

Protocolo

Prevalência da mutação do gene ABCB4 em doentes com colelitíase sintomática antes dos 30 anos de idade

a. Resumo

A síndrome *Low phospholipid-associated cholestasis and cholelithiasis* (LPAC) caracteriza-se por um quadro de colelitíase sintomática recorrente em adultos jovens. Está associado a mutações do gene ABCB4/MDR3, que codifica uma proteína que atua como transportador biliar de fosfolípidos. Defeitos na codificação desta proteína diminuem a concentração biliar de fosfolípidos, aumentando assim a litogenicidade da bÍlis. A definição desta entidade não é consensual mas a maioria dos autores defende que o diagnóstico de LPAC deve ser considerado quando pelo menos duas das seguintes características estão presentes: início dos sintomas antes dos 40 anos de idade; recorrência de sintomas biliares após colecistectomia; presença de focos ecogénicos hepáticos sugestivos de litíase intra-hepática ou lama biliar; história de colestase intra-hepática da gravidez e história familiar de cálculos biliares em parentes de 1º grau. No decurso da doença está descrita a ocorrência de fibrose biliar e cirrose. A resposta clínica à terapêutica com ácido ursodesoxicólico (UDCA) é também característica desta síndrome, tendo-se mostrado eficaz não só na prevenção de recorrências mas também na prevenção de complicações agudas e crónicas da colelitíase. Visto tratar-se de uma doença subdiagnosticada, a sua prevalência permanece desconhecida, embora alguns estudos estimem que representa cerca de 5% dos doentes com colelitíase sintomática. Apesar da maioria dos estudos utilizar os 40 anos como idade limite, alguns autores sugerem que o aparecimento de sintomas antes dos 30 anos parece ser o melhor limiar para distinguir os doentes com LPAC dos doentes com litíase não associada a mutação ABCB4.

Pretendemos com este estudo prospectivo transversal multicêntrico avaliar a prevalência da mutação do gene ABCB4/MDR3 em doentes com história de colelitíase sintomática antes dos 30 anos de idade.

b. Investigadores

Catarina Gouveia¹

Joana Nunes¹

Alexandre Ferreira¹

Marília Cravo¹

1- Serviço de Gastrenterologia do Hospital Beatriz Ângelo

c. Fundamentação e racional

O síndrome *Low phospholipid-associated cholestasis and cholelithiasis* (LPAC) caracteriza-se por um quadro de colelitíase sintomática recorrente em adultos jovens. A sua prevalência permanece desconhecida, embora alguns autores estimem que representa cerca de 5% dos doentes com colelitíase sintomática.¹

O síndrome LPAC encontra-se associado a mutações do gene ABCB4/MDR3, que codifica uma proteína da família *ATP-binding cassette*, que actua como transportador de fosfatidilcolina através da membrana canalicular para a bÍlis. Defeitos na codificação desta proteína diminuem a concentração biliar deste fosfolípido, aumentando assim a litogenicidade da bÍlis pela consequente supersaturação de cristais de colesterol. Além disso, a diminuição da concentração biliar de fosfolípidos aumenta a quantidade de ácidos biliares livres que atuam como potentes detergentes, levando a lesão do epitélio biliar e colestase com aumento da gamaglutamiltranspeptidase (GGT).² Alguns autores estimam que a prevalência da mutação do gene ABCB4 em doentes com critérios de LPAC é de 50%.³

A definição desta entidade diagnóstica não é consensual mas a maioria dos autores defende que o diagnóstico de LPAC deve ser suspeitado quando pelo menos duas das seguintes características estão presentes:^{4,5}

- Início dos sintomas ocorre antes dos 40 anos de idade;
- Recorrência de sintomas biliares (cólica biliar, icterícia, colangite, pancreatite aguda) após colecistectomia;

- Presença de focos ecogénicos hepáticos sugestivos de litíase intra-hepática ou lama biliar;
- História de colestase intra-hepática da gravidez;
- História familiar de cálculos biliares em parentes de 1º grau.

A presença de litíase intra-hepática pode ser evidenciada através de ecografia, TC abdominal ou colangiopancreatografia por ressonância magnética, no entanto requer um operador experiente e alerta para pesquisa deste achado em particular.

Apesar de a maioria dos doentes com síndrome LPAC apresentar o início dos sintomas antes dos 40 anos de idade, é o aparecimento de sintomas antes dos 30 anos que parece ser o melhor limiar para distinguir os doentes com LPAC dos doentes com litíase não associada a mutação ABCB4. Com efeito, esta última é diagnosticada em até 1/3 dos casos antes dos 40 anos, mas muito raramente, na ausência de obesidade, antes dos 30 anos.⁶

Ao contrário da litíase associada ao síndrome LPAC, a litíase não associada a mutação do gene ABCB4 está associada a factores de risco bem definidos como a obesidade, dislipidémia, diabetes mellitus, sedentarismo, manifestando-se na maioria dos casos após os 50 anos de idade e estando associada ao quadro clínico de colecistite aguda.⁶

A resposta clínica à terapêutica com ácido ursodesoxicólico (UDCA) é também característica desta síndrome. Sem tratamento a evolução clínica destes doentes pode ser grave, com episódios recorrentes de colangite, icterícia, pancreatite aguda e cirrose biliar, tendo sido também observados casos de colangiocarcinoma. A terapêutica com UDCA oral tendo-se mostrado eficaz não só na prevenção de recorrências mas também na prevenção das complicações agudas e crónicas.

d. Objectivos

i. Objectivo primário

1. Avaliar a prevalência da mutação do gene ABCB4/MRD3 em doentes com história de colelitíase sintomática antes dos 30 anos de idade

ii. Objetivos secundários

1. Avaliar a relação entre a presença de mutação ABCB4 e características clínicas e imagiológicas como:
 - i. Idade de início de sintomas
 - ii. Sexo
 - iii. Presença de complicações agudas de colelitíase (colangite aguda, pancreatite biliar, colecistite aguda)
 - iv. Presença de focos ecogénicos hepáticos sugestivos de litíase intra-hepática ou lama biliar
 - v. Prevalência de alterações de provas hepáticas
 - vi. Resposta à terapêutica com ácido ursodesoxicólico
2. Avaliar a relação entre presença de mutação ABCB4/MRD3 e antecedentes de colestase intra-hepática da gravidez com ou sem complicações fetais (prematuridade, sofrimento fetal)
3. Avaliar a prevalência de doentes com início de sintomas após início de terapêutica com anticoncepcionais orais
4. Avaliar a relação entre o tipo de mutação e características clínicas da doença

e. Métodos

i. Desenho de estudo

1. Tipo de estudo - prospectivo, multicêntrico, transversal
2. Instituições envolvidas
Hospital Beatriz Ângelo
Contacto: catarina.fgouveia@hbeatrizangelo.pt

ii. População

1. Critérios de inclusão

- i. Doentes com colelitíase sintomática antes dos 30 anos de idade

2. Critérios de exclusão

- ii. Doenças hepáticas colestáticas (CBP, CEP, D.Caroli, fibrose hepática congénita, doença de Osler–Weber–Rendu, fibrose quística, porfíria)
- iii. Cirrose hepática de qualquer etiologia
- iv. Infecção biliar parasitária, hemólise, síndrome de malabsorção, incluindo ressecção ileal
- v. História de colestase intra-hepática familiar
- vi. Doentes sob nutrição parentérica total, análogos da somatostatina, terapêutica com hipocolesterolémicos ou outros fármacos potencialmente hepatotóxicos
- vii. Doentes com consumo de >40g/dia de álcool (30g/dia nas mulheres) ou serologias positivas para HIV, vírus da hepatite B e vírus da hepatite C.

3. Cálculo da amostra

Considerando a incerteza atual sobre a prevalência da mutação do gene ABCB4/MRD3 na população em estudo e usando uma estimativa conservadora de 30%, calculamos que é necessário uma amostra de 91 doentes para um intervalo de confiança de 95% (0,2-0,4) quando a proporção da amostra é de 0,300.

iii. Variáveis e timing da colheita

1. Admissão

- Sexo
- Idade
- Peso
- Manifestação clínica de litíase
- Idade de início dos sintomas

- Colecistectomia prévia
- Presença de complicações biliares
- História de colestase intra-hepática da gravidez
- História de familiares em 1º grau com litíase sintomática
- Terapêutica prévia com UDCA
- Resposta a terapêutica prévia com UDCA

2. No decorrer do estudo

- **Avaliação analítica**
 - Pesquisa de mutação do gene ABCB4, que será realizada através da sequenciação do DNA pelo método de Sanger de todo o gene ABCB4 (local – Genética Médica e Diagnóstico Pré-Natal Professor Doutor Sérgio Castedo, Porto)
 - Hb (g/dL)
 - Leucócitos (/uL) e neutrófilos (%)
 - Plaquetas (/uL)
 - INR e aPTT (seg)
 - Albumina (g/dL)
 - Bilirrubina total e conjugada (mg/dL)
 - AST e ALT (U/L)
 - FA e GGT (U/L)
 - Ac anti-mitochondriais (AMA), ac anti-nucleares (ANA) e ac anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA)
 - Electroforese das proteínas
- **Métodos complementares de diagnóstico**
 - Ecografia abdominal focada na avaliação de presença de focos ecogénicos intra-hepáticos, sludge ou microlitíase
 - CPRM

f. Limitações e Resultados Esperados

Com este estudo esperamos estimar com maior precisão a prevalência da mutação do gene ABCB4/MRD3 em doentes com litíase sintomática, bem como aprofundar o conhecimento sobre a especificidade das características clínicas da síndrome LPAC.

A população em estudo (doentes com litíase sintomática e idade < 30 anos) foi escolhida uma vez que este parece ser o melhor limiar etário para distinguir doentes com LPAC dos doentes com litíase não associada a mutação ABCB4.

O cálculo da amostra foi baseado em dados escassos e com grande variabilidade (1-50%). Desta forma a prevalência foi estimada de forma conservadora em 30% considerando que na população com idade < 30 deve ser pelo menos tão frequente como para idade <40. Esta estimativa permite ter uma precisão razoável para avaliação da prevalência, mesmo que esta seja superior.

A realização de um estudo transversal parece-nos o mais adequado pela capacidade de avaliar características clínicas. Com este estudo iremos conseguir identificar os doentes com esta mutação, pelo que haverá a hipótese de constituir coortes para estudos futuros.

g. Considerações Éticas

A pesquisa de mutações genéticas tem subjacente implicações éticas quer durante a fase de recolha de dados e realização dos testes laboratoriais, quer durante a fase de tratamento da informação. Durante todo o estudo deverá ser assegurada a confidencialidade e proteção dos dados, devendo o doente estar informado da finalidade e da possibilidade de acesso aos mesmos. Todos os doentes incluídos no estudo deverão assinar um consentimento informado. No caso do presente estudo a pesquisa da mutação genética terá não só interesse académico como, e principalmente, interesse clínico, uma vez que os doentes com teste positivo terão benefício em realizar tratamento crónico com ácido ursodesoxicólico.

h. Referências bibliográficas

1. Erlinger S. Low phospholipid- associated cholestasis and cholelithiasis. Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology (2012) 36, S36—S40
2. Michael Trauner, M.D.,¹ Peter Fickert, M.D.,¹ and Martin Wagner, M.D.¹. MDR3 (ABCB4) Defects: A Paradigm for the Genetics of Adult Cholestatic Syndromes. Seminars in liver disease 2007; 27:1.
3. Davit-Spraul A, Gonzales E, Baussan C, Jacquemin E. The Spectrum of Liver Diseases Related to ABCB4 Gene Mutations: Pathophysiology and Clinical Aspects. 2010, Seminars in liver disease; 30:2.
4. Rosmorduc O, Hermelin B, Poupon R. MDR3 gene defect in adults with symptomatic intrahepatic and gallbladder cholesterol cholelithiasis. Gastroenterology 2001;120:1459- 67.
5. Rosmorduc O, Poupon R. Low phospholipid associated cholelithiasis: association with mutation in the MDR3/ABCB4 gene. Orphanet J Rare Dis 2007;29:29.
6. Condat B. Le syndrome LPAC (Low Phospholipid-Associated Cholelithiasis):mythe ou réalité?. POST'U. 2016