anos, o Brasil ainda carece de descrições de pacientes submetidos a tais procedimentos com deficiência de lipase ácida lisossomal, o que continua sendo incomum. Adicionalmente, este caso específico foi identificado em nosso projeto de pesquisa de forma retrospectiva, através da análise dos níveis de LAL de 73 pacientes submetidos ou aguardando transplante de fígado sem causa conhecida, e em seguida forneceu testes genéticos específicos capazes de confirmar esse diagnóstico raro.

Mesmo que o transplante hepático e a terapia de reposição enzimática com Sebelipase alfa (Kanuma®) possam ser oferecidos, o prognóstico desta condição ainda pode ser muito limitado se o diagnóstico ocorrer tardiamente. Embora seja difícil prever, é possível que a evolução deste paciente teria sido menos grave se o tratamento específico com terapia de reposição enzimática tivesse sido iniciado precocemente¹⁴².

O gene *LIPA* está localizado no braço longo do cromossomo 10 no locus 10q23.31; existem 10 éxons no transcrito canônico (ENST00000336233.5/NM_000235.4)¹⁵¹, que codifica uma proteína com 399 aminoácidos conhecida como LAL¹⁵². A expressão do gene *LIPA* ocorre em diferentes tecidos, com o ARN correspondente sendo encontrado principalmente em macrófagos, células de Kupffer e células de Hofbauer.

Variantes de perda de função em *LIPA* têm sido associadas à deficiência de LAL de padrão de herança autossômico recessivo; essa condição rara, com

uma prevalência estimada entre 1:50.000 e 1:350.000¹⁰, pode ser dividida em dois fenótipos: doença de Wolman (principalmente devido a variantes truncadas) e doença de armazenamento de éster de colesterol (geralmente relacionada a variantes *missense* que permitem alguma atividade enzimática residual)^{12,38,153}.

A doença de Wolman é tipicamente caracterizada por má absorção nos primeiros dias de vida, resultando em desnutrição e acúmulo de ésteres de colesterol e triglicerídeos em macrófagos hepáticos; com o tempo, a hepatomegalia (com ou sem esplenomegalia) e calcificações adrenocorticais podem levar à insuficiência hepática e adrenal; em geral, a expectativa de vida sem tratamento adequado (por meio de transplante de células-tronco precoce) geralmente não ultrapassa 1 ano^{38,119}.

Os sinais da doença de armazenamento de éster de colesterol frequentemente começam mais tarde, mas às vezes podem se manifestar precocemente, semelhante à doença de Wolman; a dislipidemia (com altos níveis de LDL e baixos níveis de HDL), hepatosplenomegalia e elevação das transaminases são frequentes, juntamente com falha no crescimento, anemia, aterosclerose, cirrose, hipertensão portal e outras complicações crônicas. Embora a expectativa de vida seja variável, há um aumento no risco de hepatocarcinoma (particularmente em pacientes cirróticos).

Existem mais de 140 variantes patogênicas/provavelmente patogênicas em *LIPA* descritas no banco de dados ClinVar, com pelo menos 39 variantes *missense* diferentes; sendo que os resíduos de aminoácidos Ser153, Asp324 e His353 compõem o sítio ativo catalítico de LAL. A variante c.894G>A afeta o *splicing* e está presente em quase metade dos pacientes com doença de

armazenamento de éster de colesterol (a maioria de populações europeias); a variante c.260G>T ocorre principalmente em indivíduos de origem judaica-iraniana, a exceção desta variante, nenhum outro efeito fundador no gene *LIPA* foi observado.

A variante do nosso paciente, *LIPA* (NM_000235.4): c.266T>C: p.(Leu89Pro), foi relatada apenas uma vez no ClinVar, por um laboratório brasileiro; ela também está ausente em grandes bancos de dados populacionais, tanto globais (GnomAD) quanto locais (ABraOM). No entanto, essa variante *missense* já havia sido detectada em pelo menos 3 pacientes brasileiros com DLAL (um deles também em estado de homozigose) quase dez anos atrás, o que poderia indicar um efeito fundador específico do Brasil¹⁵⁴.

Embora a confirmação molecular por meio do sequenciamento do gene *LIPA* seja sempre recomendada, a dosagem de LAL em leucócitos, fibroblastos ou sangue impregnado em papel filtro também pode ser uma maneira alternativa de confirmar o diagnóstico; a atividade enzimática residual na doença de Wolman geralmente fica abaixo de 5%, mas pode variar entre 2 e 11% na doença de armazenamento de éster de colesterol.

Casos típicos são frequentemente diagnosticados erroneamente como doença de Niemann-Pick tipo B. O diagnóstico diferencial geralmente inclui outras condições, como doença de Niemann-Pick tipo A doença de Gaucher e outras doenças de armazenamento lisossômico, mas também pode-se considerar hipercolesterolemia familiar e linfo-histiocitose hemofagocítica familiar, bem como causas não genéticas de hepatosplenomegalia, como DHGNA.

Além do tratamento de suporte, classicamente, os transplantes hepáticos e transplante precoce de células-tronco hematopoiéticas eram as únicas opções terapêuticas; no entanto, recentemente, TRE com Sebelipase alfa (Kanuma®) tornou-se disponível para o tratamento tanto da doença de Wolman quanto da doença de armazenamento de éster de colesterol. Após a aprovação pela FDA (Federal Drug Administration) em 2015 e no Brasil pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) em 2023, com uma dose de 1 mg/kg de peso corporal a cada duas semanas, a TRE com Sebelipase alfa tornou-se uma ferramenta importante para melhorar a qualidade de vida em pacientes com doença de armazenamento de éster de colesterol e, ainda mais, para prolongar a sobrevivência de pacientes com doença de Wolman. Embora as evidências empíricas ainda sejam mínimas, estudos indicaram que a melhoria precoce e rápida de lesões hepáticas e anormalidades lipídicas foram sustentadas em crianças com mais de 4 anos que receberam TRE com Sebelipase alfa, sem progressão da doença hepática por até 5 anos, adiando ou até mesmo descartando a necessidade de um transplante de fígado^{155,156,157,158}.

Na América Latina, há uma descrição de dois irmãos colombianos de 5 e 7 anos diagnosticados com DLAL e iniciados com terapia de reposição enzimática, o que levou a uma redução nas enzimas hepáticas AST e ALT, juntamente com um leve aumento no colesterol HDL¹⁵⁹. No entanto, ainda é difícil prever o acompanhamento a longo prazo desses pacientes.

Em decorrência do número limitado de indivíduos afetados com variantes bialélicas em *LIPA*, são necessários mais casos para estabelecer a correlação genótipo-fenótipo nas condições relacionadas à DLAL.

7. CONCLUSÕES

- 1) No presente estudo de 73 pacientes (54 submetidos a transplante hepático e 19 na lista de espera para transplante) foi identificado apenas um paciente com DLAL;
- 2) O diagnóstico desta doença é ainda muito tardio, pois o paciente afetado foi confirmado aos 26 anos de idade, 8 anos após o transplante hepático, apesar de sintoma ter iniciado desde 4 meses de idade com evolução progressiva do acometimento hepático;
- 3) Nos pacientes com hepatomegalia, elevação de enzimas hepáticas e dislipidemia deve ser incluído o diagnóstico da DLAL. A dosagem enzimática de LAL e sequenciamento do gene *LIPA* são essenciais para confirmação diagnóstica;
- 4) A variante encontrada c.266T>C:p (Leu89Pro) em homozigose no gene *LIPA* encontrada em nosso paciente pode se mostrar um efeito fundador específico de nossa população e justifica investigação adicional;
- 5) Este estudo demonstra que a deficiência de lipase ácida lisossômica e outras doenças de depósito lisossômico devem ser consideradas em crianças submetidas a transplante de fígado, especialmente aquelas sem causa conhecida para insuficiência hepática;
- 6) O diagnóstico precoce e tratamento adequado com Sebelipase alfa podem melhorar o prognóstico desta doença;
- 7) O aconselhamento genético é importante à família, pois apesar de muito rara apresenta padrão de herança autossômica recessiva e o risco de recorrência para futura prole do casal é de 25%.

8. REFERÊNCIAS

1. Platt FM, Boland B, van der Spoel AC. The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *J Cell Biol.* 2012 Nov26;199(5):723-34.
2. Xu M, Motabar O, Ferrer M, Marugan JJ, Zheng W, Ottinger EA. Disease models for the development of therapies for lysosomal storage diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2016 May;1371(1):15-29.
3. Aguisanda F, Thorne N, Zheng W. Targeting Wolman Disease and Cholesteryl Ester Storage Disease: Disease Pathogenesis and Therapeutic Development. *Curr Chem Genom Transl Med.* 2017 Jan 30;11:1-18.
4. Kohli R, Ratziu V, Fiel MI, Waldmann E, Wilson DP, Balwani M. Initial assessment and ongoing monitoring of lysosomal acid lipase deficiency in children and adults: Consensus recommendations from an international collaborative working group. *Mol Genet Metab.* 2020 Feb;129(2):59-66.
5. Strebinger G, Müller E, Feldman A, Aigner E. Lysosomal acid lipase deficiency - early diagnosis is the key. *Hepat Med.* 2019 May 23;11:79-88.
6. Witeck CDR, Schmitz AC, de Oliveira JMD, Porporatti AL, De Luca Canto G, Pires MMS. Lysosomal acid lipase deficiency in pediatric patients: a scoping review. *J Pediatr (Rio J).* 2022 Jan-Feb;98(1):4-14.
7. Del Angel G, Hutchinson AT, Jain NK, Forbes CD, Reynders J. Large-scale functional LIPA variant characterization to improve birth prevalence estimates of lysosomal acid lipase deficiency. *Hum Mutat.* 2019 Nov;40(11):2007-20.
8. Cunha-Silva M, Mazo DFC, Corrêa BR, Lopes TM, Arrelaro RC, Ferreira GL, Rabello MI, Sevá-Pereira T, Escanhoela CAF, Almeida JRS. Lysosomal Acid Lipase Deficiency Leading to Liver Cirrhosis: a Case

-
- Report of a Rare Variant Mutation. *Ann Hepatol.* 2019 Jan-Feb;18(1):230-5.
9. Bernstein DL, Hůlkova H, Bialer MG, Desnick RJ. Cholesteryl ester storage disease: review of the findings in 135 reported patients with an underdiagnosed disease. *J Hepatol.* 2013 Jun;58(6):1230-43.
10. Hoffman EP, Barr ML, Giovanni MA, Murray MF. Lysosomal Acid Lipase Deficiency. 2015 Jul 30 [updated 2016 Sep 1]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2023.
11. Aqul A, Lopez AM, Posey KS, Taylor AM, Repa JJ, Burns DK, Turley SD. Hepatic entrapment of esterified cholesterol drives continual expansion of whole body sterol pool in lysosomal acid lipase-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014 Oct 15;307(8):G836-47.
12. OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man database, 2021. Available from: <https://www.omim.org/>
13. Carter A, Brackley SM, Gao J, Mann JP. The global prevalence and genetic spectrum of lysosomal acid lipase deficiency: A rare condition that mimics NAFLD. *J Hepatol.* 2019 Jan;70(1):142-50.
14. Pant M, Oshima K. Cholesteryl Ester Storage Disease: An underdiagnosed cause of cirrhosis in adults. *Ann Diagn Pathol.* 2017 Dec;31:66-70.
15. Reiner Ž, Guardamagna O, Nair D, Soran H, Hovingh K, Bertolini S, Jones S, Ćorić M, Calandra S, Hamilton J, Eagleton T, Ros E. Lysosomal acid lipase deficiency--an under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction. *Atherosclerosis.* 2014 Jul;235(1):21-30.

-
16. Dubland JA, Francis GA. Lysosomal acid lipase: at the crossroads of normal and atherogenic cholesterol metabolism. *Front Cell Dev Biol.* 2015 Feb 2;3:3.
 17. Li F, Zhang H. Lysosomal Acid Lipase in Lipid Metabolism and Beyond. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019 May;39(5):850-6.
 18. Pericleous M, Kelly C, Wang T, Livingstone C, Ala A. Wolman's disease and cholesteryl ester storage disorder: the phenotypic spectrum of lysosomal acid lipase deficiency. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017 Sep;2(9):670-9.
 19. Gómez-Duarte C, García V, Botero V, Aristizabal A, Echeverri G, Pachajoa H. Deficiencia de lipasa ácida lisosomal, una patología infrecuente. *Gac Med Mex.* 2019;155(3):291-7.
 20. Anderson RA, Rao N, Byrum RS, Rothschild CB, Bowden DW, Hayworth R, Pettenati M. In situ localization of the genetic locus encoding the lysosomal acid lipase/cholesteryl esterase (LIPA) deficient in Wolman disease to chromosome 10q23.2-q23.3. *Genomics.* 1993 Jan;15(1):245-7.
 21. Aslanidis C, Klima H, Lackner KJ, Schmitz G. Genomic organization of the human lysosomal acid lipase gene (LIPA). *Genomics.* 1994 Mar 15;20(2):329-31.
 22. Koch G, Lalley PA, McAvoy M, Shows TB. Assignment of LIPA, associated with human acid lipase deficiency, to human chromosome 10 and comparative assignment to mouse chromosome 19. *Somatic Cell Genet.* 1981 May;7(3):345-58.
 23. Walenbergh SM, Shiri-Sverdlov R. Cholesterol is a significant risk factor for non-alcoholic steatohepatitis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;9(11):1343-6.

-
24. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 2002 May;109(9):1125-31.
25. Canbay A, Müller MN, Philippou S, Gerken G, Tromm A. Cholesteryl Ester Storage Disease: Fatal Outcome without Causal Therapy in a Female Patient with the Preventable Sequelae of Progressive Liver Disease after Many Years of Mild Symptoms. *Am J Case Rep.* 2018 May 18;19:577-81.
26. Burton BK, Balwani M, Feillet F, Barić I, Burrow TA, Camarena Grande C, Coker M, Consuelo-Sánchez A, Deegan P, Di Rocco M, Enns GM, Erbe R, Ezgu F, Ficicioglu C, Furuya KN, Kane J, Laukaitis C, Mengel E, Neilan EG, Nightingale S, Peters H, Scarpa M, Schwab KO, Smolka V, Valayannopoulos V, Wood M, Goodman Z, Yang Y, Eckert S, Rojas-Caro S, Quinn AG. A Phase 3 Trial of Sebelipase Alfa in Lysosomal Acid Lipase Deficiency. *N Engl J Med.* 2015 Sep 10;373(11):1010-20.
27. Muntoni S, Wiebusch H, Jansen-Rust M, Rust S, Schulte H, Berger K, Pisciotta L, Bertolini S, Funke H, Seedorf U, Assmann G. Heterozygosity for lysosomal acid lipase E8SJM mutation and serum lipid concentrations. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013 Aug;23(8):732-6.
28. vom Dahl S, Harzer K, Rolfs A, Albrecht B, Niederau C, Vogt C, van Weely S, Aerts J, Müller G, Häussinger D. Hepatosplenomegaliclipidosis: what unless Gaucher? Adult cholesteryl ester storage disease (CESD) with anemia, mesenteric lipodystrophy, increased plasma chitotriosidase activity and a homozygous lysosomal acid lipase -1 exon 8 splice junction mutation. *J Hepatol.* 1999 Oct;31(4):741-6.
29. Seedorf U, Wiebusch H, Muntoni S, Christensen NC, Skovby F, Nickel V, Roskos M, Funke H, Ose L, Assmann G. A novel variant of lysosomal acid lipase (Leu336-->Pro) associated with acid lipase deficiency and cholesterol ester storage disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Jun;15(6):773-8.

-
30. Muntoni S, Wiebusch H, Jansen-Rust M, Rust S, Seedorf U, Schulte H, Berger K, Funke H, Assmann G. Prevalence of cholesteryl ester storage disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Aug;27(8):1866-8.
 31. Goldstein JL, Dana SE, Faust JR, Beaudet AL, Brown MS. Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein. Observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease. *J Biol Chem.* 1975 Nov 10;250(21):8487-95.
 32. Sloan HR, Fredrickson DS. Enzyme deficiency in cholesteryl ester storage disease. *J Clin Invest.* 1972 Jul;51(7):1923-6.
 33. SIMPLE; CLINVAR. Available from: <http://simple-clinvar.broadinstitute.org/> 2021.
 34. GNOMAD. Available from: <https://gnomad.broadinstitute.org/> 2021.
 35. Scott SA, Liu B, Nazarenko I, Martis S, Kozlitina J, Yang Y, Ramirez C, Kasai Y, Hyatt T, Peter I, Desnick RJ. Frequency of the cholesteryl ester storage disease common LIPA E8SJM mutation (c.894G>A) in various racial and ethnic groups. *Hepatology.* 2013 Sep;58(3):958-65.
 36. Vázquez-Frias R, García-Ortiz JE, Valencia-Mayoral PF, Castro-Narro GE, Medina-Bravo PG, Santillán-Hernández Y, Flores-Calderón J, Mehta R, Arellano-Valdés CA, Carbajal-Rodríguez L, Navarrete-Martínez JI, Urbán-Reyes ML, Valadez-Reyes MT, Zárate-Mondragón F, Consuelo-Sánchez A. Mexican consensus on lysosomal acid lipase deficiency diagnosis. *Rev Gastroenterol Mex (Engl Ed).* 2018 Jan-Mar;83(1):51-61.
 37. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA.* 1999 Jan 20;281(3):249-54.
 38. Zschenker O, Jung N, Rethmeier J, Trautwein S, Hertel S, Zeigler M, Ameis D. Characterization of lysosomal acid lipase mutations in the signal peptide and mature polypeptide region causing Wolman disease. *J Lipid Res.* 2001 Jul;42(7):1033-40.

-
- 39.Elleder M, Chlumska A, Ledvinová J, Poupetová H. Testis - a novel storage site in human cholesteryl ester storage disease. Autopsy report of an adult case with a long-standing subclinical course complicated by accelerated atherosclerosis and liver carcinoma. *Virchows Arch.* 2000 Jan;436(1):82-7.
- 40.Scott SA, Liu B, Nazarenko I, Martis S, Kozlitina J, Yang Y, Ramirez C, Kasai Y, Hyatt T, Peter I, Desnick RJ. Frequency of the cholesteryl ester storage disease common LIPA E8SJM mutation (c.894G>A) in various racial and ethnic groups. *Hepatology.* 2013 Sep;58(3):958-65.
- 41.Fasano T, Pisciotta L, Bocchi L, Guardamagna O, Assandro P, Rabacchi C, Zanoni P, Filocamo M, Bertolini S, Calandra S. Lysosomal lipase deficiency: molecular characterization of eleven patients with Wolman or cholesteryl ester storage disease. *Mol Genet Metab.* 2012 Mar;105(3):450-6.
- 42.Zhang H. Lysosomal acid lipase and lipid metabolism: new mechanisms, new questions, and new therapies. *Curr Opin Lipidol.* 2018 Jun;29(3):218-23.
- 43.Zhang B, Porto AF. Cholesteryl ester storage disease: protean presentations of lysosomal acid lipase deficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013 Jun;56(6):682-5.
- 44.Marshall WC, Ockenden BG, Fosbrooke AS, Cumings JN. Wolman's disease. A rare lipidosis with adrenal calcification. *Arch Dis Child.* 1969 Jun;44(235):331-41.
- 45.Cappuccio G, Donti TR, Hubert L, Sun Q, Elsea SH. Opening a window on lysosomal acid lipase deficiency: Biochemical, molecular, and epidemiological insights. *J Inherit Metab Dis.* 2019 May;42(3):509-18.
- 46.van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Feb;9(2):112-24.

-
47. Goldstein JL, Brown MS. A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. *Cell*. 2015 Mar 26;161(1):161-172.
48. Cofan Pujol M. Mecanismos básicos. Absorción y excreción de colesterol y otros esteroides [Basic mechanisms: absorption and excretion of cholesterol and other sterols]. *Clin Investig Arterioscler*. 2014 Jan-Feb;26(1):41-7.
49. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 1997 May 2;89(3):331-40.
50. Chang TY, Chang CC, Ohgami N, Yamauchi Y. Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22:129-57.
51. Heybrock S, Kanerva K, Meng Y, Ing C, Liang A, Xiong ZJ, Weng X, Ah Kim Y, Collins R, Trimble W, Pomès R, Privé GG, Annaert W, Schwake M, Heeren J, Lüllmann-Rauch R, Grinstein S, Ikonen E, Saftig P, Neculai D. Lysosomal integral membrane protein-2 (LIMP-2/SCARB2) is involved in lysosomal cholesterol export. *Nat Commun*. 2019 Aug 6;10(1):3521.
52. Thelen AM, Zoncu R. Emerging Roles for the Lysosome in Lipid Metabolism. *Trends Cell Biol*. 2017 Nov;27(11):833-50.
53. Ference BA, Kastelein JJP, Catapano AL. Lipids and Lipoproteins in 2020. *JAMA*. 2020 Aug 11;324(6):595-596.
54. Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, Dumon H. Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2008 Jun;92(3):272-83.
55. Coleman RA, Lewin TM, Van Horn CG, Gonzalez-Baró MR. Do long-chain acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways? *J Nutr*. 2002 Aug;132(8):2123-6.
56. Perera RM, Zoncu R. The Lysosome as a Regulatory Hub. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2016 Oct 6;32:223-2-53.

-
57. Saftig P, Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Sep;10(9):623-35.
58. Settembre C, Fraldi A, Medina DL, Ballabio A. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013 May;14(5):283-96.
59. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet.* 2009;43:67-93.
60. Hurley JH, Schulman BA. Atomistic autophagy: the structures of cellular self-digestion. *Cell.* 2014 Apr10;157(2):300-11.
61. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 2008 Feb 28;451(7182):1069-75.
62. Singh R, Cuervo AM. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab.* 2011 May 4;13(5):495-504.
63. Kostner GM, Hadorn B, Roscher A, Zechner R. Plasma lipids and lipoproteins of a patient with cholesteryl ester storage disease. *J Inher Metab Dis.* 1985;8(1):9-12.
64. Ginsberg HN, Le NA, Short MP, Ramakrishnan R, Desnick RJ. Suppression of apolipoprotein B production during treatment of cholesteryl ester storage disease with lovastatin. Implications for regulation of apolipoprotein B synthesis. *J Clin Invest.* 1987 Dec;80(6):1692-7.
65. Jeon TI, Osborne TF. SREBPs: metabolic integrators in physiology and metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2012 Feb;23(2):65-72.

-
66. Cummings MH, Watts GF. Increased hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 in cholesteryl ester storage disease. *Clin Chem*. 1995 Jan;41(1):111-4.
67. A-Kader HH. Lysosomal acid lipase deficiency: a form of non-obese fatty liver disease (NOFLD). *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 Oct;11(10):911-24.
68. Fouchier SW, Defesche JC. Lysosomal acid lipase A and the hypercholesterolaemic phenotype. *Curr Opin Lipidol*. 2013 Aug;24(4):332-8.
69. Oram JF, Heinecke JW. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev*. 2005 Oct;85(4):1343-72.
70. Boadu E, Bilbey NJ, Francis GA. Cellular cholesterol substrate pools for adenosine-triphosphate cassette transporter A1-dependent high-density lipoprotein formation. *Curr Opin Lipidol*. 2008 Jun;19(3):270-6.
71. Bowden KL, Bilbey NJ, Bilawchuk LM, Boadu E, Sidhu R, Ory DS, Du H, Chan T, Francis GA. Lysosomal acid lipase deficiency impairs regulation of ABCA1 gene and formation of high density lipoproteins in cholesteryl ester storage disease. *J Biol Chem*. 2011 Sep 2;286(35):30624-35.
72. Barton NW, Brady RO, Dambrosia JM, Di Bisceglie AM, Doppelt SH, Hill SC, Mankin HJ, Murray GJ, Parker RI, Argoff CE, et al. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency--macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *N Engl J Med*. 1991 May 23;324(21):1464-70.
73. Anderson RA, Sando GN. Cloning and expression of cDNA encoding human lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase. Similarities to gastric and lingual lipases. *J Biol Chem*. 1991 Nov 25;266(33):22479-84.

-
74. Burke JA, Schubert WK. Deficient activity of hepatic acid lipase in cholesterol ester storage disease. *Science*. 1972 Apr 21;176(4032):309-10.
75. Anderson RA, Bryson GM, Parks JS. Lysosomal acid lipase mutations that determine phenotype in Wolman and cholesterol ester storage disease. *Mol Genet Metab*. 1999 Nov;68(3):333-45.
76. Himes RW, Barlow SE, Bove K, Quintanilla NM, Sheridan R, Kohli R. Lysosomal Acid Lipase Deficiency Unmasked in Two Children With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Pediatrics*. 2016 Oct;138(4):e20160214.
77. Hassan S, Sidransky E, Tayebi N. The role of epigenetics in lysosomal storage disorders: Uncharted territory. *Mol Genet Metab*. 2017 Nov;122(3):10-8.
78. Abramov A, Schorr S, Wolman M. Generalized xanthomatosis with calcified adrenals. *AMA J Dis Child*. 1956 Mar;91(3):282-6.
79. Jones SA, Valayannopoulos V, Schneider E, Eckert S, Banikazemi M, Bialer M, Cederbaum S, Chan A, Dhawan A, Di Rocco M, Domm J, Enns GM, Finegold D, Gargus JJ, Guardamagna O, Hendriksz C, Mahmoud IG, Raiman J, Selim LA, Whitley CB, Zaki O, Quinn AG. Rapid progression and mortality of lysosomal acid lipase deficiency presenting in infants. *Genet Med*. 2016 May;18(5):452-8.
80. Aslanidis C, Ries S, Fehringer P, Büchler C, Klima H, Schmitz G. Genetic and biochemical evidence that CESD and Wolman disease are distinguished by residual lysosomal acid lipase activity. *Genomics*. 1996 Apr;33(1):85-93.
81. Stein J, Garty BZ, Dror Y, Fenig E, Zeigler M, Yaniv I. Successful treatment of Wolman disease by unrelated umbilical cord blood transplantation. *Eur J Pediatr*. 2007 Jul;166(7):663-6.

-
- 82.Desai PK, Astrin KH, Thung SN, Gordon RE, Short MP, Coates PM, Desnick RJ. Cholesteryl ester storage disease: pathologic changes in an affected fetus. *Am J Med Genet.* 1987 Mar;26(3):689-98.
- 83.Grabowski Ga, Charnas L, Du H. Lysosomal acid lipase deficiencies: the Wolman disease/cholesteryl ester storage disease spectrum. In: Scriver D, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Vogelstein B, Childs B, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th edn. New York, NY: McGraw-Hill; 2001.
- 84.Beaudet AL, Ferry GD, Nichols BL Jr, Rosenberg HS. Cholesterol ester storage disease: clinical, biochemical, and pathological studies. *J Pediatr.* 1977 Jun;90(6):910-4.
- 85.Edelstein RA, Filling-Katz MR, Pentchev P, Gal A, Chandra R, Shawker T, Guzzetta P, Comly M, Kaneski C, Brady RO, et al. Cholesteryl ester storage disease: a patient with massive splenomegaly and splenic abscess. *Am J Gastroenterol.* 1988 Jun;83(6):687-92.
- 86.Hill SC, Hoeg JM, Dwyer AJ, Vucich JJ, Doppman JL. CT findings in acid lipase deficiency: wolman disease and cholesteryl ester storage disease. *J Comput Assist Tomogr.* 1983 Oct;7(5):815-8.
- 87.Wolman M, Sterk Vv, Gatt S, Frenkel M. Primary familial xanthomatosis with involvement and calcification of the adrenals. Report of two more cases in siblings of a previously described infant. *Pediatrics.* 1961 Nov;28:742-57.
- 88.Boldrini R, Devito R, Biselli R, Filocamo M, Bosman C. Wolman disease and cholesteryl ester storage disease diagnosed by histological and ultrastructural examination of intestinal and liver biopsy. *Pathol Res Pract.* 2004;200(3):231-40.
- 89.Synoracki S, Kathemann S, Schmid KW, Jastrow H, Baba HA. Mangel an lysosomaler saurer Lipase (LAL-D) : Diagnostik und aktuelle Therapie einer unterdiagnostizierten Erkrankung [Lysosomal acid lipase deficiency

- (LAL-D) : Diagnostic and therapeutic options in an underdiagnosed disease]. *Pathologie*. 2018 May;39(3):249-54.
- 90.Reiner Ž, Guardamagna O, Nair D, Soran H, Hovingh K, Bertolini S, Jones S, Ćorić M, Calandra S, Hamilton J, Eagleton T, Ros E. Lysosomal acid lipase deficiency--an under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction. *Atherosclerosis*. 2014 Jul;235(1):21-30.
- 91.Konno T, Fujii M, Watanuki T, Koizumi K. Wolman's disease: the first case in Japan. *Tohoku J Exp Med*. 1966 Dec;90(4):375-89.
- 92.Röyttä M, Fagerlund AS, Toikkanen S, Salmi TT, Jorde LB, Forsius HR, Eriksson AW. Wolman disease: morphological, clinical and genetic studies on the first Scandinavian cases. *Clin Genet*. 1992 Jul;42(1):1-7.
- 93.Crocker Ac, Vawter Gf, Neuhauser Eb, Rosowsky A. WOLMAN'S disease: three new patients with a recently described lipodosis. *Pediatrics*. 1965 Apr;35:627-40.
- 94.Shome DK, Al-Jishi E, Greally JF, Malik N, Zainaldeen HA, Das NS. The Middle-East connection of Wolman Disease. *Saudi Med J*. 2002 May;23(5):597-601.
- 95.Nchimi A, Rausin L, Khamis J. Ultrasound appearance of bowel wall in Wolman's disease. *Pediatr Radiol*. 2003 Apr;33(4):284-5.
- 96.Byrd JC 3rd, Powers JM. Wolman's disease: ultrastructural evidence of lipid accumulation in central and peripheral nervous systems. *Acta Neuropathol*. 1979 Jan 12;45(1):37-42.
- 97.Kamoshita S, Landing BH. Distribution of lesions in myenteric plexus and gastrointestinal mucosa in lipidoses and other neurologic disorders of children. *Am J Clin Pathol*. 1968 Mar;49(3):312-8.

-
98. Osellame LD, Duchen MR. Quality control gone wrong: mitochondria, lysosomal storage disorders and neurodegeneration. *Br J Pharmacol.* 2014 Apr;171(8):1958-72.
 99. Guazzi GC, Martin JJ, Philippart M, Roels H, van der Eecken H, Vrints L, Delbeke MJ, Hooft C. Wolman's disease. *Eur Neurol.* 1968;1(6):334-62.
 100. Low G, Irwin GJ, Macphee GB, Robinson PH. Characteristic imaging findings in Wolman's disease. *Clinical Radiology Extra.* 2004;59(1):106-8.
 101. Sadhukhan M, Saha A, Vara R, Bhaduri B. Infant case of lysosomal acid lipase deficiency: Wolman's disease. *BMJ Case Rep.* 2014 May 15;2014:bcr2013202652.
 102. Shenoy P, Karegowda L, Sripathi S, Mohammed N. Wolman disease in an infant. *BMJ Case Rep.* 2014 Feb 12;2014:bcr2014203656.
 103. Queloz JM, Capitanio MA, Kirkpatrick JA. Wolman's disease. Roentgen observations in 3 siblings. *Radiology.* 1972 Aug;104(2):357-9.
 104. Schaub J, Janka GE, Christomanou H, Sandhoff K, Permanetter W, Hübner G, Meister P. Wolman's disease: clinical, biochemical and ultrastructural studies in an unusual case without striking adrenal calcification. *Eur J Pediatr.* 1980 Oct;135(1):45-53.
 105. Krivit W, Peters C, Dusenbery K, Ben-Yoseph Y, Ramsay NK, Wagner JE, Anderson R. Wolman disease successfully treated by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000 Sep;26(5):567-70.
 106. Rashu EB, Junker AE, Danielsen KV, Dahl E, Hamberg O, Borgwardt L, Christensen VB, Wewer Albrechtsen NJ, Gluud LL. Cholesteryl ester storage disease of clinical and genetic characterisation: A case report and review of literature. *World J Clin Cases.* 2020 May 6;8(9):1642-50.

-
107. Porto AF. Lysosomal acid lipase deficiency: diagnosis and treatment of Wolman and Cholesteryl Ester Storage Diseases. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2014 Sep;12(Suppl 1):125-32.
 108. Pisciotta L, Fresa R, Bellocchio A, Pino E, Guido V, Cantafora A, Di Rocco M, Calandra S, Bertolini S. Cholesteryl Ester Storage Disease (CESD) due to novel mutations in the LIPA gene. *Mol Genet Metab.* 2009 Jun;97(2):143-8.
 109. Sloan HR, Fredrickson DS. Enzyme deficiency in cholesteryl ester storage idisease. *J Clin Invest.* 1972 Jul;51(7):1923-6.
 110. Dincsoy HP, Rolfes DB, McGraw CA, Schubert WK. Cholesterol ester storage disease and mesenteric lipodystrophy. *Am J Clin Pathol.* 1984 Feb;81(2):263-9.
 111. Cagle PT, Ferry GD, Beaudet AL, Hawkins EP. Pulmonary hypertension in an 18-year-old girl with cholesteryl ester storage disease (CESD). *Am J Med Genet.* 1986 Aug;24(4):711-22.
 112. Bindu PS, Taly AB, Christopher R, BharatKumar PV, Panda S, Netravathi M, Ravishankar S, Mahadevan A, Yasha TC, Gayathri N. Cholesterol ester storage disease with unusual neurological manifestations in two siblings: a report from South India. *J Child Neurol.* 2007 Dec;22(12):1401-4.
 113. Roeb E, Steffen HM, Bantel H, Baumann U, Canbay A, Demir M, Drebber U, Geier A, Hampe J, Hellerbrand C, Pathil-Warth A, Schattenberg JM, Schramm C, Seitz HK, Stefan N, Tacke F, Tannapfel A, Lynen Jansen P, Bojunga J. S2k-Leitlinie nicht alkoholische Fettlebererkrankungen [S2k Guideline non-alcoholic fatty liver disease]. *Z Gastroenterol.* 2015 Jul;53(7):668-723.
 114. Stitzel NO, Fouchier SW, Sjouke B, Peloso GM, Moscoso AM, Auer PL, Goel A, Gigante B, Barnes TA, Melander O, Orho-Melander M, Duga S, Sivapalaratnam S, Nikpay M, Martinelli N, Girelli D, Jackson

- RD, Kooperberg C, Lange LA, Ardissino D, McPherson R, Farrall M, Watkins H, Reilly MP, Rader DJ, de Faire U, Schunkert H, Erdmann J, Samani NJ, Charnas L, Altshuler D, Gabriel S, Kastelein JJ, Defesche JC, Nederveen AJ, Kathiresan S, Hovingh GK; National Heart, Lung, and Blood Institute GO Exome Sequencing Project. Exome sequencing and directed clinical phenotyping diagnose cholesterol ester storage disease presenting as autosomal recessive hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Dec;33(12):2909-14.
115. Broomfield A, Jones SA, Hughes SM, Bigger BW. The impact of the immune system on the safety and efficiency of enzyme replacement therapy in lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis.* 2016 Jul;39(4):499-512.
116. Ameis D, Brockmann G, Knoblich R, Merkel M, Ostlund RE Jr, Yang JW, Coates PM, Cortner JA, Feinman SV, Greten H. A 5' splice-region mutation and a dinucleotide deletion in the lysosomal acid lipase gene in two patients with cholesteryl ester storage disease. *J Lipid Res.* 1995 Feb;36(2):241-50.
117. Iverson SA, Cairns SR, Ward CP, Fensom AH. Asymptomatic cholesteryl ester storage disease in an adult controlled with simvastatin. *Ann Clin Biochem.* 1997 Jul;34(Pt 4):433-6.
118. Hůlková H, Elleder M. Distinctive histopathological features that support a diagnosis of cholesterol ester storage disease in liver biopsy specimens. *Histopathology.* 2012 Jun;60(7):1107-13.
119. Muntoni S, Wiebusch H, Jansen-Rust M, Rust S, Seedorf U, Schulte H, Berger K, Funke H, Assmann G. Prevalence of cholesteryl ester storage disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Aug;27(8):1866-8.

120. Riva S, Spada M, Sciveres M, Minervini M, Cintonino D, Maggiore G, Gridelli B. Hepatocarcinoma in a child with cholesterol ester storage disease. *Dig Liver Dis.* 2008 Sep;40(9):784.
121. Elleder M, Ledvinová J, Cieslar P, Kuhn R. Subclinical course of cholesterol ester storage disease (CESD) diagnosed in adulthood. Report on two cases with remarks on the nature of the liver storage process. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1990;416(4):357-65.
122. Chora JR, Alves AC, Medeiros AM, Mariano C, Lobarinhas G, Guerra A, Mansilha H, Cortez-Pinto H, Bourbon M. Lysosomal acid lipase deficiency: A hidden disease among cohorts of familial hypercholesterolemia? *J Clin Lipidol.* 2017 Mar-Apr;11(2):477-84.
123. Seedorf U, Wiebusch H, Muntoni S, Christensen NC, Skovby F, Nickel V, Roskos M, Funke H, Ose L, Assmann G. A novel variant of lysosomal acid lipase (Leu336-->Pro) associated with acid lipase deficiency and cholesterol ester storage disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Jun;15(6):773-8.
124. Hooper AJ, Tran HA, Formby MR, Burnett JR. A novel missense LIPA gene mutation, N98S, in a patient with cholesteryl ester storage disease. *Clin Chim Acta.* 2008 Dec;398(1-2):152-4.
125. D'Agostino D, Bay L, Gallo G, Chamoles N. Cholesterol ester storage disease: clinical, biochemical, and pathological studies of four new cases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1988 May-Jun;7(3):446-50.
126. Di Bisceglie AM, Ishak KG, Rabin L, Hoeg JM. Cholesteryl ester storage disease: hepatopathology and effects of therapy with lovastatin. *Hepatology.* 1990 May;11(5):764-72.
127. Hoeg JM, Demosky SJ Jr, Pescovitz OH, Brewer HB Jr. Cholesteryl ester storage disease and Wolman disease: phenotypic variants of

-
- lysosomal acid cholesteryl ester hydrolase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1984 Nov;36(6):1190-203.
128. McCoy E, Yokoyama S. Treatment of cholesteryl ester storage disease with combined cholestyramine and lovastatin. *Ann N Y Acad Sci.* 1991;623:453-4.
129. Gramatges MM, Dvorak CC, Regula DP, Enns GM, Weinberg K, Agarwal R. Pathological evidence of Wolman's disease following hematopoietic stem cell transplantation despite correction of lysosomal acid lipase activity. *Bone Marrow Transplant.* 2009 Oct;44(7):449-50.
130. Longhi R, Vergani C, Valsasina R, Riva E, Galluzzo C, Agostoni C, Giovannini M. Cholesteryl ester storage disease: risk factors for atherosclerosis in a 15-year-old boy. *J Inherit Metab Dis.* 1988;11 9Suppl 20:143-5.
131. Kuloglu Z, Kansu A, Selbuz S, Kalaycı AG, Şahin G, Kirsaclioglu CT, Demirören K, Dalgıç B, Kasırga E, Önal Z, İşlek A; National LAL-D Study Group. The Frequency of Lysosomal Acid Lipase Deficiency in Children With Unexplained Liver Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2019 Mar;68(3):371-6.
132. Wierzbicka-Rucińska A, Jańczyk W, Ługowska A, Lebensztejn D, Socha P. Diagnostic and therapeutic management of children with lysosomal acid lipase deficiency (LAL-D). Review of the literature and own experience. *Dev Period Med.* 2016;20(3):212-5.
133. Schiff L, Schubert WK, McAdams AJ, Spiegel EL, O'Donnell JF. Hepatic cholesterol ester storage disease, a familial disorder. I. Clinical aspects. *Am J Med.* 1968 Apr;44(4):538-46.
134. Tylki-Szymanska A, Maciejko D, Wozniewicz B, Muszynska B. Two cases of cholesteryl ester storage disease (CESD) acid lipase deficiency. *Hepatogastroenterology.* 1987 Jun;34(3):98-9.

-
135. Burton BK, Balwani M, Feillet F, Barić I, Burrow TA, Camarena Grande C, Coker M, Consuelo-Sánchez A, Deegan P, Di Rocco M, Enns GM, Erbe R, Ezgu F, Ficicioglu C, Furuya KN, Kane J, Laukaitis C, Mengel E, Neilan EG, Nightingale S, Peters H, Scarpa M, Schwab KO, Smolka V, Valayannopoulos V, Wood M, Goodman Z, Yang Y, Eckert S, Rojas-Caro S, Quinn AG. A Phase 3 Trial of Sebelipase Alfa in Lysosomal Acid Lipase Deficiency. *N Engl Med.* 2015 Sep 10;373(11):1010-20.
 136. Crawford JM. Basic mechanisms in hepatopathology. In: Burt AD, Portmann BC, Ferrell LD, editors. *MacSween's Pathology of the Liver.* 6th ed. London: Churchill Livingstone: Elsevier; 2007. p.75-118.
 137. Du H, Duanmu M, Witte D, Grabowski GA. Targeted disruption of the mouse lysosomal acid lipase gene: long-term survival with massive cholesteryl ester and triglyceride storage. *Hum Mol Genet.* 1998 Sep;7(9):1347-54.
 138. Su K, Donaldson E, Sharma R. Novel treatment options for lysosomal acid lipase deficiency: critical appraisal of sebelipase alfa. *Appl Clin Genet.* 2016 Oct 17;9:157-67.
 139. Pronicki M. Wilson disease - liver pathology. *Handb Clin Neurol.* 2017;142:71-5.
 140. Zhou H, Fischer HP. Hereditäre Hämochromatose, Alpha-1-Antitrypsin-Mangel und Morbus Wilson: Pathogenese, Klinik und Wege zur Diagnose [Hereditary hemochromatosis, alpha-1-antitrypsin deficiency and Wilson's disease. Pathogenesis, clinical findings and pathways to diagnosis]. *Pathologe.* 2008 Feb;29(1):73-83.
 141. Krivit W, Peters C, Dusenbery K, Ben-Yoseph Y, Ramsay NK, Wagner JE, Anderson R. Wolman disease successfully treated by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000 Sep;26(5):567-70.

-
142. Frampton JE. Sebelipase Alfa: A Review in Lysosomal Acid Lipase Deficiency. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2016 Dec;16(6):461-8.
 143. Poznansky MJ, Hutchison SK, Davis PJ. Enzyme replacement therapy in fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease. *FASEB J*. 1989 Feb;3(2):152-6.
 144. Erwin AL. The role of sebelipase alfa in the treatment of lysosomal acid lipase deficiency. *Therap Adv Gastroenterol*. 2017 Jul;10(7):553-62.
 145. Bernstein AL, Lobritto S, Iuga A, Remotti H, Schiano T, Fiel MI, Balwani M. Lysosomal acid lipase deficiency allograft recurrence and liver failure- clinical outcomes of 18 liver transplantatio patients. *Mol Genet Metabol*.2018 May;124(1):11-19
 146. Gramatges MM, Dvorak CC, Regula DP, Enns GM, Weinberg K, Agarwal R. Pathological evidence of Wolman's disease following hematopoietic stem cell transplantation despite correction of lysosomal acid lipase activity. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Oct;44(7):449-50.
 147. Hamilton J, Jones I, Srivastava R, Galloway P. A new method for the measurement of lysosomal acid lipase in dried blood spots using the inhibitor Lalistat 2. *Clin Chim Acta*. 2012 Aug 16;413(15-16):1207-10.
 148. Tolar J, Petryk A, Khan K, Bjoraker KJ, Jessurun J, Dolan M, Kivisto T, Charnas L, Shapiro EG, Orchard PJ. Long-term metabolic, endocrine, and neuropsychological outcome of hematopoietic cell transplantation for Wolman disease. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Jan;43(1):21-7.
 149. ABraOM: Brazilian genomic variants. Available from: <https://abraom.ib.usp.br>
 150. Genome Aggregation Database. Available from: <https://gnomad.broadinstitute.org/>

-
151. The human protein atlas. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000107798-LIPA/celltype>
 152. Cholesteryl Ester Storage Disease; CESD. Available from: <https://www.omim.org/entry/278000>
 153. Wilson DP, Patni N. Lysosomal Acid Lipase Deficiency. 2023 Mar 15. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, de Herder WW, Dhatariya K, Dungan K, Hofland J, Kalra S, Kaltsas G, Kapoor N, Koch C, Kopp P, Korbonits M, Kovacs CS, Kuohung W, Laferrère B, Levy M, McGee EA, McLachlan R, New M, Purnell J, Sahay R, Shah AS, Singer F, Sperling MA, Stratakis CA, Trencé DL, Wilson DP, editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc.; 2000.
 154. Benevides GN, Miura IK, Person NC, Pugliese RPS, Danesi VLB, Lima FR, Porta G. Lysosomal acid lipase deficiency in Brazilian children: a case series. *J Pediatr (Rio J)*. 2019 Sep-Oct;95(5):552-8.
 155. Pastores GM, Hughes DA. Lysosomal Acid Lipase Deficiency: Therapeutic Options. *Drug Des Devel Ther*. 2020 Feb 11;14:591-601.
 156. Ezgü F. Safety of sebelipase alfa for the treatment of lysosomal acid lipase deficiency. *Expert Opin Drug Saf*. 2022 Feb;21(2):149-55.
 157. Korbélius M, Kuentzel KB, Bradić I, Vujić N, Kratky D. Recent insights into lysosomal acid lipase deficiency. *Trends Mol Med*. 2023 Jun;29(6):425-38.
 158. Li F, Zhang H. Lysosomal Acid Lipase in Lipid Metabolism and Beyond. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019 May;39(5):850-6.
 159. Suarez-Zamora DA, Rojas-Rojas MM, Ordoñez-Guerrero F, Mugnier-Quijano J, Lopez-Panqueva R. Pediatric patients with lysosomal acid lipase deficiency. *Rev Esp Patol*. 2023 Apr-Jun;56(2):113-8.