



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

**Doença de Pompe**  
**A propósito de 2 casos clínicos do Hospital Pêro da**  
**Covilhã**

**Ana Patrícia Gonçalves Sousa e Silva**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Medicina**  
(ciclo de estudos integrado)

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Doutora Luíza Constante Rosado

**Covilhã, Maio de 2012**



## **Dedicatória**

Dedico este trabalho em especial à minha mãe, Eugénia, por todo o apoio incondicional e inesgotável prestado ao longo de toda a minha formação académica e por todas as privações que fez. Sem ela nada disto teria sido possível.



## Agradecimentos

Gostaria de apresentar os meus mais sinceros agradecimentos à minha orientadora, a Prof. Doutora Luíza Rosado, pela disponibilidade, acompanhamento e dedicação demonstradas na elaboração deste trabalho.

Aos meus avós, João e Florentina, o meu obrigado pela contínua preocupação e apoio.

À Bárbara agradeço o apoio e a motivação nos momentos mais difíceis.

Ao Pedro, o meu obrigado pelo apoio, paciência e carinho que me dedicou ao longo destes últimos anos de formação.



## Resumo

A Doença de Pompe também conhecida como doença de armazenamento do glicogénio tipo II ou deficiência de maltase ácida, pertence a um grupo de doenças lisossomais de sobrecarga, sendo esta a forma mais grave do grupo. Trata-se de uma doença hereditária autossómica recessiva causada por mutações no gene que codifica a  $\alpha$ -glicosidase ácida, determinando acumulação lisossomal de glicogénio. A doença de Pompe apresenta-se com um amplo espectro de manifestações clínicas e os sintomas iniciais podem surgir em qualquer idade.

Previamente à aprovação, no ano 2006, da terapêutica de reposição enzimática com  $\alpha$ -glicosidase ácida recombinante, não existia nenhum tratamento específico para a doença de Pompe. A terapêutica de reposição enzimática revelou-se eficaz e capaz de alterar a história natural da doença, dando uma nova esperança a estes doentes.

Este trabalho tem como objetivo rever o estado da arte da Doença de Pompe em Portugal, com especial ênfase à forma tardia desta doença. São abordadas as formas de apresentação, patogénese, métodos de diagnósticos, bem como as atuais recomendações terapêuticas. Para tal é levada a cabo uma revisão da literatura científica mais recentemente publicada e relevante, acerca da doença em estudo. Este trabalho contempla ainda a apresentação e discussão de dois casos clínicos de doentes com a forma tardia da doença de Pompe, acompanhados no Hospital Pêro da Covilhã (Centro Hospitalar Cova da Beira).

## Palavras-chave

Doença de armazenamento do glicogénio tipo II, deficiência de  $\alpha$ -glicosidase ácida, doença de Pompe de início tardio, terapêutica de reposição enzimática para doença de Pompe.



## Abstract

Pompe disease, also known as glycogen storage disease type II or acid maltase deficiency, belongs to a group of lysosomal storage disorders, this being the most severe form of the group. It is an autosomal recessive disease caused by mutations in the gene encoding the lysosomal enzyme acid  $\alpha$ -glucosidase, leading to lysosomal glycogen storage. Pompe's disease has a broad spectrum of clinical manifestations, whose initial symptoms can appear at any age.

There was no disease-specific treatment for Pompe disease until the approval, in 2006, of the enzyme replacement therapy with recombinant human acid  $\alpha$ -glucosidase. This enzyme replacement therapy is effective in modifying the natural course of the disease and gave a new hope to Pompe patients.

The present work intends to review the state of the art of Pompe disease in Portugal, with particular emphasis on the late-onset disease. It is discussed the clinical presentation, pathogenesis, diagnosis methods and current treatment recommendations of this disease. In order to achieve this, a review of the latest published and relevant scientific literature is performed. This paper also includes the presentation and discussion of two patients with late-onset Pompe disease, followed at *Hospital Pêro da Covilhã (Centro Hospitalar Cova da Beira)*.

## Keywords

Glycogen storage disease type II, acid alpha-glucosidase deficiency, late-onset Pompe disease, Pompe disease enzyme replacement therapy.



# Índice

Dedicatória	iii
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de figuras	xiii
Lista de tabelas	xv
Lista de gráficos	xvii
Lista de acrónimos	xix
1- Doença de Pompe	1
1.1- Perspetiva Histórica	1
1.2- Epidemiologia	3
1.3- Etiologia	4
1.3.1- Correlação genótipo fenótipo	5
1.4- Fisiopatologia	7
1.5- Histopatologia	8
1.6- Manifestações clínicas	11
1.6.1- Manifestações clínicas da apresentação clássica	11
1.6.2- Manifestações clínicas da apresentação tardia	12
1.7- Diagnóstico	14
1.7.1- Análise enzimática	18
1.7.1.1- Determinação da atividade enzimática	18
1.7.1.2- Quantificação da proteína $\alpha$ -glicosidase ácida	23
1.7.2- Análise genética	24
1.7.3- Futuras ferramentas diagnósticas	25
1.8- Diagnóstico Diferencial	27
1.9- Avaliação pré-TRE	30
1.9.1- Avaliação pré-TRE do doente de Pompe infantil	32
1.9.2- Avaliação pré-TRE do doente de Pompe tardia	34

## Doença de Pompe: A propósito de 2 casos clínicos do Hospital Pêro da Covilhã

1.10 Tratamento .....	35
1.10.1- Terapêutica de reposição enzimática .....	37
1.10.2- Perspetivas para o futuro no tratamento .....	43
1.11- Prognóstico .....	44
1.12- Acompanhamento do doente .....	44
2- Estudo de casos clínicos .....	47
2.1- Apresentação dos casos clínicos .....	47
2.2- Discussão dos casos clínicos .....	55
3- Conclusão .....	59
4- Referências Bibliográficas .....	61

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.1</b> - Produção de $\alpha$ -glicosidase alfa através de tecnologia de DNA recombinante a partir de cultura de células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) e de leite de fêmeas de coelho .....	2
<b>Figura 1.2</b> - Fisiopatologia da Doença de Pompe. GAA: $\alpha$ -glicosidase ácida; UDP: uridina difosfato .....	8
<b>Figura 1.3</b> - Biópsia muscular de doente de Pompe tardia .....	9
<b>Figura 1.4</b> - Alterações histológicas progressivas no músculo-esquelético de doentes de Pompe infantil e do adulto .....	10
<b>Figura 1.5</b> - Modelo da maturação da enzima $\alpha$ -glicosidase ácida .....	23
<b>Figura 1.6</b> - RM de corpo inteiro de doente de Pompe .....	25
<b>Figura 1.7</b> - Microfotografias de esfregaços de sangue de doentes de Pompe e um indivíduo normal de controlo .....	27
<b>Figura 1.8</b> - Biópsias musculares do vasto lateral de dois doentes com doença de Pompe, antes e após o início da TRE .....	38



## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.1</b> - Incidência da doença de Pompe em diferentes populações .....	3
<b>Tabela 1.2</b> - Testes secundários para suportar o diagnóstico de doença de Pompe ...	17
<b>Tabela 1.3</b> - Vantagens e desvantagens das amostras onde pode ser determinada a atividade da $\alpha$ -glicosidase ácida .....	21
<b>Tabela 1.4</b> - Diagnóstico diferencial da doença de Pompe infantil .....	28
<b>Tabela 1.5</b> - Diagnóstico diferencial da doença de Pompe do adulto .....	29
<b>Tabela 1.6</b> - Avaliação complementar do doente de Pompe prévia à TRE .....	31
<b>Tabela 1.7</b> - Recomendações da AANEM para a TRE em doente com a forma tardia da doença de Pompe, dependendo do estadió e severidade da doença .....	40
<b>Tabela 2.1</b> - Resultado obtido no estudo bioquímico lisossomal em amostra de leucócitos de sangue total do doente #1 .....	48
<b>Tabela 2.2</b> - Resultado obtido no estudo bioquímico lisossomal em amostra de cultura de fibroblastos cutâneos do doente #1 .....	48
<b>Tabela 2.3</b> - Valores enzimáticos à data de início do tratamento de reposição enzimática .....	49
<b>Tabela 2.4</b> - Avaliação da força muscular segmentar da doente #1 com a Escala MRC (ao início da TRE) .....	50
<b>Tabela 2.5</b> - Valores obtidos na pesquisa de anticorpos (doente #1) .....	50
<b>Tabela 2.6</b> - Avaliação da força muscular segmentar da doente #1 com a Escala MRC (reavaliação após 16 meses de TRE) .....	51
<b>Tabela 2.7</b> - Resultado obtido no estudo bioquímico lisossomal em amostra de leucócitos de sangue total da doente #2 .....	52
<b>Tabela 2.8</b> - Valores enzimáticos à data de início da TRE de reposição enzimática ..	53
<b>Tabela 2.9</b> - Valores obtidos na pesquisa de anticorpos (início da TRE) .....	53
<b>Tabela 2.10</b> - Avaliação da força muscular segmentar da doente #2 com a Escala MRC (prévia ao início da TRE) .....	54
<b>Tabela 2.11</b> - Valores obtidos na pesquisa de anticorpos (após 4 meses de TRE) .....	54
<b>Tabela 2.12</b> - Avaliação da força muscular segmentar da doente #2 com a Escala MRC (após 7 meses de TRE) .....	55
<b>Tabela 2.13</b> - Comparação sumária dos dois casos clínicos .....	57



## Lista de Gráficos

<b>Gráficos 1.1 e 1.2</b> - Frequência das mutações patogénicas no gene da $\alpha$ -glicosidase ácida .....	5
<b>Gráfico 1.3</b> - Modelo demonstrando que os sinais da doença de Pompe surgem quando a atividade da $\alpha$ -glicosidase ácida diminui para <30% que a atividade normal .....	6
<b>Gráfico 1.4</b> - Atraso diagnóstico em doentes com a forma tardia da doença de Pompe .....	15
<b>Gráfico 1.5</b> - Tempo de sobrevivência de 268 adultos com doença de Pompe não submetidos a TRE .....	35



## Lista de Acrónimos

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
AANEM	<i>American Association of Neuromuscular &amp; Electrodiagnostic Medicine</i>
CVF	Capacidade vital forçada
CK	Creatina fosfoquinase
CRIM	<i>Cross reactive immunologic material</i>
EMG	Eletromiografia
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Glc <sub>4</sub>	Tetrassacarídeo urinário
Hex <sub>4</sub>	Hexassacarídeo urinário
LDH	Lactato desidrogenase
MGA	Maltase glucoamilase
MRC	<i>Medical Research Council</i>
M6P	Recetor manose-6-fostato
PEDI-Pompe	<i>Pediatric Evaluation of Disability inventory for Pompe Disease</i>
RANU	Rastreio auditivo neonatal universal
rhGAA	$\alpha$ -glicosidase ácida recombinante humana/ $\alpha$ -glucosidase- $\alpha$
TRE	Terapêutica de reposição enzimática
VNI	Ventilação não invasiva
$\gamma$ -GT	$\gamma$ -glutamilttransferase
4-MUG	4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo



# Capítulo 1

## Doença de Pompe

A Doença de Pompe é uma glicogenose generalizada ou doença do armazenamento do glicogénio tipo 2, que se caracteriza pelo armazenamento intra-lisossomal inadequado do glicogénio devido à deficiência de uma enzima, chave da via de degradação intra-lisossomal do glicogénio - a  $\alpha$ -glicosidase ácida. Esta doença é também classificada como uma miopatia metabólica, uma vez que a alteração fisiopatológica que lhe está subjacente é mais evidente ao nível do músculo esquelético, determinando um quadro clínico com predomínio de fraqueza muscular proximal progressiva.<sup>1,2</sup>

É uma doença pan-étnica de transmissão autossómica recessiva, que apresenta um espectro clínico muito variável e cujos sintomas podem manifestar-se em qualquer idade. No entanto de acordo com a idade de apresentação, podem distinguir-se duas formas clínicas da doença: a forma infantil ou de apresentação clássica, que ocorre em doentes até ao primeiro ano de vida; e a forma tardia ou de apresentação não clássica, que ocorre em doentes com mais de 1 ano de idade.

A doença de Pompe infantil pode apresentar-se logo no momento do nascimento ou mais frequentemente nos primeiros 4 meses de vida. É a forma mais severa da doença, caracterizando-se por miocardiopatia, hipotonia, fraqueza muscular generalizada de rápida progressão e de predomínio proximal acabando inevitavelmente por culminar em morte por disfunção cardiorrespiratória, antes do primeiro ano de vida. Por outro lado, a doença de Pompe de início tardio, contempla os bebés com mais de 1 ano de idade, crianças, jovens e adultos. Esta caracteriza-se pelo predominante envolvimento muscular esquelético, que determina principalmente fraqueza muscular proximal progressiva e insuficiência respiratória.<sup>3,4</sup>

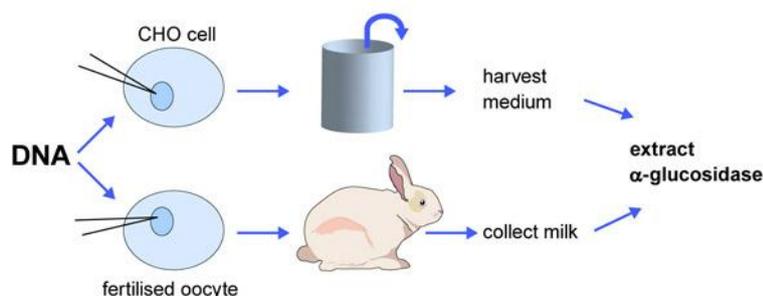
### 1.1 - Perspetiva Histórica da doença de Pompe

A doença de Pompe foi descrita pela primeira vez em 1932 pelo Patologista holandês J. C. Pompe, numa menina de 7 meses de idade que morreu subitamente devido a hipertrofia miocárdica idiopática. À autópsia, Pompe verificou que existia acumulação de grandes quantidades de glicogénio dentro de vesículas membranosas no seio das fibras musculares cardíacas bem como em praticamente todos os tecidos.<sup>5</sup> Alguns anos depois, com a descoberta das vias do metabolismo do glicogénio e a definição do lisossoma como organelo

celular, foi determinada a base metabólica da doença de Pompe. Com base nestes novos conhecimentos, Hers e seus colaboradores deduziram a ligação entre a deposição do glicogénio nos doentes de Pompe e a deficiência hereditária da enzima  $\alpha$ -glicosidase-ácida.<sup>6</sup>

A partir de 1967 começaram a ser testadas as primeiras terapêuticas para a doença de Pompe, nomeadamente a utilização de preparações da enzima derivadas do *Aspergillus niger* e de placenta humana, não tendo nenhuma delas sido bem sucedida. Mais tarde reconheceu-se a necessidade da existência de recetores específicos para haver captação de enzimas lisossomais exógenas, nomeadamente do recetor manose-6-fosfato (M6P) no caso do músculo e fígado. Esta descoberta proporcionou assim novas oportunidades de investigação na área do tratamento da doença de Pompe.<sup>7,8</sup>

Na década de 90 começaram a ser produzidas através de técnicas de DNA recombinante, duas formas diferentes de  $\alpha$ -glicosidase ácida contendo M6P para posterior uso humano. Uma das formas enzimáticas era obtida a partir de leite de fêmeas de coelho transgénico e outra a partir de cultura de células ováricas de hamsters de laboratório. Estas duas moléculas entraram na fase I de ensaio clínico em 1998 e 1999 respetivamente tendo demonstrado características farmacodinâmicas e resultados clínicos muito semelhantes. No entanto, no ano 2000 foi descontinuado o desenvolvimento da terapêutica de reposição enzimática (TRE) com  $\alpha$ -glicosidase-ácida recombinante para uso humano - Alglucosidase alfa - a partir de leite de fêmeas de coelho, tendo-se continuado a investigação e produção desta enzima através da cultura das células ováricas dos hamsters.<sup>9</sup>



**Figura 1.1** - Produção de alglucosidase alfa através de tecnologia de DNA recombinante a partir de cultura de células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) e de leite de fêmeas de coelho (a partir de Pompe Center, 2012).<sup>10</sup>

Com base nos resultados positivos obtidos num primeiro ensaio clínico com 18 doentes de Pompe infantil submetidos a esta nova terapêutica, a *Food and Drug Administration* (FDA) e a *European Medicines Agency* (EMA) aprovaram no ano 2006 o uso da TRE com alglucosidase- $\alpha$  para a doença de Pompe infantil. Esta doença tornou-se assim a primeira miopatia metabólica hereditária com tratamento disponível, tendo-se alterado definitivamente a história natural da doença, especialmente a da forma infantil.

Em 2010, com a publicação dos resultados do estudo LOTS, o primeiro estudo de TRE randomizado, duplo cego, controlado com placebo, a FDA aprovou em 2011 outra forma de

alglucosidase- $\alpha$  indicada para doentes com mais de 8 anos de idade e que não apresentem envolvimento cardíaco, ou seja, é uma enzima mais específica para o tratamento da forma tardia da doença de Pompe.<sup>11,12,13,14</sup>

## 1.2 - Epidemiologia da doença de Pompe

A doença de Pompe é considerada uma doença rara, definida na Europa como uma doença que afeta menos que 5 em 10,000 indivíduos e nos EUA como uma doença que afeta menos que 200,000 indivíduos.<sup>12</sup>

Uma vez que se trata de uma doença rara, muitas vezes subdiagnosticada e também pelo facto da sua incidência apresentar uma variação que depende em parte da etnia do doente, desconhece-se com exatidão a incidência individual ou combinada de ambas as formas clínicas da doença. No entanto, estima-se que esta incidência combinada seja de aproximadamente 1:40,000.

Em Portugal, no ano de 2004 estimou-se uma incidência combinada da doença de 1:600,000.<sup>15,16</sup>

**Tabela 1.1** - Incidência da doença de Pompe em diferentes populações (adaptado de Tinkle e Leslie, 2010).<sup>16</sup>

População	Incidência
Afro-americanos	1:14,000
	1:40,000 (combinada)
Holanda	1:138,000 (infantil)
	1:57,000 (tardia)
EUA	1:40,000 (combinada)
Sul da China/Tailândia	1:50,000
Europeus	1:100,000 (infantil)
	1:60,000 (tardia)
Austrália	1:145,000
Portugal	1:600,000

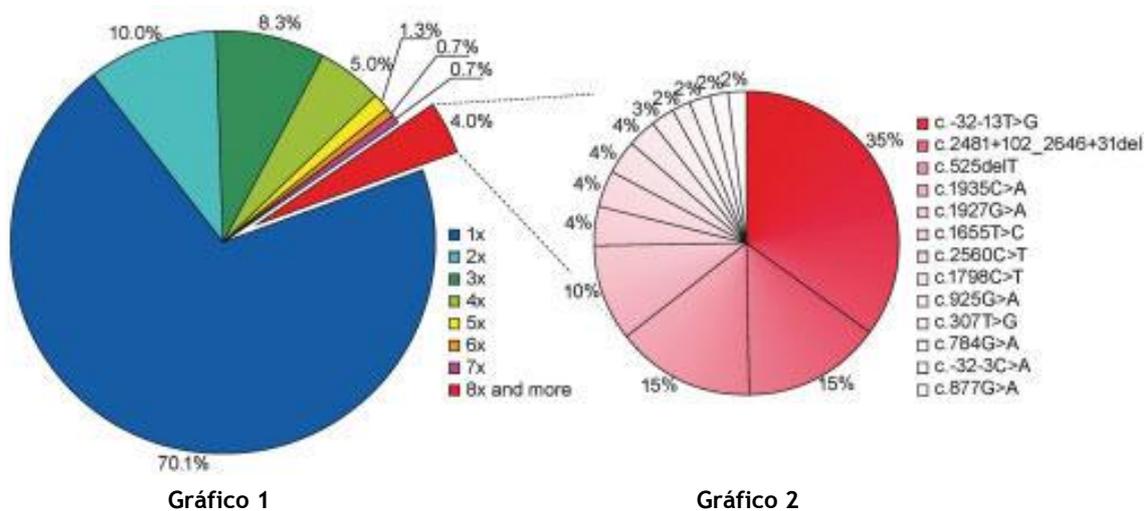
### 1.3 - Etiologia da doença de Pompe

A doença de Pompe é uma doença hereditária com transmissão autossômica recessiva. O gene que codifica a  $\alpha$ -glicosidase ácida, tem 19 exões, localiza-se no cromossoma 17q25.2-q25.3 e é altamente polimórfico. Este gene apresenta pelo menos 47 variantes alélicas normais, e duas variantes polimórficas que, em conjunto com a variante “normal” são responsáveis por três isoenzimas da  $\alpha$ -glicosidase ácida.

Até então, foram identificadas mais de 351 mutações e variações na sequência do gene da  $\alpha$ -glicosidase ácida, que podem apresentar-se isoladamente ou simultaneamente em número variável. Entre os diferentes tipos de mutações encontradas, as mais frequentes são do tipo *missense*, *nonsense*, pequenas ou grandes inserções/deleções e *mutações frameshift*. Estas mutações podem resultar em instabilidade do RNAm e eventualmente numa enzima não funcional.<sup>1,4,16,17,18</sup> Sendo a doença de Pompe autossômica recessiva, a expressão fenotípica da doença ocorre apenas quando existe pelo menos uma mutação patogénica em cada um dos dois alelos do gene da  $\alpha$ -glicosidase ácida.<sup>3</sup> Todas as mutações do gene da  $\alpha$ -glicosidase ácida reportadas até Julho de 2011, bem como os polimorfismos associados a essas mesmas mutações, podem ser consultadas através do acesso à base de dados do Pompe Center.<sup>10</sup>

A maioria das mutações do gene da  $\alpha$ -glicosidase ácida são específicas de cada família e por isso, raras ou mesmo únicas. No entanto, algumas mutações são mais frequentes do que seria esperado em determinados grupos étnicos.<sup>4</sup> É o caso dos indivíduos Afro-americanos, Asiáticos, Tailandeses e alguns Caucasianos. A mutação frequentemente encontrada nos Afro-americanos é a c.2560C>T, que resulta num codão de terminação prematuro (p.Arg854X). As populações Tailandesa e da costa da China associam-se à mutação c.1935C>A que determina a substituição do aminoácido p.Asp645Glu e duas outras mutações são também frequentes nos indivíduos Asiáticos: c.1726G>A e a c.2065G>A. A primeira mutação (c.1726G>A) resulta na tradução do aminoácido p.Gly576Ser, diminuindo de modo significativo a quantidade de enzima, bem como a sua capacidade catalítica. A segunda mutação (c.2065G>A) resulta na tradução do aminoácido p.Glu689Lys, alterando assim a carga elétrica da proteína, mas não exerce qualquer efeito na quantidade ou atividade enzimática. Estas duas mutações tendem a ocorrer simultaneamente no mesmo alelo e estima-se que 3,3 a 3,9% da população asiática seja homozigótica para ambas as mutações. No entanto, apesar destes indivíduos poderem ter uma redução variável da atividade enzimática, podem não apresentar fenotipicamente a doença. Isto torna complicada a distinção através de rastreio neonatal, entre estes indivíduos e os indivíduos fenotipicamente afetados. No caso da população Caucasiana, alguns subtipos associam-se mais frequentemente à mutação c.2481 + 102\_2646 + 31 del (deleção do exão 18). Porém, a mutação mais frequentemente encontrada em doentes de Pompe de início tardio de raça caucasiana, é a c.-32-13T>G. Esta mutação ocorre no primeiro intrão do gene da  $\alpha$ -glicosidase ácida e leva a um *splicing* inadequado em 80 a 90% dos eventos de *splicing* do pré-RNAm. Porém, ainda assim esta mutação permite a produção de uma reduzida quantidade de RNAm processado de forma normal.

Em 2012, foi publicada por Kroos M. e seus colaboradores uma análise realizada à base de dados do Pompe Center, onde são registadas todas as mutações. Como pode ser observado nos gráficos 1.1 e 1.2, cerca de 70% das mutações no gene da  $\alpha$ -glicosidase ácida foram apenas relatadas uma vez, no entanto, no caso das mutações que foram relatadas mais que 8 vezes, a mutação patogénica mais frequente é sem dúvida a mutação c.-32-13T>G, representando cerca de 35% dos casos.<sup>19</sup>



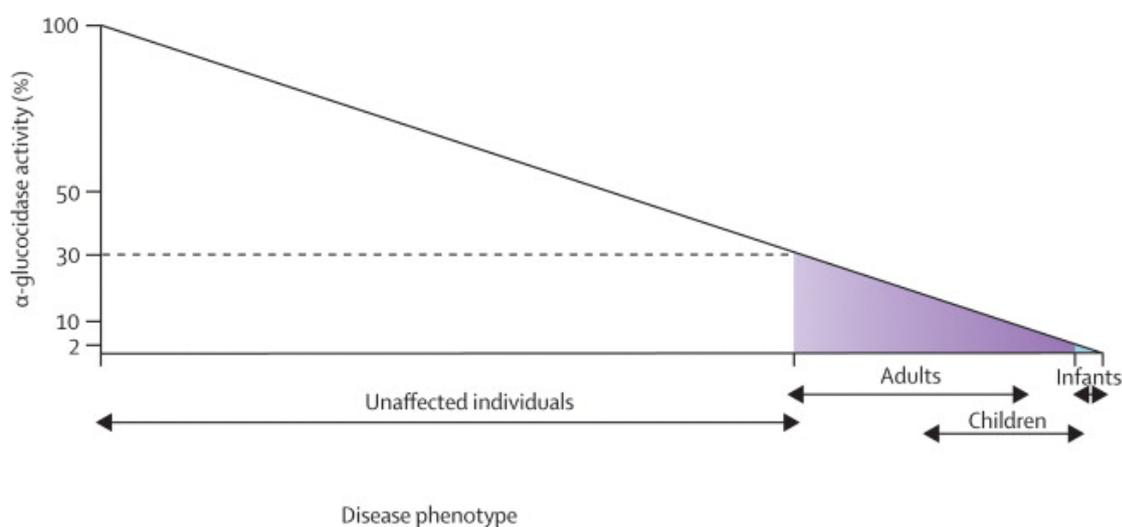
**Gráficos 1.1 e 1.2** - Frequência das mutações patogénicas no gene da  $\alpha$ -glicosidase ácida. O gráfico 1 demonstra que 70.1% das mutações encontradas na base de dados do Pompe Center foram reportadas apenas uma vez e que apenas 4% destas é que foram reportadas oito ou mais vezes. O gráfico 2 mostra a frequência das mutações patogénicas mais frequentemente reportadas (a partir de Kroos et al, 2012).<sup>19</sup>

### 1.3.1 - Correlação genótipo-fenótipo na doença de Pompe

De modo geral, os doentes com doença de Pompe tardia e que não têm sinais de envolvimento cardíaco, apresentam mutações que determinam genótipos menos graves quando comparados com os doentes com a forma infantil de Pompe. A maioria destes doentes que apresentam um fenótipo de evolução progressiva têm níveis detetáveis de  $\alpha$ -glicosidase ácida. Nestes doentes, existe uma tendência para os que manifestam a doença mais precocemente e com progressão mais lenta terem níveis enzimáticos mais reduzidos, quando comparados com os doentes cuja doença se apresenta mais tardiamente e de forma menos progressiva. Pelo contrário, os doentes com a forma infantil da doença de Pompe apresentam normalmente deficiência total ou quase total de  $\alpha$ -glicosidase ácida.

Apesar de existir uma correlação evidente e direta entre o tipo de mutações patogénicas em ambos os alelos do gene da  $\alpha$ -glicosidase ácida e o grau de atividade enzimática, a correlação entre a atividade enzimática e o fenótipo já não parece ser tão linear. Isto porque excepcionalmente, alguns doentes com níveis de atividade enzimática

muito baixos apresentam uma doença com evolução muito lenta e que assim apenas se manifesta tardiamente. No entanto, especula-se que a falta desta relação mais direta entre a atividade enzimática e a evolução clínica possa dever-se em parte à diversidade e especificidade dos diversos procedimentos laboratoriais diagnósticos atualmente disponíveis, o uso de diferentes tecidos para quantificação da atividade enzimática, uso de amostra tecidual não ser representativa dos tecidos mais afetados no doente e que por isso não reflita a verdadeira atividade enzimática, bem como devido à influência exercida por fatores moduladores.<sup>3,19</sup> Por exemplo, em doentes com um dos genótipos mais frequentemente encontrados, o c.-32-13T>G/nulo, em que “nulo” representa qualquer mutação que determine ausência completa de atividade enzimática, foram encontradas atividades enzimáticas que variaram entre 5% e 25% do normal, porém o espectro de apresentação clínica variou desde o primeiro ano de vida até aos 78 anos. Esta constatação tornou evidente que existem fatores genéticos secundários e fatores não genéticos designados no seu conjunto por fatores moduladores, que têm influência variável no fenótipo da doença.<sup>20</sup> Estes fatores moduladores alteram de modo semelhante o efeito patogénico de outros genótipos do gene da  $\alpha$ -glicosidase ácida que se associam a algum grau de atividade enzimática residual, porém, têm pouco ou nenhum efeito nos casos de deficiência enzimática total ou praticamente total.<sup>3</sup> Por isto, na maioria dos casos de deficiência enzimática parcial é difícil prever o fenótipo da doença com base exclusivamente nas mutações genéticas.<sup>4,8</sup>



**Gráfico 1.3** - Modelo demonstrando que os sinais da doença de Pompe surgem quando a atividade da  $\alpha$ -glicosidase ácida diminui para <30% que a atividade normal. O fenótipo da doença que é principalmente determinado pela natureza e número de mutações nos dois alelos do gene da  $\alpha$ -glicosidase ácida, agrava-se com o aumento do grau de deficiência enzimática. Na zona roxa e azul do gráfico, existem fatores moduladores secundários (ainda por identificar), que exercem influência no fenótipo da doença, uma vez que alguns doentes com as mesmas mutações e consequentemente com o mesmo grau de deficiência enzimática podem manifestar sintomas em idades muito distintas (a partir de van der Ploeg e Reuser, 2008).<sup>3</sup>

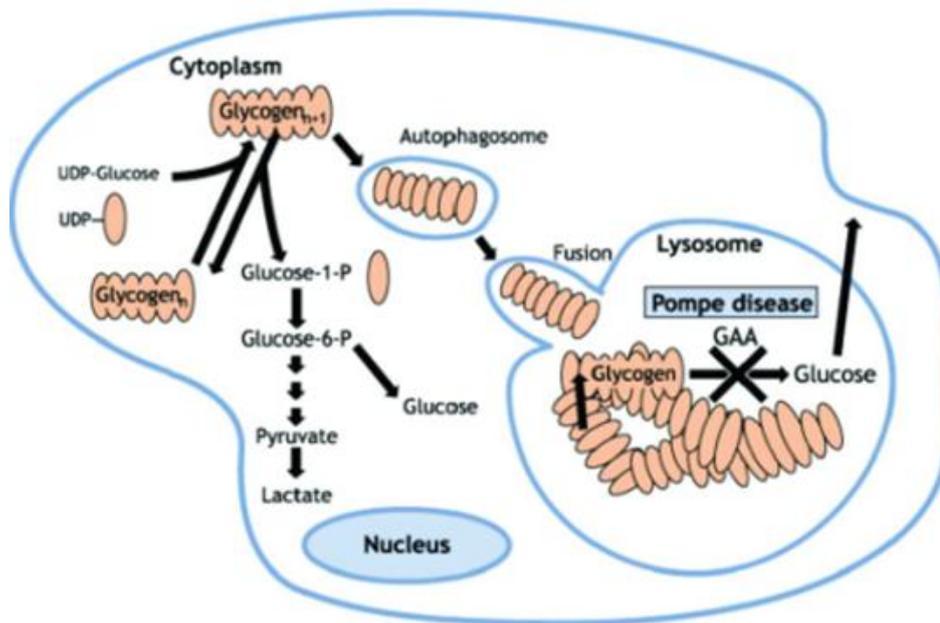
A importância da identificação destes fatores moduladores prende-se com a possibilidade de serem potenciais alvos de intervenção terapêutica.<sup>1,3,20</sup>

## 1.4 - Fisiopatologia da doença de Pompe

As doenças de armazenamento do glicogénio são devidas a defeitos hereditários de uma ou mais enzimas envolvidas na síntese e degradação do glicogénio. No caso da doença de Pompe existe deficiência da enzima lisossomal  $\alpha$ -glicosidase ácida, responsável pela degradação intralisossomal das ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 dos polímeros de glicogénio.

Os lisossomas são pequenos organelos intracelulares presentes em todas as células eucarióticas, têm diâmetro variável entre 400-500 nm e são delimitados por uma bicamada fosfolipídica que permite manter um pH intralisossomal mais ácido que o citoplasmático (pH 4-5). A sua principal função consiste na degradação de macromoléculas em moléculas mais simples, que são posteriormente transportadas de novo para o citoplasma para serem reutilizadas. A autofagia é o principal mecanismo responsável pelo transporte destas macromoléculas para os lisossomas. Normalmente são transportados através deste mecanismo componentes endógenos não funcionais ou danificados bem como substâncias exógenas e microorganismos que conseguem penetrar a membrana celular. Este mecanismo inicia-se com a formação de autofagossomas que sequestram os componentes celulares ou macromoléculas e seguidamente fundem-se com os endossomas tardios/lisossomas sendo o seu conteúdo e membrana interna incorporados nos lisossomas. Uma vez dentro dos lisossomas existe um vasto conjunto de enzimas lisossomais, em que cada uma é responsável pela degradação de uma determinada ligação molecular, até serem obtidas moléculas simples, que são depois transportadas (passiva ou ativamente) de volta para o citoplasma.<sup>21,22</sup>

As mutações patogénicas no gene da  $\alpha$ -glicosidase ácida podem afetar a produção da enzima lisossomal por vários mecanismos: a biossíntese, modificações pós-transcrição, o transporte intracelular, a estabilidade intralisossomal ou o próprio funcionamento da enzima, formando-se então uma enzima parcial ou completamente inativa, que assim compromete a degradação das moléculas de glicogénio que são transportadas para os lisossomas.<sup>14,22</sup>



**Figura 1.2** - Fisiopatologia da Doença de Pompe. GAA:  $\alpha$ -glicosidase ácida; UDP: uridina difosfato (a partir de Cupler et al, 2012).<sup>14</sup>

Consequentemente o glicogénio vai progressivamente acumulando-se no interior dos lisossomas, determinando o aumento do seu tamanho e acabando por culminar na sua disfunção e desintegração com o conseqüente derrame do glicogénio para o citoplasma da fibra muscular. Na doença de Pompe, uma vez que todas as outras vias metabólicas de síntese e degradação do glicogénio estão intactas e os lisossomas contribuem apenas com 3% para o metabolismo energético, estes doentes não apresentam manifestações clínicas relacionadas com o comprometimento do metabolismo dos hidratos de carbono, como por exemplo a hipoglicémia ou a hepatomegália.<sup>23</sup> No entanto, face a novos dados obtidos, esta pode ser uma visão demasiado simplista da fisiopatologia da doença de Pompe, uma vez que a autofagia, o processo responsável pela degradação de macromoléculas e organelos danificados e que está constitutivamente ativo em todas as células do organismo, encontra-se ativo de forma muito proeminente nos doentes de Pompe. Quando, em condições normais o mecanismo autofágico é apenas aumentado face a estímulos como o jejum prolongado. Porém, ainda é pouco claro qual o mecanismo de indução da autofagia nas fibras musculares no caso da doença de Pompe. No entanto, a acumulação autofágica parece determinar maior grau de lesão das fibras musculares esqueléticas do que os lisossomas aumentados de tamanho em regiões que não apresentam processo autofágico tão proeminente.<sup>24</sup>

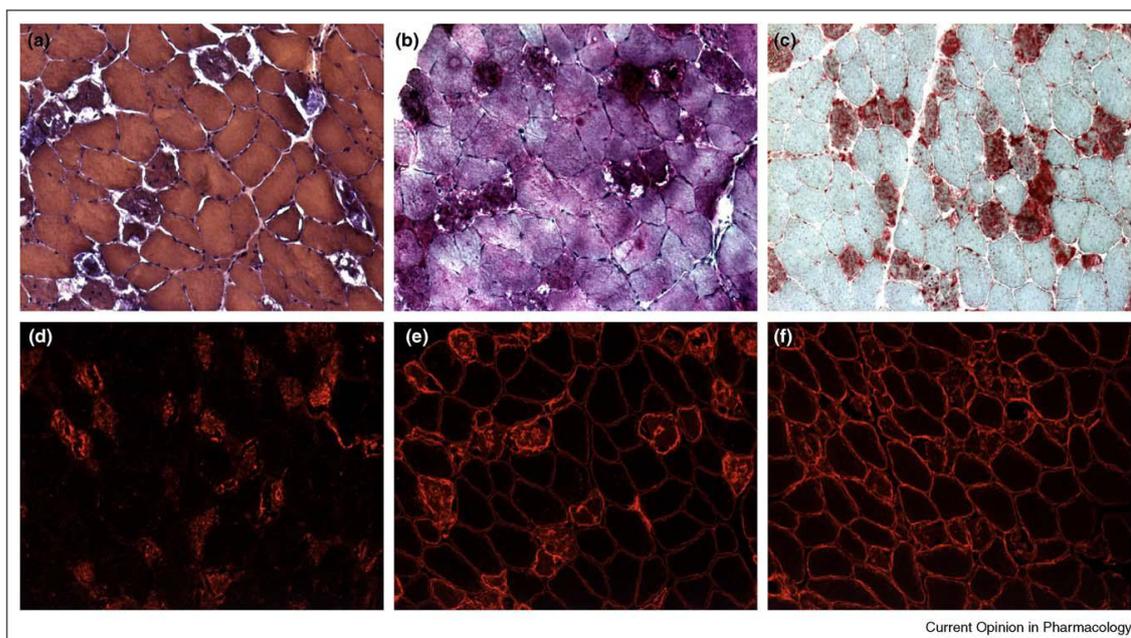
## 1.5 - Histopatologia da doença de Pompe

A acumulação intralisossomal do glicogénio inicia-se quando o grau de atividade enzimática da  $\alpha$ -glicosidase ácida diminui para níveis abaixo do considerado como “valor

crítico”. No entanto, este valor limiar varia consoante o tecido corporal, pelo que para o mesmo grau de deficiência enzimática, podem ocorrer respostas teciduais de graus diferentes, ou seja, um determinado tecido pode demorar mais ou menos tempo a demonstrar alterações funcionais consequentes à acumulação indevida do glicogénio.

Virtualmente, o glicogénio pode acumular-se em todos os tecidos corporais, mas no contexto da doença de Pompe este acumula-se principalmente em tecidos como o miocárdio, músculo esquelético, músculo liso do trato gastrointestinal, fígado, bexiga, parede dos vasos sanguíneos, células de Schwann, perineuro e também no órgão de corti.<sup>3</sup> No entanto, a única alteração histopatológica comum a todo o espectro clínico da doença de Pompe, ocorre ao nível do músculo esquelético.<sup>25</sup>

As principais alterações histopatológicas que caracteristicamente ocorrem na doença de Pompe são a vacuolização e autofagia aumentadas nas fibras musculares. Os vacúolos podem apresentar diversos tamanhos e formas, são PAS positivos e reagem fortemente à fosfatase ácida lisossomal.<sup>8</sup>

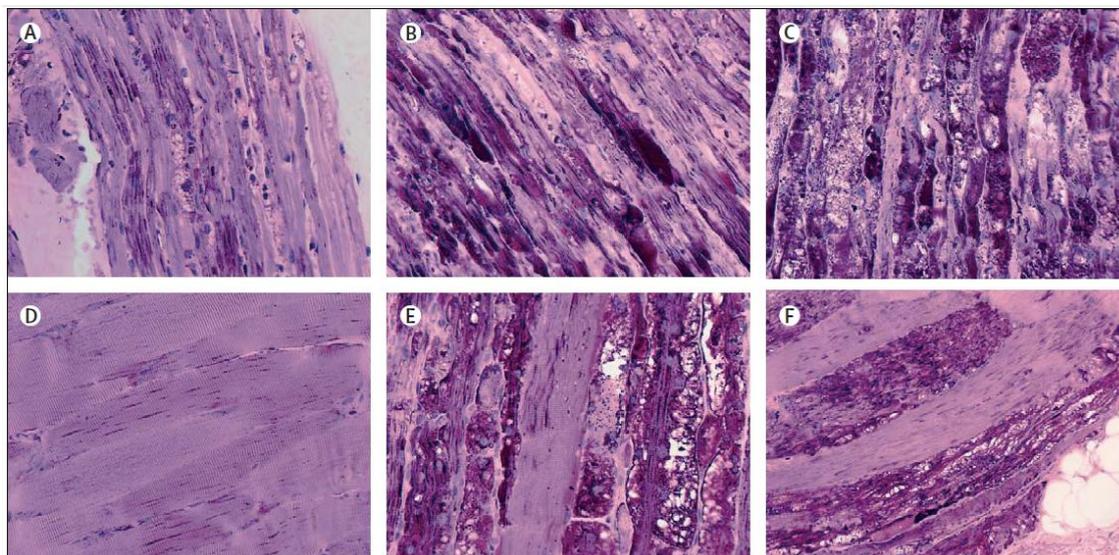


**Figura 1.3** - Biópsia muscular de doente de Pompe tardia. (a) Vacuolização das fibras (H&E); (b) Vacúolos PAS-positivos (reação PAS); (c) Autofagia aumentada (fosfatase ácida); (d) superexpressão de Golgi (imunocorante para complexo de Golgi); (e) Compartimentalização vacuolar com membranas (caveolina-3); e (f) Membranas sarcolemais contornando os vacúolos (distrofina) (a partir de Angelini e Semplicini, 2010).<sup>8</sup>

De uma forma geral, no caso forma infantil da doença de Pompe, a estrutura das fibras musculares esqueléticas está severamente comprometida pela extensa vacuolização, enquanto que os doentes com a forma tardia apresentam graus de vacuolização muito variáveis que parecem ser independentes da idade de início, duração da doença ou manifestações clínicas. Uma característica histopatológica distintiva das duas formas da

doença de Pompe é a compartimentalização dos vacúolos por membranas e proteínas sarcolemais, podendo isto ter influência na resposta à TRE.<sup>8</sup> Todas estas alterações histopatológicas interferem na normal arquitetura das fibras musculares determinando diminuição da performance muscular e atrofia muscular, com conseqüente deterioração progressiva da função muscular.<sup>3</sup>

Independentemente do subtipo de doença de Pompe, existe uma ordem evolutiva sequencial de alterações histopatológicas no músculo esquelético. Nas fases iniciais da doença, existem sempre alterações histopatológicas, porém quase sempre pouco proeminentes. Podem ser visualizados pequenos vacúolos PAS positivos distribuídos ao longo das fibras musculares de forma isolada ou em distribuição linear e não ocorrem necessariamente em todas as fibras musculares nem afetam uniformemente toda a extensão de uma determinada fibra muscular. À medida que a doença vai avançando e devido à progressiva acumulação de glicogénio dentro dos lisossomas, estes vão expandindo-se, aumentando de número e fundindo-se dando origem a estruturas de dimensão cada vez maior e que interferem com a arquitetura normal da fibra muscular esquelética. Em fases já muito avançadas da doença, surgem depósitos de lipofuscina, detritos celulares envolvidos por membranas (autofagossomas) e glicogénio disperso pelo citoplasma das células devido à rutura dos lisossomas.<sup>3</sup>



**Figura 1.4** - Alterações histológicas progressivas no músculo-esquelético de doentes de Pompe infantil (A-C) e do adulto (D-F). (A) bebé de 2,5 meses. A maioria das fibras musculares apresenta pequenos vacúolos PAS-positivos (glicogénio) dispostos em arranjos longitudinais. Algumas fibras têm grandes áreas não coradas e com perda da estriação transversal. (B) Doente de idade semelhante, porém com doença mais severa. Lisossomas PAS positivos são mais numerosos e de maior dimensão que no doente A. A maioria das fibras musculares apresenta grandes depósitos de glicogénio. Apenas algumas fibras apresentam morfologia preservada. (C) bebé de 8 meses de idade. Destruição massiva do tecido muscular devido à deposição de glicogénio. (D) Adulto com alterações histopatológicas moderadas (pequenos vacúolos e pouco numerosos), mas com preservação da morfologia da fibra muscular. (E e F) Adultos com patologia mais severa apresentam alterações histopatológicas variáveis. Algumas fibras

musculares mostram-se severamente danificadas (E), podendo a longo prazo ser substituído por tecido conjuntivo e adiposo (F) (a partir de van der Ploeg e Reuser, 2008).<sup>3</sup>

## 1.6 - Manifestações clínicas da doença de Pompe

Dependendo da idade de apresentação clínica, da velocidade de evolução da doença, dos principais órgãos afetados e da gravidade dos sintomas, podemos classificar a doença de Pompe em duas formas clínicas principais: a forma infantil e a forma tardia.<sup>2,15,16</sup>

A forma infantil é referida como sendo a apresentação clássica da doença de Pompe. Esta pode já ser aparente *in útero*, mas mais frequentemente manifesta-se nos primeiros 4 meses de vida. Estes doentes apresentam normalmente uma doença progressiva com evolução rápida caracterizada por miocardiopatia com cardiomegália proeminente, insuficiência respiratória grave e miopatia proximal.<sup>1,15</sup> Se estes doentes não forem tratados, normalmente morrem no primeiro ano de vida devido a disfunção cardiorespiratória grave.<sup>8,16</sup> A doença de Pompe de início tardio é referida como apresentação não clássica e compreende todos os outros subtipos menos graves da doença. De uma forma geral, os doentes com a forma tardia da Doença de Pompe exibem sintomas primariamente relacionados com o envolvimento muscular esquelético e respiratório. Estes doentes apresentam predominantemente uma miopatia proximal progressiva de evolução lenta caracterizada por fraqueza muscular principalmente ao nível da cintura pélvica. Devido ao envolvimento dos músculos respiratórios apresentam também dispneia e insuficiência respiratória leve a moderada.<sup>1,2</sup> Normalmente, estes doentes com a forma tardia da doença referem previamente ao estabelecimento do diagnóstico, uma história de vários anos de alterações da marcha, da função respiratória, do sono, da resistência física e da tolerância à atividade física.<sup>26</sup>

### 1.6.1 - Manifestações clínicas da doença de Pompe de apresentação clássica

A forma infantil da doença de Pompe apresenta-se mais frequentemente logo ao nascimento ou durante os primeiros meses de vida. As manifestações clínicas apresentadas por estes doentes incluem miocardiopatia (dilatada ou hipertrófica), hipotonia generalizada e fraqueza muscular com progressão rápida, que em conjunto determinam um atraso no alcance dos marcos de desenvolvimento motor adequados para a idade, acabando por culminar em morte por disfunção cardiorespiratória antes do primeiro ano de vida.

O comprometimento dos músculos envolvidos na respiração (diafragma, intercostais e abdominais) leva ao rápido aparecimento de insuficiência respiratória. Estes doentes desenvolvem também miocardiopatia secundária à acumulação do glicogénio nas células miocárdicas e por isso podem apresentar hipertrofia biventricular e septal interventricular, logo ao nascimento ou nos primeiros meses de vida. Na maioria das vezes, esta hipertrofia resulta em obstrução à ejeção ventricular, determinando a progressão para miocardiopatia

dilatada. O tecido de condução elétrico cardíaco também é afetado pela deposição anormal do glicogénio, resultando daí alterações eletrocardiográficas características como o encurtamento do intervalo PR, alargamento do complexo QRS e aumento da dispersão QT. A conjugação da miocardiopatia hipertrófica com as alterações de condução cardíaca colocam estes doentes em elevado risco de desenvolvimento de arritmias ventriculares e morte súbita.

As manifestações gastrointestinais dos doentes de Pompe infantil incluem disfagia orofaríngea e refluxo gastroesofágico, que determinam dificuldade em alimentarem-se e consequente reduzido ganho ponderal, bem como pneumonias de aspiração e infeções do trato respiratório. Outros achados comuns são a macroglossia, reduzida acuidade auditiva, osteopenia e escoliose. Mais raramente podem também apresentar hepatomegália.<sup>27,28</sup>

### 1.6.2 - Manifestações clínicas da doença de Pompe de apresentação não clássica

A doença de Pompe de início tardio pode apresentar-se em qualquer idade após o primeiro ano de vida. No entanto, no caso das crianças e adultos com a forma tardia da doença, esta, manifesta-se mais frequentemente sob a forma de queixas inespecíficas, como fadiga, alterações da marcha, dificuldades em subir escadas, correr ou praticar desportos, primariamente devidas à fraqueza na cintura pélvica. Ocasionalmente estas queixas consequentes à fraqueza muscular da cintura pélvica, podem ser precedidas por dores musculares, caimbrãs ou dor lombar. A dor nos doentes de Pompe tardia pode atingir até 46% dos doentes em uma ou mais regiões do corpo, sendo as pernas a região mais frequentemente envolvida, em 33% dos casos. Relativamente à fraqueza muscular esquelética, esta é caracteristicamente maior nos músculos proximais do que nos músculos distais sendo assim mais pronunciada ao nível da cintura pélvica. Para além do envolvimento da musculatura pélvica, os membros, diafragma e músculos axiais paraespinhais são também frequentemente afetados. O grau de fraqueza muscular normalmente relaciona-se com o grau de atrofia muscular. Alguns doentes apresentam também fraqueza muscular facial, com dificuldades na mastigação e articulação do discurso, podendo também existir ptose palpebral unilateral ou bilateral. Ao nível músculo-esquelético são também frequentes as contracturas, deformidades ósseas e a osteoporose.

Nesta forma da doença de Pompe, os sintomas respiratórios podem, tal como na forma infantil, surgir precocemente como resultado do envolvimento dos músculos respiratórios acessórios e diafragma, podendo mesmo preceder a fraqueza muscular pélvica. Com a progressão da doença, pelo menos 1/3 dos doentes acaba por desenvolver insuficiência respiratória, que muitas vezes é subdiagnosticada. Por isto, a presença de dispneia e ortopneia devem por em questão a necessidade de uma avaliação respiratória mais aprofundada.<sup>4</sup>

A maioria dos indivíduos com a forma tardia da doença de Pompe, não demonstra grandes alterações ao nível cardíaco. Podem no entanto, apresentar anomalias cardíacas menores, que normalmente são explicadas por uma história de hipertensão arterial crónica e/ou idade avançada.<sup>29</sup>

Apesar do envolvimento muscular esquelético ser a característica predominante da doença de Pompe tardia, vários estudos demonstraram que ocorre igual envolvimento do músculo liso, uma vez que foi demonstrada a deposição de glicogénio e degeneração vacuolar nas paredes dos vasos de artérias cerebrais e nas células musculares lisas de outros vasos sanguíneos. A perda da integridade do músculo liso com a progressão da doença pode explicar a ocorrência de arteriopatias dilatadas ou aneurismas nestes doentes. Num estudo recentemente realizado por Sacconi S. e seus colaboradores, foi detetado que as anomalias arteriais intracranianas não são tão raras nos doentes com a forma tardia da doença de Pompe como se pensava previamente, tendo sido detetado uma elevada incidência de dolicoectasias da artéria basilar, arteriopia dilatada da artéria carótida ou ambas simultaneamente. É preciso ter em atenção que estas anomalias arteriais ocorrem na população em geral com uma frequência de 0.06%. Assim sendo, os Neurologistas devem ter em mente que os doentes com doença de Pompe de início tardio apresentam mais frequentemente do que suposto, anomalias arteriais intracranianas. E por isto devem ser submetidos a estudo neuroimagiológico com angio-RM sempre que apresentarem sintomas neurológicos centrais inexplicáveis.<sup>30</sup> Foram também já relatadas uma diminuição das propriedades elásticas aórticas e alteração da distensibilidade aórtica, traduzidas por um aumento da rigidez aórtica como sendo um achado relativamente frequente nos doentes de Pompe, provavelmente devido à deposição de glicogénio na parede deste grande vaso.<sup>31</sup>

Apesar de se desconhecer a frequência, os doentes de Pompe com início tardio apresentam sintomas gastrointestinais, tais como obstipação crónica e/ou refluxo gastroesofágico, diarreia crónica, incontinência intestinal, dor abdominal, sensação de plenitude, perda de apetite, saciedade precoce e vômitos, provavelmente devido à acumulação do glicogénio no músculo liso do trato gastrointestinal. Ocasionalmente apresentam disfagia para sólidos resultante do envolvimento dos músculos faríngeos, que participam no reflexo de deglutição.<sup>27,28</sup> Recentemente o espectro clínico da doença de Pompe tardia foi alargado, passando a incluir a fraqueza lingual. Esta tem sido encontrada em praticamente todos os doente com a forma tardia (mesmo os assintomáticos), pensando-se por isso que é uma alteração que surge muito precocemente na evolução da doença. A importância desta nova característica fenotípica, prende-se com as suas possíveis repercussões funcionais, a disartria e a disfagia.<sup>26</sup>

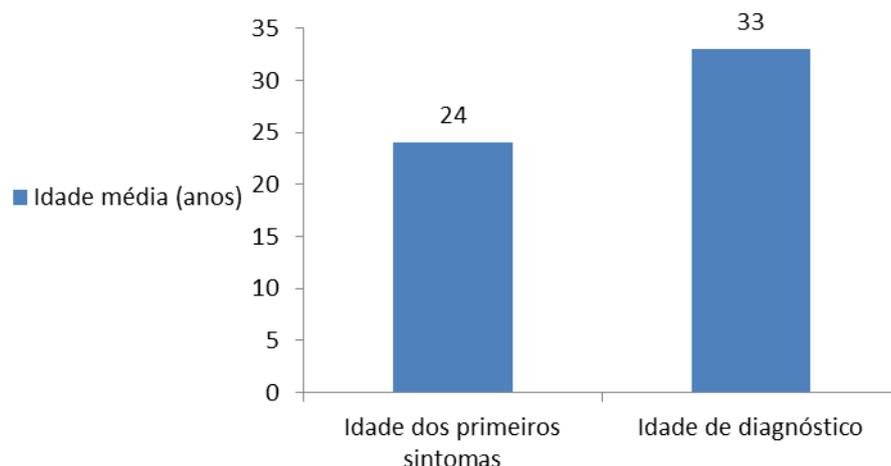
Até recentemente, não tinha sido relatado nenhum doente de Pompe com comprometimento cognitivo. No entanto, em 2011, Muraoka T. e seus colaboradores, descreveram o caso de um doente com uma nova mutação do gene da  $\alpha$ -glicosidase ácida, que apresentava um défice cognitivo significativo com RM craniana normal, estando este défice possivelmente associado à acumulação de glicogénio no neurónios.<sup>1</sup>

A história natural da doença de Pompe de início tardio tem sido pouco estudada, principalmente devido à sua evolução extremamente heterogénea e devido à necessidade de uma cooperação multidisciplinar. No entanto, sabe-se que a principal causa de morte nestes doentes acaba por ser a insuficiência respiratória, estando as anomalias arteriais intracranianas em segundo lugar.<sup>4,8</sup>

## 1.7 - Diagnóstico da doença de Pompe

A forma infantil da doença de Pompe tende a ter uma apresentação clínica relativamente homogénea com hipotonia, atraso no desenvolvimento motor, dificuldades alimentares e no caso de patologia em avançado estado evolutivo, com insuficiência cardíaca e/ou respiratória. Pelo contrário, a forma tardia da doença pode ter uma apresentação clínica muito heterogénea, caracterizando-se muitas vezes por sinais e sintomas inespecíficos que se assemelham aos de outras doenças neuromusculares, tornando o diagnóstico complicado e podendo resultar num atraso no estabelecimento do diagnóstico correcto.<sup>4,26</sup> No entanto, de uma forma geral, sempre que um doente se apresente com fraqueza muscular da cintura pélvica, fraqueza axial dos músculos paraespinais e sintomas de ortopneia, deve-se considerar a doença de Pompe como diagnóstico diferencial, sendo recomendado realizar a determinação do grau de atividade enzimática da  $\alpha$ -glicosidase ácida.<sup>4</sup>

O estabelecimento rápido do diagnóstico definitivo de doença de Pompe é de extrema importância para ambas as formas da doença, uma vez que quanto mais precocemente for iniciada a TRE, melhores serão os resultados obtidos. No entanto, mesmo para a forma infantil e particularmente no caso da forma tardia da doença, o percurso diagnóstico a seguir até ser alcançado o diagnóstico definitivo, depende principalmente do doente e das suas manifestações clínicas e por vezes pode ser um processo complicado e demorado. Como se pode ver no gráfico 1.4, quase sempre, acaba por existir um intervalo de tempo variável entre o início dos sintomas e o diagnóstico definitivo, sendo este substancialmente maior no caso da forma tardia da doença devido à heterogeneidade clínica e evolução lenta. Na tentativa de agilizar todo este processo de reconhecimento dos sintomas e diagnóstico, têm sido criados alguns algoritmos diagnósticos que podem ajudar a orientar melhor os clínicos para os exames complementares mais adequados, dependendo da idade do doente, manifestações clínicas e existência de casos de doença de Pompe na família.<sup>4,25</sup>



**Gráfico 1.4** - Atraso diagnóstico em doentes com a forma tardia da doença de Pompe. Num estudo com 225 doentes de Pompe com forma tardia da doença foi estabelecida a idade de início dos sintomas e a idade do diagnóstico definitivo, tendo-se chegado à conclusão que existiu um tempo médio de atraso diagnóstico de 9 anos (adaptado de Winkel et al, 2005).<sup>25</sup>

Uma vez que a apresentação clínica mais frequente da forma tardia da doença de Pompe é a miopatia proximal, a maior parte das vezes, a avaliação inicial destes doentes passa pela avaliação muscular com eletromiografia (EMG), estudos de condução nervosa e eventualmente biópsia muscular. Por isto, alterações nestes exames devem ser valorizadas no sentido de colocar a doença de Pompe como hipótese diagnóstica. Para além destes, são também de valorizar estudos funcionais pulmonares e determinados parâmetros laboratoriais.

Normalmente, nestes doentes o EMG demonstra alterações miopáticas mais ou menos proeminentes acompanhadas de aumento da irritabilidade da membrana. As alterações eletromiográficas podem variar dependendo do músculo testado, mas de um modo geral consistem na irritabilidade aumentada da membrana sob a forma de potenciais de fibrilhação, ondas espiculadas positivas, descargas complexas repetitivas e descargas miotónicas mais frequentemente atípicas e na maioria dos casos apenas observáveis nos músculos paraespinhais. De salientar que nestes doentes normalmente não existem evidências clínicas de miotonia. Para além disto, podem também existir breves potenciais de ação da unidade motora de pequena amplitude e curta duração. Deverá ter-se em atenção que para além dos músculos proximais e distais dos membros superiores, deverão ser sempre testados os músculos paraespinhais torácicos porque em muitos casos são os únicos que apresentam alterações eletromiográficas. Os doentes de Pompe apresentam estudos de condução nervosa sem alterações. A utilidade clínica do EMG na forma infantil é menos relevante, porém poderá ser útil para detetar miopatia pré-sintomática.<sup>4,15</sup>

Uma vez que a insuficiência respiratória pode em alguns casos preceder a fraqueza muscular, os testes de função pulmonar podem ser úteis quando existe suspeita de doença de Pompe. A determinação da capacidade vital forçada (CVF) na posição sentada e supina deve

ser realizada sempre que possível e se ocorrer uma redução superior a 10% na CVF da posição sentada para a supina é sugestivo de fraqueza diafragmática (característica importante da forma tardia da doença de Pompe).<sup>4</sup>

No caso de doentes assintomáticos ou apenas ligeiramente/moderadamente sintomáticos, parâmetros laboratoriais não específicos que têm levado a investigação diagnóstica e por vezes determinam consequente diagnóstico definitivo de doença de Pompe são o valor de creatina fosfoquinase (CK), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e lactato desidrogenase (LDH) no plasma.<sup>32</sup> Num estudo conduzido por Winkle L.P. e seus colaboradores em 225 doentes com a forma tardia da doença, a CK estava elevada em 91% dos casos, a ALT em 94%, AST em 95% e a LDH em 96%.<sup>25</sup> A maioria dos doentes apresenta elevação da CK em 1.5 a 15 vezes o limite superior do valor de referência normal, podendo atingir os 2000 UI/L, no caso da forma infantil. No entanto, na forma tardia da doença, alguns doentes podem não apresentar esta alteração laboratorial. As transaminases séricas também podem estar elevadas, normalmente com uma AST superior à ALT.<sup>4,15</sup> No entanto, a origem hepática da elevação das transaminases é refutada pela presença de um valor normal de  $\gamma$ -glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT). De salientar que a determinação da CK é um marcador sensível da doença de Pompe e que o aumento no valor desta enzima e das transaminases não se correlacionam com a gravidade do quadro clínico. Valores normais enzimáticos também não excluem o diagnóstico de doença de Pompe.<sup>25,33</sup>

Para além disto, a maioria dos doentes de Pompe apresenta elevação da concentração urinária de hexassacarídeos (Hex<sub>4</sub>), sendo o principal Hex<sub>4</sub> excretado um tetrassacarídeo (Glc<sub>4</sub>), representando mais de 90% do total excretado. Normalmente, o Glc<sub>4</sub> é excretado na urina após a degradação do glicogénio pela amilase na circulação sistémica. No entanto, tal como a CK, este é um marcador sensível, porém não específico, mas cuja importância se relaciona com a sua potencial capacidade discriminativa entre os doentes de Pompe e os indivíduos que apresentam pseudodeficiência de  $\alpha$ -glicosidase ácida. Enquanto os indivíduos com doença de Pompe apresentam elevações significativas de Glc<sub>4</sub>, os que têm pseudodeficiência têm apenas elevações marginais deste oligossacarídeo urinário quando comparados com os primeiros. Isto levantou recentemente a possibilidade da determinação urinária de Glc<sub>4</sub> ser usado como adjuvante à análise enzimática para confirmação diagnóstica, no entanto ainda estão em curso estudos neste sentido. A utilidade clínica do doseamento dos oligossacarídeos urinários vai além da confirmação diagnóstica ou distinção entre os doentes fenotipicamente afetados e os que têm pseudodeficiência enzimática. Atualmente está também a ser estudada a sua utilidade como marcador da resposta terapêutica à TRE, uma vez que de um modo geral os valores de Hex<sub>4</sub> e Glc<sub>4</sub> têm-se correlacionado com a resposta clínica à TRE, diminuindo nos indivíduos com boa resposta e mantendo-se elevados no caso de fraca resposta terapêutica.<sup>4,34</sup>

Previamente ao desenvolvimento das novas técnicas diagnósticas de análise enzimática baseadas em amostras de sangue, sempre que havia suspeita de doença de Pompe poderia ser realizada a biópsia muscular. Esta permite realizar simultaneamente a análise

histopatológica do tecido e a determinação da atividade enzimática da  $\alpha$ -glicosidase ácida. No contexto de doença de Pompe, a análise histopatológica da amostra de músculo esquelético demonstra caracteristicamente acumulação anormal de glicogénio e miopatia vacuolar. No entanto, estas alterações histopatológicas encontradas podem variar consideravelmente, desde mínimas até à extensa deposição de glicogénio no músculo. De realçar que no mesmo indivíduo pode existir vacuolização e acumulação de glicogénio variáveis consoante o músculo e o tipo de fibras musculares. Por isto, a seleção do músculo a ser biopsado e o local da biópsia podem afetar os resultados, porque se for escolhido um músculo não afetado obviamente que a biópsia será normal, mesmo que o doente tenha a doença. Sendo assim, uma biópsia muscular normal nunca exclui o diagnóstico de doença de Pompe.<sup>4,15</sup>

O diagnóstico de doença de Pompe não pode ser então estabelecido ou excluído com base apenas em exames laboratoriais, marcadores biológicos ou biópsia muscular, devendo este ser sempre feito com testes específicos que permitam estabelecer com certeza o diagnóstico de doença de Pompe.<sup>16,25</sup> Os testes que permitem a demonstração de reduzida ou ausente atividade da  $\alpha$ -glicosidase ácida são a determinação do grau de atividade enzimática em amostras de amostras de sangue, cultura de fibroblastos cutâneos ou através da demonstração da existência de 2 mutações nos 2 alelos do gene da  $\alpha$ -glicosidase ácida. No entanto, é necessário sempre um segundo teste confirmatório.

**Tabela 1.2** - Testes secundários para suportar o diagnóstico de doença de Pompe (com base na determinação da atividade da  $\alpha$ -glicosidase ácida em amostras de sangue) (adaptado de Winchester et al, 2008).<sup>32</sup>

**Parâmetros laboratoriais não específicos:**

CK (plasma)

ALT (plasma)

AST (plasma)

LDH (plasma)

Hex<sub>4</sub> (urina)

Glc<sub>4</sub> (urina)

**Testes confirmatórios:**

Determinação grau atividade  $\alpha$ -glicosidase ácida em cultura de fibroblastos cutâneos

Deteção de mutações patogénicas nos alelos do gene da  $\alpha$ -glicosidase ácida

A recomendação de realizar um segundo teste confirmatório baseado na análise enzimática ou genética tem como principal objetivo evitar o erro diagnóstico, que em

doenças como a de Pompe, têm grandes implicações para o indivíduo portador e sua família. Por outro lado, serve também para firmar a necessidade da TRE.<sup>32</sup>

### 1.7.1 - Análise enzimática

O diagnóstico definitivo de doença de Pompe num doente que apresenta sintomas clínicos consistentes com esta doença requer a demonstração da redução ou ausência de atividade da  $\alpha$ -glicosidase ácida. Caracteristicamente, os doentes com a forma infantil da doença de Pompe apresentam uma atividade enzimática <1%, enquanto que os doentes com a forma tardia da doença apresentam uma atividade enzimática reduzida, mas mesmo assim superior à da forma infantil, entre 2-40% do normal. No entanto, tem havido alguns relatos de doentes com a forma tardia da doença que apresentam uma atividade enzimática <1% medida em cultura de fibroblastos.<sup>15,32,35</sup>

Como já foi referido, atualmente o teste usado para confirmar a suspeita de doença de Pompe é a determinação da atividade enzimática em amostras de sangue, principalmente pelo facto de ser um teste minimamente invasivo (picada no dedo ou calcanhar), ser um teste preciso e dar resultado em poucos dias. No entanto, deverá ser realizado um segundo teste laboratorial para confirmação do diagnóstico, como a determinação da atividade da  $\alpha$ -glicosidase ácida noutra tecido (cultura de fibroblastos cutâneos) ou a análise mutacional do DNA.<sup>36</sup>

#### 1.7.1.1 - Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática da  $\alpha$ -glicosidase ácida pode ser feita em amostras de tecidos como o músculo e cultura de fibroblastos cutâneos ou amostras de sangue periférico. Dependendo do tipo de amostra escolhida, do tipo de substrato usado e das condições de análise, a sensibilidade e especificidade da análise enzimática variam.<sup>3,35</sup>

As amostras de sangue onde a atividade da  $\alpha$ -glicosidase ácida pode ser determinada são as amostras de sangue periférico seco em cartão de Guthrie (*dried blood spot* - DBS) ou em amostras de linfócitos purificados. A determinação da atividade enzimática em leucócitos ou em amostras de sangue total era complicada pela presença de maltase glucoamilase (MGA), uma isoenzima da  $\alpha$ -glicosidase ácida que é ativa em pH ácido e que pode mascarar a deficiência de  $\alpha$ -glicosidase ácida.<sup>4,32</sup> Esta era até então uma grande limitação para o uso destas duas amostras referidas, determinando muitas vezes a ocorrência de falsos-negativos. Atualmente o uso de acarbose como inibidor competitivo eliminou este problema.

Se colhida e marcada nos cartões de Guthrie de forma correta, a amostra de sangue periférico seco para determinação da atividade enzimática é um teste muito confiável e sensível para detetar doentes de Pompe com a forma tardia da doença. Os cartões de Guthrie são enviados para um laboratório de referência, que normalmente em 48h consegue obter o

resultado, ou alternativamente pode colher-se uma amostra de sangue periférico num tubo com EDTA e enviá-lo para o laboratório que depois o coloca nos cartões. A determinação da atividade enzimática em amostras de sangue, pelo facto de ser um teste rápido, confiável, de baixo custo e minimamente invasivo, deve ser considerado como primeiro teste a realizar num doente que apresente manifestações clínicas sugestivas de doença de Pompe ou naqueles em que a biópsia prévia foi inconclusiva ou negativa e ainda assim permanece uma forte suspeita de doença de Pompe.<sup>4</sup>

A determinação da atividade enzimática não pode ser feita especificamente numa mistura de leucócitos, uma vez que os neutrófilos contêm MGA, levando assim à ocorrência de falsos-negativos. Pelo contrário, os linfócitos não têm MGA, podendo assim a atividade enzimática ser determinada em amostras de linfócitos purificados. No entanto, este teste tem o inconveniente de ser difícil obter uma amostra de linfócitos livre de neutrófilos quando a amostra de sangue não é fresca, podendo ocorrer contaminação por neutrófilos e consequente interferência da MGA na amostra se esta não for processada corretamente, determinando assim a ocorrência de falsos-negativos.<sup>32</sup> Este teste, se for realizado com a inibição da acarbose, apresenta uma sensibilidade de 93% na deteção de deficiência enzimática na forma infantil da doença. No entanto, não é um teste tão preciso para detetar deficiências enzimáticas parciais. Outro dos inconvenientes do teste em linfócitos purificados é a necessidade de uma quantidade relativamente grande de sangue (10 ml) que pode ser problemático para alguns recém-nascidos hemodinamicamente instáveis.

Relativamente à determinação da atividade enzimática da  $\alpha$ -glicosidase ácida em tecidos, como referido previamente, esta pode ser feita em amostras de músculo esquelético obtidas por biópsia muscular ou em cultura de fibroblastos obtida por biópsia cutânea. Previamente ao desenvolvimento dos testes com amostras de sangue, os testes teciduais eram considerados os métodos *gold standard* para confirmação do diagnóstico de doença de Pompe. A atividade enzimática nestes dois testes pode ser detetada usando um substrato natural (glicogénio) ou um substrato sintético 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo (4-MUG).

A cultura de fibroblastos a partir de biópsia cutânea apresenta, de longe, a maior atividade enzimática e não contém MGA que interfira com o teste a um pH ácido (pH 4.0-4.3). O uso do 4-MUG como substrato torna o teste suficientemente específico e sensível capaz de detetar uma atividade residual tão reduzida como 1 a 2%. Assim sendo, este teste permite distinguir com confiança os doentes com a forma infantil da doença e a forma tardia da doença.<sup>3</sup> No entanto, as suas maiores limitações são muitas vezes a falta de instalações apropriadas para a cultura de fibroblastos e a demora na obtenção do resultado do teste. Normalmente, são necessárias 4 a 6 semanas para se obterem culturas de fibroblastos confluentes a partir de uma amostra de biópsia cutânea.

A biópsia muscular permite simultaneamente uma avaliação histológica e enzimática, permitindo assim obter dados histopatológicos e o grau de atividade enzimática da  $\alpha$ -glicosidase ácida. No entanto, apresenta vários inconvenientes, uma vez que é um teste

invasivo, devido à necessidade de anestesia (que pode ser um problema em alguns doentes, especialmente os da forma infantil da doença), a perda gradual de atividade enzimática durante o transporte e processamento da amostra e por fim, o facto de se poder realizar a biópsia num músculo que não esteja afetado, falseando assim o resultado.<sup>4,32</sup>

Vantagens e desvantagens de cada amostra onde pode ser determinada a atividade enzimática da  $\alpha$ -glicosidase ácida estão resumidas na tabela 1.3.

Atualmente também já é possível a determinação da atividade enzimática da  $\alpha$ -glicosidase ácida como teste diagnóstico pré-natal pelas 10 a 12 semanas de gravidez. Isto é importante pelo facto da doença de Pompe ser um distúrbio autossómico recessivo em que um casal portador heterozigótico que tenha já um filho afetado pela doença, apresenta um risco de recorrência de 25% em cada gravidez subsequente. Assim sendo, é essencial um diagnóstico pré-natal preciso e preferencialmente num período gestacional precoce. O diagnóstico pré-natal da doença de Pompe é feito convencionalmente pela determinação do nível de atividade da  $\alpha$ -glicosidase ácida nas vilosidades coriônicas não submetidas a cultura ou menos frequentemente em cultura de amniócitos. Normalmente é preferida a amostra tecidual de vilosidades coriônicas em vez de amniócitos, uma vez que esta pode ser obtida numa fase mais precoce da gravidez, podem ser processadas diretamente, apresentam atividade enzimática superior e o resultado do teste é obtido em poucos dias. No entanto, esta análise tem as suas limitações e por vezes os resultados podem ser equívocos e difíceis de interpretar. Um dos problemas que se coloca face à realização deste teste é a contaminação materna da amostra fetal. Em caso de dúvida, procede-se à análise do DNA para excluir ou comprovar a contaminação. Outro problema que se coloca é o facto da análise enzimática não conseguir discriminar com segurança entre indivíduos até ao momento não afetados e os verdadeiros não portadores. Se o feto estiver afetado pela forma infantil da doença de Pompe é expectável que o nível de enzima na amostra tecidual coriônica esteja substancialmente reduzida, normalmente <1%. No entanto, no caso de uma gravidez com doença de Pompe tardia, em que o feto apresenta atividade enzimática residual, torna-se difícil a sua distinção. Nestes casos preconiza-se o uso da análise genética como teste diagnóstico. Com exceção das populações Canadiana e Holandesa, não existe nenhuma preponderância étnica definida de algum tipo de mutação específica, pelo que é necessário realizar a sequenciação completa do gene GAA. Se for possível identificar as mutações dos progenitores, pode considerar-se como *gold standard* para o diagnóstico pré-natal a análise mutacional dirigida/específica do DNA fetal, obtendo-se assim com evidência inequívoca se o feto está ou não afetado. No entanto, este tipo de teste genético não é aplicável como ferramenta de diagnóstico pré-natal em todos os casos de deficiência de  $\alpha$ -glicosidase ácida por dois motivos; em primeiro lugar, só é aplicável se os progenitores apresentarem mutações conhecidas e identificadas e em segundo lugar, porque este tipo de teste tem um elevado custo e apenas é realizado num reduzido número de centros a nível mundial.

Tabela 1.3 - Vantagens e desvantagens das amostras onde pode ser determinada a atividade da  $\alpha$ -glicosidase ácida (adaptado de Winchester et al, 2008).<sup>32</sup>

Amostra	Vantagens	Desvantagens
<b>Sangue Periférico seco em cartão de Guthrie (DBS)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Minimamente invasivo;</li> <li>- Relativamente fácil de colher e transportar;</li> <li>- Necessita de pequenos volumes de amostra;</li> <li>- Fornece resultado rápido (em horas);</li> <li>- Pode ser usado no rastreio neonatal;</li> <li>- Usa acarbose para eliminar a interferência com MGA;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A maioria dos laboratórios e hospitais ainda não estão familiarizados com esta nova técnica;</li> </ul>
<b>Leucócitos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Minimamente invasivo;</li> <li>- Relativamente fácil de colher e transportar;</li> <li>- Não necessita preparação tão complexa como a análise em linfócitos purificados;</li> <li>- Utiliza a acarbose para eliminar a interferência da MGA;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ao fim de 2 dias começa a ocorrer redução da atividade enzimática;</li> </ul>
<b>Linfócitos Purificados</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Minimamente invasivo;</li> <li>- Relativamente fácil de colher e transportar;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A purificação da amostra requer processamento mais complexo do que a amostra de leucócitos;</li> </ul>
<b>Fibroblastos cutâneos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Permite uma determinação confiável da atividade enzimática (se condições de cultura adequadas);</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Técnica invasiva (biópsia cutânea);</li> <li>- Resultados demorados (4 a 6 semanas);</li> <li>- As condições de cultura afetam a atividade enzimática;</li> </ul>

DBS: *dried blood spot*

Uma vez que através da análise enzimática de tecido fetal podem obter-se resultados equívocos, a decisão de realizar uma interrupção voluntária da gravidez baseando-se apenas nestes dados pode em alguns casos ser considerado imprudente. Por isto, para fazer o diagnóstico pré-natal de doença de Pompe, sempre que possível, deve-se relacionar os resultados da análise enzimática com a análise genética de mutações específicas do tecido fetal.<sup>3,37</sup> O diagnóstico genético pré-implantação é também uma potencial opção diagnóstica para os casais, caso seja conhecida a mutação ou mutações que afetam aquela família em particular. Este método diagnóstico permite identificar defeitos genéticos em embriões criados por fertilização *in vitro* e assim selecionar apenas os embriões saudáveis para implantação no útero.<sup>15</sup>

O crescente conhecimento da história natural da doença de Pompe e a eficácia da TRE, determinaram a importância da existência de um rastreio neonatal em massa. Este rastreio consiste na medição da atividade da  $\alpha$ -glicosidase ácida em amostras de sangue seco, através de técnicas de imunofluorescência, e a sua importância deve-se ao facto dos recém-nascidos precocemente diagnosticados que iniciam logo a TRE, apresentarem melhores resultados ao nível do sistema cardiovascular e músculo-esquelético, quando comparados com controlos.<sup>16,38</sup> No entanto, este tipo de rastreio neonatal não pode ser aplicado indiscriminadamente a todas as populações, porque, algumas populações, nomeadamente as asiáticas, apresentam mutações específicas que determinam a existência de pseudodeficiência de  $\alpha$ -glicosidase ácida. Esta pseudodeficiência determina uma reduzida atividade da  $\alpha$ -glicosidase ácida, porém os indivíduos mantêm-se assintomáticos durante toda a vida. É o caso da substituição c.2065GNA (p.E689K), que reduz a atividade da  $\alpha$ -glicosidase ácida para menos em 50% do valor normal, e a substituição c.1726GNA (p.G576S) reduz a atividade enzimática para valores suficientes para causar sintomas.<sup>39</sup> Assim sendo, a aplicação de um rastreio neonatal para a doença de Pompe nesta população em específico iria provavelmente identificar um elevado número de falsos-positivos. Por isto, nestas populações, a combinação da análise do DNA, do haplotipo e da determinação da atividade enzimática em linfócitos purificados pode ajudar a distinguir os falsos-positivos dos verdadeiros doentes.<sup>18</sup>

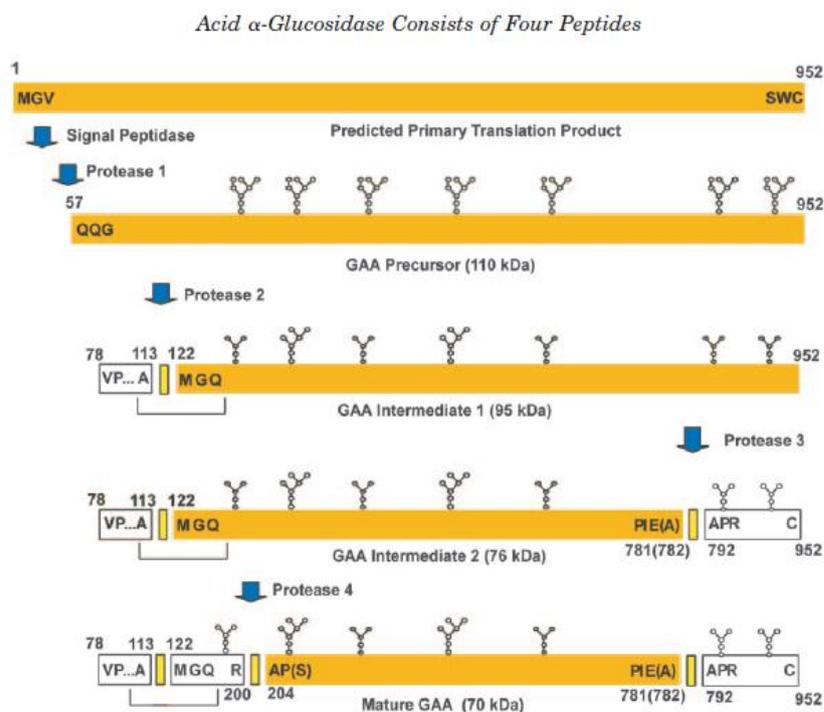
Mais recentemente, E. Oda e seus colaboradores demonstraram que é possível realizar rastreio neonatal em massa na população japonesa com uma taxa de falsos-positivos de aproximadamente 0.3%. Para tal, elaborou um algoritmo diagnóstico para ser utilizado neste tipo de populações que permite o fácil diagnóstico ou exclusão de doença de Pompe em indivíduos que foram rastreados positivamente com a análise enzimática.<sup>39</sup>

Outra questão relativa ao rastreio neonatal que se coloca é o estado CRIM-negativo dos doentes, que é mais frequente em alguns países como os EUA ou do Médio Oriente e que também tem-se tornado cada vez mais pertinente no nosso contexto. Para tentar contornar esta questão terão que ser desenvolvidos protocolos terapêuticos alternativos com base na imunomodulação.<sup>16</sup>

### 1.7.1.2 - Quantificação da proteína $\alpha$ -glicosidase ácida

Em condições normais, a proteína resultante do gene da  $\alpha$ -glicosidase ácida é a enzima lisossomal que catalisa as ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 do glicogénio num pH ácido. A enzima madura existe como um monómero sob duas possíveis formas, 76 kDa ou 70 kDa e apresenta sete locais de glicosilação.<sup>16</sup>

Como pode ser observado na figura 1.5, a enzima  $\alpha$ -glicosidase ácida é sintetizada como um precursor inativo consistindo numa cadeia polipeptídica simples de 952 aminoácidos e com um peso molecular de 110 kDa. Antes de deixar o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático para ser transportado para os lisossomas, o precursor enzimático sofre um processamento proteolítico dando origem a um composto intermédio de 95 kDa e só posteriormente este é modificado para as formas funcionais com 76 e 70 kDa. As mutações que afetam o gene da  $\alpha$ -glicosidase ácida podem determinar um anormal processamento ou uma reduzida quantidade de proteína produzida.<sup>35,40</sup>



**Figura 1.5** - Modelo da maturação da enzima  $\alpha$ -glicosidase ácida (a partir de Moreland et al, 2005).<sup>40</sup>

A quantificação da proteína  $\alpha$ -glicosidase ácida pode ser realizada através de um método baseado em anticorpos a partir de uma cultura de fibroblastos. Esta quantificação da proteína é importante para determinar se um doente de Pompe apresenta material imunológico com reatividade cruzada (CRIM), uma vez que o estado CRIM do doente afeta a resposta terapêutica à reposição enzimática.<sup>16</sup> A maioria dos doentes de Pompe apresenta níveis detetáveis de proteína  $\alpha$ -glicosidase ácida através do Western Blot, sendo por isso designados CRIM-positivos. O problema nestes doentes CRIM-positivos, é que apesar de terem

a enzima, esta existe em quantidades inferiores ao necessário e/ou são enzimas funcionalmente inativas devido a um processamento proteico anormal. Aproximadamente 20% dos doentes com a forma infantil da doença de Pompe, apresentam uma atividade enzimática <1% do normal, não sendo por isso possível detetar a banda proteica correspondente à  $\alpha$ -glicosidase ácida através do Western Blot, sendo então designadas como CRIM-negativos.<sup>35</sup>

Sendo assim, a avaliação do estado imunológico (CRIM *status*) do doente, que deteta a presença ou ausência de proteína nativa através do teste Western Blot em culturas de fibroblastos é um teste específico, sensível e de grande importância para o prognóstico e resposta terapêutica à TRE.<sup>27</sup>

### 1.7.2 - Análise genética

A análise genética é importante na medida em que, na maioria das vezes, permite a identificação da mutação no gene da  $\alpha$ -glicosidase ácida. Em 83-93% dos doentes com atividade enzimática reduzida ou ausente confirmada, podem ser detetadas duas mutações ao fazer a sequenciação do DNA genómico.<sup>16</sup>

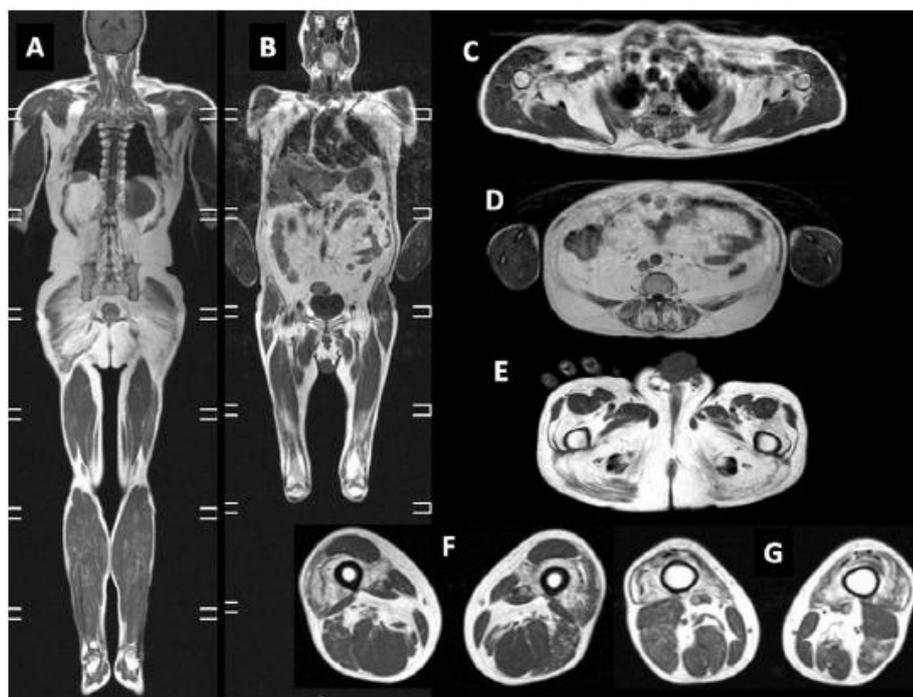
A identificação mutacional é importante no caso de existir uma mutação de carácter hereditário, permitindo assim identificar indivíduos portadores e também é importante na forma tardia da doença de Pompe, uma vez que pode potencialmente existir uma sobreposição entre o doente ser heterozigótico e a existência de atividade enzimática residual, sendo assim necessário a análise do DNA para confirmar o diagnóstico no caso de o doente ainda ser assintomático.<sup>15,16</sup> Também é igualmente útil nos casos de doentes com a forma tardia da doença de Pompe que são ainda assintomáticos e têm valores enzimáticos normais mas limiares.<sup>4</sup>

Dependendo do fenótipo da doença e da etnia do doente, este pode ser inicialmente testado para uma das 3 mutações mais frequentes c.1935C>A (p.Asp645Glu), c.2560C>T (p.Arg854X) ou c.336-13T>G e só posteriormente, se não for identificada a mutação dever-se-á proceder à sequenciação total do gene. Se através da análise do DNA genómico não for detetada alguma mutação, pode proceder-se à análise do RNAm, que dá indicação da ocorrência de grandes deleções ou inserções, mutações obscuras na região promotora ou num dos intrões que determinam assim uma diminuição da quantidade de RNAm alelo-específica para níveis patologicamente baixos. Um das mutações patogénicas mais frequentes envolve a deleção do exão 18, ocorrendo em aproximadamente 5-7% dos casos. Com a exceção da deleção do exão 18, todas as outras deleções são muito raras, exceto em uniões consanguíneas.<sup>3,16</sup> A mutação mais frequentemente encontrada em doentes de Pompe com início tardio, evolução progressiva e de raça caucasiana é a c.-32-13T>G, podendo ser encontrada num alelo em mais de 50% destes doentes.<sup>3,4</sup>

### 1.7.3 - Futuras ferramentas diagnósticas

A avaliação extensiva das alterações musculares por ressonância magnética (RM) têm-se mostrado útil em doentes com doenças musculares hereditárias, pelo que pode vir a contribuir significativamente para o diagnóstico específico destas doenças, incluindo a doença de Pompe. A RM tornou-se o método de eleição para a imagem muscular em primeiro lugar porque está isenta de efeitos secundários, especialmente os da exposição à radiação ionizante, porque tem um bom contraste para os tecidos moles e uma elevada sensibilidade para identificar deposição adiposa no músculo. No caso da doença de Pompe, a RM de corpo inteiro permite a deteção do envolvimento muscular e confirma a existência de um padrão miopático predominantemente proximal, com alterações da intensidade do sinal que resultam da infiltração adiposa no músculo e uma diminuição do volume muscular consequente à atrofia muscular.<sup>41,42</sup>

De facto, demonstrou-se a existência de padrão miopático específico na doença de Pompe tardia, com alguns músculos mais suscetíveis que outros ao processo patológico.<sup>42</sup> Numa série de RM de corpo inteiro realizadas em doentes de Pompe, o padrão de envolvimento muscular mais importante, independentemente da severidade da doença, foi o dos músculos axiais, especialmente os extensores do tronco e os da cintura pélvica. Para além disto, a língua tende a estar frequentemente envolvida, com intensa infiltração adiposa, bem como os músculos extensores do pescoço, independentemente da severidade da doença.<sup>41</sup>

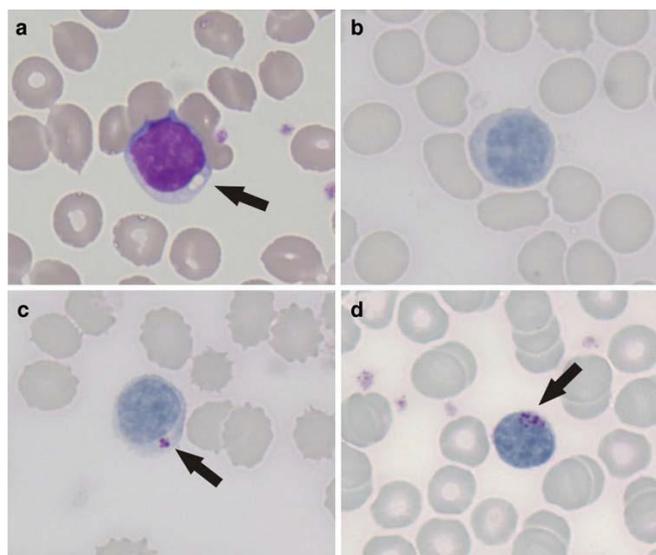


**Figura 1.6** - RM de corpo inteiro de doente de Pompe, ponderação T1. No corte coronal posterior (A) observa-se infiltração adiposa nos músculos subescapular, grande dorsal, extensores lombares e grande glúteo. No corte coronal anterior (B) também se observa grande infiltração adiposa na língua e nos músculos da cintura abdominal. Os cortes axiais demonstram infiltração adiposa ao nível da cintura

escapular (C) nos trapézios e subescapulares, ao nível abdominal (D) na cintura abdominal e extensores lombares, ao nível pélvico (E) nos glúteos maiores e menores e ao nível superior (F) e inferior das coxas (G) nos vastos laterais, mediais e intermédios (a partir de Carlier et al, 2001).<sup>41</sup>

É lógico que o diagnóstico de doença de Pompe não pode ser baseado apenas na RM de corpo inteiro, no entanto, esta pode ser especialmente útil nas fases mais precoces da doença, em que se consideram como possíveis hipóteses diagnósticas outras doenças musculares e é necessário um célere estabelecimento do diagnóstico definitivo. Uma vez que o padrão de envolvimento muscular pode sugerir fortemente o diagnóstico de doença de Pompe, isto pode agilizar a realização precoce do teste enzimático e eventualmente poupar o doente à realização da biópsia muscular. As vantagens da RM como “potencial ferramenta de rastreio” são o facto de ser um exame com boa resolução espacial, de ser não invasivo e barato, quando comparado com os custos dos testes genéticos. Para além disto, pode também vir a servir como uma ferramenta de monitorização da evolução da doença.<sup>41,42</sup>

Os testes atualmente utilizados para a confirmação diagnóstica de doença de Pompe, apresentam as suas vantagens, porém, como desvantagem comum a todos eles têm o facto de só poderem ser realizados em laboratórios especializados e por isto só são pedidos se existir uma grande suspeita clínica de se tratar de doença de Pompe. Com o intuito de se desenvolver um teste simples e confiável que facilmente permitisse incluir ou excluir a doença de Pompe no diagnóstico diferencial começou a ser estudada a utilidade dos linfócitos periféricos. A escolha dos linfócitos periféricos deveu-se ao facto destes também serem afetados pela acumulação inadequada do glicogénio no seu interior e tendo-se descoberto que é a única doença em que os linfócitos coram positivamente com PAS, pode-se afirmar que a presença de linfócitos com vacúolos PAS positivos parece ser específico da doença de Pompe. A grande vantagem desta possível ferramenta de rastreio passa pela simplicidade de obtenção de uma amostra de sangue periférico e pela facilidade de deteção da presença de vacúolos preenchidos por glicogénio no interior dos linfócitos através de microscopia.<sup>41,43</sup>



**Figura 1.7** - Microfotografias de esfregaços de sangue de doentes de Pompe e um indivíduo normal de controlo. **a** Esfregaço de sangue corado com Giemsa/May-Grünwald de doente de Pompe tardia, mostrando um linfócito com dois vacúolos distintos. **b** Esfregaço de sangue corado com PAS de indivíduo normal de controlo (Score PAS= 0). **c** Esfregaço de sangue corado com PAS de doente de Pompe tardia, mostrando um linfócito com inclusões PAS positivas (Score PAS= 2). **d** Esfregaço de sangue corado com PAS de doente de Pompe infantil, mostrando um linfócito com um grande número de inclusões PAS positivas (Score PAS=3) (a partir de Hagemans et al, 2010)<sup>43</sup>

Sendo assim, a quantificação dos linfócitos PAS positivos no sangue periférico poderá vir a ser usada num futuro próximo como teste de rastreio simples e confiável para suportar o diagnóstico de doença de Pompe ou simplesmente excluí-lo. De referir que o número de vacúolos nos linfócitos PAS positivos diminui rapidamente após iniciar a TRE porém, não pode ser usado como marcador de resposta terapêutica porque não existe relação aparente com os efeitos clínicos da TRE no miocárdio ou músculo esquelético.<sup>43</sup>

## 1.8 - Diagnóstico diferencial da doença de Pompe

O diagnóstico de doença de Pompe é frequentemente um dilema diagnóstico pelo facto de ser uma doença rara e pela inespecificidade das suas características fenotípicas, que muitas vezes passam despercebidas ou são desvalorizadas.<sup>15</sup> A heterogeneidade da apresentação clínica pode mimetizar outros distúrbios neuromusculares pelo que o diagnóstico diferencial inclui um amplo conjunto de miopatias, distúrbios do neurónio motor inferior e da junção neuromuscular.<sup>4</sup> No caso da doença de Pompe infantil, o diagnóstico diferencial inclui ainda alguns distúrbios cardíacos que determinam o aumento das dimensões cardíacas. As tabelas 1.4 e 1.5 mostram os diagnósticos diferenciais mais comuns da doença de Pompe infantil e do adulto, respetivamente.

Tabela 1.4 - Diagnóstico diferencial da doença de Pompe infantil (adaptado de Kishnani et al, 2006).<sup>15</sup>

	Patologia		Sinais e Sintomas comuns
Distrofia	Distrofia muscular congénita		Hipotonia e fraqueza muscular severas
	Doença de Danon		Cardiomegália, miocardiopatia, miopatia, armazenamento vacuolar de glicogénio.
Miopatia	Metabólica	DAG tipo IIIa (Doença de Cori ou Forbes)	Cardiomegália, miopatia e elevação da CK.
		DAG tipo IV (Doença de Anderson)	
	Endócrina	Hipotiroidismo	Hipotonia e macroglossia.
Distúrbio do neurónio motor inferior	Atrofia muscular espinhal 1 (Doença de Werdnig-Hoffman aguda)		Hipotonia, miopatia proximal progressiva e arreflexia.
Distúrbios Cardíacos	Fibroelastose endocardial		Dificuldades respiratórias e alimentares, cardiomegália e insuficiência cardíaca.
	Miocardiopatia Hipertrófica Idiopática		Hipertrofia biventricular.
	Miocardite		Cardiomegália.
Outras doenças Metabólicas	Doenças Peroxissomais		Hipotonia.
	Distúrbios da cadeia mitocondrial/respiratória		Hipotonia, insuficiência respiratória, miocardiopatia, fraqueza muscular e aumento da CK.

DAG: Doença de armazenamento do glicogénio; CK: creatina fosfoquinase;

Tabela 1.5 - Diagnóstico diferencial da doença de Pompe do adulto (adaptado de Kishnani et al, 2006).<sup>15</sup>

	Patologia		Sinais e sintomas em comum	
Distrofia	Distrofia muscular da cintura-escápula		Fraqueza muscular progressiva na pelve, membros inferiores e ombros.	
	Distrofia muscular de Becker		Fraqueza muscular proximal progressiva, insuficiência respiratória, dificuldade na deambulação e aumento da CK.	
	Distrofia muscular de Duchenne			
	Síndrome escapulo-peroneal		Fraqueza muscular progressiva ao nível do pescoço, em torno das omoplatas e perda progressiva da capacidade de executar dorsiflexão do pé.	
	Doença de Danon		Miocardioptia hipertrófica, miopatia muscular esquelética e armazenamento vacuolar de glicogénio.	
	Síndrome da espinha rígida		Rigidez da coluna e dor lombar inferior	
	Miopatia fibrilhar		Fraqueza muscular proximal e elevação da CK.	
	Distrofia miotónica tipo 2		Fraqueza muscular proximal.	
Miopatia	Inflamatória	Polimiosite	Fraqueza muscular inexplicável progressiva.	
	Metabólica	DAG tipo IIIa (Doença de Cori ou Forbes)		Hipotonia, fraqueza muscular e elevação da CK.
		DAG tipo IV (Doença de Anderson)		
		DAG tipo V (Doença de McCardle ou deficiência de fosfodiesterase)		
		DAG tipo VI		
		DAG tipo VII (Doença de Tauri ou deficiência de fosfofrutoquinase)		
	Mitocondrial		Hipotonia e hiporeflexia. Algumas formas apresentam miocardioptia hipertrófica, fraqueza muscular e elevação da CK.	
Distúrbio da Junção Neuromuscular	Miastenia Gravis		Fraqueza muscular generalizada.	

Distúrbio do neurónio motor inferior	Atrofia muscular espinhal	Fraqueza muscular assimétrica e atrofia dos músculos voluntários.
Doenças desmielinizantes	Artrite Reumatóide	Rididez e/ou dor com esforço.

DAG: Doença de armazenamento do glicogénio; CK: creatina fosfoquinase;

## 1.9 - Avaliação pré-TRE do doente de Pompe

Após a confirmação do diagnóstico de doença de Pompe através da demonstração do défice enzimático de  $\alpha$ -glicosidase ácida, deverá ser preenchido o formulário anamnésico disponível em [www.pomperegistry.com](http://www.pomperegistry.com). Este programa tem o objetivo de criar uma base de dados com os sinais e sintomas dos doentes de Pompe antes de iniciarem a TRE, o que permitirá melhorar a compreensão da variabilidade e progressão das principais manifestações clínicas da doença de Pompe e avaliar a eficácia e segurança da TRE a longo prazo. É depois necessário realizar a história familiar do doente de forma a poderem ser identificados outros possíveis casos de doença de Pompe e caso seja necessário, o seu posterior encaminhamento para o aconselhamento genético.

Posteriormente ao estabelecimento do diagnóstico definitivo, mas antes de ser iniciada a TRE os doentes de Pompe devem realizar um conjunto de avaliações complementares que permitem determinar o estado evolutivo da doença e que irão servir para posterior avaliação da eficácia da TRE. No entanto, este conjunto de exames e avaliações diferem um pouco consoante a forma da doença, devem ser adaptados dependendo dos sintomas que o doente apresenta e estão indicados na tabela 1.6.<sup>15,16,27</sup>

As avaliações funcionais e motoras devem ser repetidas a cada 3-6 meses para crianças com menos de 5 anos e anualmente para crianças mais velhas e adultos ou sempre que houver alteração da função ou não sejam alcançados os progressos esperados.<sup>15</sup>

**Tabela 1.6** - Avaliação complementar do doente de Pompe prévia à TRE (adaptado Llerena et al, 2009).<sup>27</sup>

Avaliação complementar da forma infantil da Doença de Pompe	Avaliação complementar da forma tardia da Doença de Pompe
Testes Laboratoriais, incluindo:	Testes Laboratoriais, incluindo:
CK	CK
AST e ALT	Aldolase
γ-GT	AST e ALT
LDH	LDH
Hemograma completo	γ-GT
Eletrólitos	Hemograma completo
Ureia e creatinina	Eletrólitos
VS	Ureia e creatinina
Glicémia	Gasometria arterial
Proteínas totais e albumina	
Polissonografia	Polissonografia
ECG	Avaliação pulmonar funcional
Ecocardiografia	Avaliação motora - Escala MRC
Radiografia do tórax	Densitometria óssea
Avaliação audiológica	Radiografia tórax e da coluna
Avaliação motora	Avaliação fisioterapêutica
Avaliação da deglutição	ECG
Avaliação nutricional	Ecocardiografia
Avaliação fisioterapêutica	Avaliação nutricional
Avaliação neurológica	Audiometria
Avaliação imunológica	Avaliação da qualidade de vida
Teste CRIM	EMG

CK: creatina fosfoquinase; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; LDH: lactato desidrogenase; VS: velocidade de sedimentação; MRC: Medical Research Council; CRIM: *cross reactive immunologic material*;

### 1.9.1 - Avaliação pré-TRE do doente com a forma infantil da doença de Pompe

Uma vez que as manifestações clínicas apresentadas pelos doentes de Pompe infantil são de modo geral as mesmas em todos os doentes, as avaliações complementares a realizar serão iguais para todos os doentes. Todos os doentes deverão realizar uma análise laboratorial para avaliação da função hepática, função renal e determinação basal dos valores de CK, LDH AST e ALT.

Os doentes que apresentam insuficiência respiratória relacionada com doenças neuromusculares, como a doença de Pompe, têm maior risco de desenvolverem apneia do sono e hipoventilação noturnas, que frequentemente precedem a insuficiência respiratória diurna mantida. Por isto, a realização de provas funcionais respiratórias, polissonografia com oximetria noturna ou capnografia podem ser úteis no diagnóstico de disfunção respiratória e início precoce de ventilação não invasiva (VNI).<sup>4,15</sup>

Quanto ao ECG, este é particularmente útil para a forma infantil da doença porque estes doentes costumam apresentar hipertrofia do ventrículo esquerdo ou bilateral, podendo também existir anomalias da condução cardíaca.<sup>16</sup> O ECG dos indivíduos com a forma infantil da doença de Pompe apresenta frequentemente um encurtamento do intervalo PR e um aumento da amplitude dos complexos QRS.<sup>15</sup> A base eletrofisiológica para este aumento da velocidade de condução auriculoventricular pode estar relacionado com o efeito isolante do glicogénio depositado no tecido de condução auriculoventricular. Para além disto, foi também relatada uma ocorrência aumentada de síndrome de Wolf-Parkinson-White em doentes de Pompe, bem como anomalias da condução nos ramos do feixe de His.<sup>29</sup> Sendo assim, o ECG é útil para avaliar a presença de complexos QRS de elevada voltagem, a adequação da duração do intervalo PR à idade e a eventual existência de alterações na onda T.<sup>27</sup> Na forma infantil da doença de Pompe, a acumulação do glicogénio é muito pronunciada ao nível cardíaco, resultando numa significativa hipertrofia miocárdica, que pode já ser identificada *in útero*.<sup>15</sup> A ecocardiografia é essencial no follow-up da resposta terapêutica dos doentes infantis. É assim necessário realizar uma ecocardiografia “basal”, ou seja, antes do início da TRE, mas o mais próxima possível deste, com avaliação da espessura do septo, volume telediastólico e fração de ejeção ventricular.<sup>27</sup> Assim sendo, ecocardiografia é mais útil para a forma infantil da doença de Pompe uma vez, numa fase precoce da doença permite detetar a existência de miocardiopatia hipertrófica com ou sem obstrução ao fluxo sistólico ventricular esquerdo. Em fases mais avançadas é possível existir já uma miocardiopatia dilatada com comprometimento da função cardíaca. A radiografia torácica é muito útil na forma infantil da doença porque permite facilmente confirmar a existência de cardiomegália através da determinação do índice cardiorácico.<sup>15,16</sup>

Os problemas auditivos são de extrema preocupação nos doentes de Pompe com apresentação clássica, uma vez que a audição nos primeiros dois anos de vida é fundamental para o desenvolvimento da linguagem e discurso. Estes doentes tendem a apresentar surdez de condução, eventualmente devido a disfunção crónica do ouvido médio. Coloca-se a

hipótese que a disfunção do ouvido médio esteja relacionada com a fraqueza dos músculos faciais, igualmente encontrada nestes doentes, mais concretamente com a fraqueza do músculo tensor do véu do palato, responsável pelo controlo da abertura da trompa de Eustáquio. A fraqueza muscular destes músculo em específico, determina uma diminuição da pressão no ouvido médio predispondo assim ao aparecimento de processos patológicos inflamatórios no ouvido médio, como a otite média crónica. Apenas em alguns casos pode existir também surdez neurosensorial devido à possível existência de patologia retrococlear, no entanto, esta não parece ter um contributo significativo para os problemas auditivos dos doentes. Para além do rastreio auditivo universal neonatal (RANU), é assim recomendado que seja realizada uma avaliação da função auditiva de forma regular nos bebés afetados, não sendo esta necessária em crianças mais velhas. A avaliação audiológica deve incluir timpanometria e potenciais evocados auditivos.<sup>15,44</sup>

A avaliação motora tem como objetivo quantificar a hipotonia e a força muscular. Para tal, a escala PEDI-Pompe (*Peadiatric Evaluation of Disability Inventory for Pompe disease*) é útil, no entanto só pode ser aplicada a doentes com menos de 2 anos de idade. Os doentes com mais de 2 anos de idade deverão ser avaliados com a Escala *Medical Research Council (MRC)*. Esta avaliação é também muito útil porque permite monitorizar progressos e declínios, bem como os efeitos da TRE no músculo esquelético.<sup>27,45</sup>

No contexto da forma infantil da doença de Pompe, a disfagia orofaríngea está associada a uma série de consequências deletérias na saúde do doente, nomeadamente, má nutrição, desidratação, perda ponderal com atraso ou mesmo paragem do crescimento e pneumonias de aspiração. De todas estas consequências a mais importante a referir será a pneumonia de aspiração, que tem importante repercussão na função pulmonar destes doentes, cuja principal causa de morte é a disfunção cardiorespiratória. Na forma infantil da doença de Pompe, os fatores que contribuem para a disfagia orofaríngea são vários, sendo os mais importantes a hipotonia facial, a macroglossia e/ou fraqueza lingual e a limitada amplitude de abertura oral. Tendo em conta que os doentes de Pompe tendem a apresentar uma elevada incidência de disfagia, muitas vezes acompanhada de aspiração silenciosa e dadas as implicações disto na gravidade da forma infantil da doença, é recomendável que se realize de forma rotineira a avaliação da deglutição com videofluoroscopia.<sup>15,46</sup> A avaliação nutricional deverá incluir pelo menos a determinação do peso corporal, altura e a determinação da prega cutânea do tríceps.<sup>27</sup>

Uma avaliação de extrema importância para a eficácia da TRE é a avaliação imunológica do doente para determinação do seu *status* CRIM que irá permitir prever a resposta terapêutica do doente. Idealmente, esta avaliação deveria ser realizada antes da TRE ser iniciada.<sup>4</sup>

### 1.9.2 - Avaliação pré-TRE do doente com a forma tardia da doença de Pompe

A avaliação complementar dos doentes de Pompe de início tardio varia um pouco dependendo do doente e da sua sintomatologia. Isto significa que nem todos os doentes terão de ser obrigatoriamente submetidos às avaliações complementares referidas na tabela 1.6. Todos os doentes deverão realizar uma análise laboratorial para avaliação da função hepática, função renal e determinação basal dos valores de CK, LDH AST e ALT.

A existência de fraqueza diafragmática é uma característica da forma tardia da doença de Pompe, pelo que avaliação da função pulmonar através de espirometria é essencial. O diafragma pode ser acometido logo nas fases mais precoces, podendo o aparecimento de uma insuficiência respiratória ser a primeira manifestação clínica da doença.<sup>4,15</sup> Aproximadamente 60% dos doentes apresentam uma redução ligeira da CVF (<80%) e 30 a 40% apresentam uma redução moderada da CVF (<60%).<sup>15,27</sup> Recomenda-se que a avaliação funcional pulmonar inclua sempre que possível a determinação da CVF com o doente sentado e em posição supina, independentemente de existirem ou não sintomas respiratórios. Uma diminuição da CVF superior a 10% da posição sentado para a supina é sugestivo de fraqueza diafragmática e esta é importante porque é um preditor do desenvolvimento de hipoventilação noturna e conseqüente insuficiência respiratória. Sendo assim, a deteção precoce de insuficiência respiratória nestes doentes é de extrema importância uma vez que a implementação de VNI a longo prazo consegue normalizar as trocas gasosas e melhorar os sintomas nomeadamente os associados aos distúrbios do sono como a sonolência diurna, fadiga e dispneia.<sup>15,16</sup>

A avaliação da função motora nestes doentes é feita com a Escala de força muscular MRC que mede a força muscular segmentar.

No caso da forma tardia da doença, a radiografia torácica é mais útil no sentido de avaliar a componente pulmonar, nomeadamente a eventual existência de redução do volume pulmonar, atelectasias ou derrames pleurais. Para além disto, permite identificar osteopenia e deformidades ósseas.<sup>16,27</sup>

Nestes doentes o ECG é útil para detetar eventuais alterações cardíacas secundárias à patologia pulmonar. A incidência de anomalias da condução auriculoventricular e hipertrofia do ventrículo esquerdo em indivíduos com a forma tardia da doença é marcadamente inferior em relação à incidência relatada para a forma infantil da doença. Tal como o ECG, a ecocardiografia é útil apenas para detetar as repercussões cardíacas da patologia pulmonar subjacente. Existe uma diferença significativa na prevalência e severidade do envolvimento cardíaco na forma infantil da doença, quando comparada com a forma tardia que se deve provavelmente à maior atividade residual da  $\alpha$ -glicosidade ácida nos adultos. Parece que um nível reduzido de atividade da enzima lisossomal é suficiente para que não ocorra deposição intralisossomal de glicogénio nos cardiomiócitos.<sup>27,29</sup>

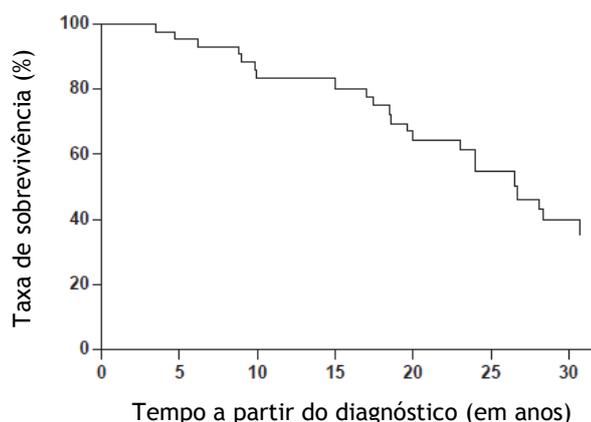
Ainda é desconhecido se existe de facto uma relação evidente entre a doença de Pompe tardia e o aparecimento de surdez nestes doentes, uma vez que muitos dos doentes

referem doenças otológicas prévias, exposição de longa duração a ambientes ruidosos ou utilização prévia de medicamentos ototóxicos que podem muito bem ser os responsáveis pela redução auditiva. Van der Beek N.A. e seus colaboradores publicaram recentemente um estudo onde tentaram estudar a prevalência, severidade e tipo de surdez em 58 adultos com doença de Pompe, tendo chegado à conclusão que de facto existe uma elevada prevalência de redução auditivas nestes doentes, mas que não parece ser superior à prevalência na população em geral da mesma idade e género. Neste estudo, a grande maioria dos doentes apresentava surdez neurosensorial. Por isto e pelo facto da surdez nestes doentes não ser comprometedora da qualidade de vida e conseqüente desenvolvimento cognitivo (como é para a forma infantil da doença), é cada vez mais controverso que se inclua a audiometria e timpanometria na avaliação *standard* do doente de Pompe adulto.<sup>47</sup>

Todos os doentes devem ser submetidos também a avaliação nutricional e da qualidade de vida com a escala SF-36 abreviada (disponível em <http://www.sf-36.org/>).<sup>27</sup>

## 1.10 - Tratamento da doença de Pompe

Previamente à aprovação da terapêutica de reposição enzimática, o tratamento dos doentes de Pompe era apenas de suporte, ou seja, tentavam-se minimizar as manifestações clínicas da doença e simultaneamente prevenir ou tratar as complicações. É evidente que este tipo de tratamento não exercia nenhuma influencia ao nível fisiopatológico da doença, e como podemos verificar através do gráfico 1.5, estes doentes tinham uma esperança média de vida embora variável, limitada. No caso dos doentes com a forma infantil da doença, esta era ainda mais limitada que na forma tardia, ocorrendo frequentemente a morte antes do primeiro ano de vida.



**Gráfico 1.5** - Tempo de sobrevivência de 268 adultos com doença de Pompe não submetidos a TRE. A sobrevivência estimada aos 5 anos, após o diagnóstico era de 95%, aos 10, 20 e 30 anos era de 83, 65 e 40% respectivamente (a partir de Güngör et al, 2011).<sup>48</sup>

No entanto, atualmente, face à nova possibilidade terapêutica com a aprovação da TRE é importante que os clínicos mantenham em mente os tratamentos de suporte usados previamente, que apesar de terem uma influência limitada na evolução da doença, demonstraram ser eficazes na melhoria da capacidade funcional e qualidade de vida dos doentes de Pompe. Este tratamento de suporte incluiu a prática de exercício físico e/ou fisioterapia, dieta adequada e instituição de farmacoterapia adequada e ventilação não invasiva (VNI) nos casos mais evoluídos com patologia cardíaca e pulmonar evidente.

A prática de exercício ajuda a prevenir a atrofia muscular. Em particular, o exercício físico aeróbico contribui para a redução da glicogenólise muscular, determinando um aumento da utilização de ácidos gordos como principal fonte de energia. A fisioterapia é recomendada para os doentes que já têm limitação significativa dos movimentos e deambulação com fraqueza muscular proeminente, na medida em que permite pelo menos manter a amplitude dos movimentos e assim auxiliar na manutenção da deambulação residual.<sup>8,16,49</sup>

A nível dietético, Slonim A. E. e seus colaboradores recomendam um regime dietético com baixas doses de hidratos de carbono e elevadas doses de proteínas, bem como suplementação com L-alanina. Isto porque a reduzida ingestão de hidratos de carbono determina uma menor acumulação intra e extra-lisossomal de glicogénio, enquanto que a elevada quantidade de proteína e L-alanina recomendadas levam a um aumento da síntese de proteínas e redução do catabolismo proteico, uma vez que os aminoácidos ramificados são usados como substrato energético alternativo. Assim sendo, a combinação de exercício físico aeróbico e regime dietético adequado devem ser sempre consideradas e recomendadas em adição à TRE.<sup>8,49</sup>

No caso de doentes com a forma infantil da doença de Pompe que apresentem miocardiopatia, estes devem ser tratados com precaução e de preferência por um cardiologista pediátrico. O tratamento deve ser individualizado e baseado na fase evolutiva da doença, uma vez que o uso inapropriado dos fármacos normalmente usados no tratamento da miocardiopatia podem agravar o coração já de si comprometido. Os bebés com doença de Pompe geralmente apresentam numa fase inicial da doença hipertrofia ventricular severa com ou sem obstrução ao débito cardíaco. Na presença de obstrução da fração de ejeção ventricular o uso de digoxina,  $\beta_2$ -adrenérgicos ou fármacos redutores da pós-carga como os diuréticos ou IECAs podem exacerbar essa obstrução. Normalmente, estes fármacos só são usados em fases mais tardias em que já existe disfunção ventricular acentuada em consequência da miocardiopatia dilatada. No entanto, alguns doentes podem eventualmente apresentar logo numa fase inicial essa disfunção ventricular e assim implicar o uso precoce destes fármacos. A existência de hipertrofia miocárdica potencia a ocorrência de arritmias que podem ser devidas à isquémia subendocárdica subjacente em consequência de uma má perfusão coronária do ventrículo hipertrofiado.<sup>15</sup> Por isto, é necessário ter especial atenção para evitar hipotensão quando exista depleção de volume ou em procedimentos que necessitem de anestesia.<sup>15,27</sup>

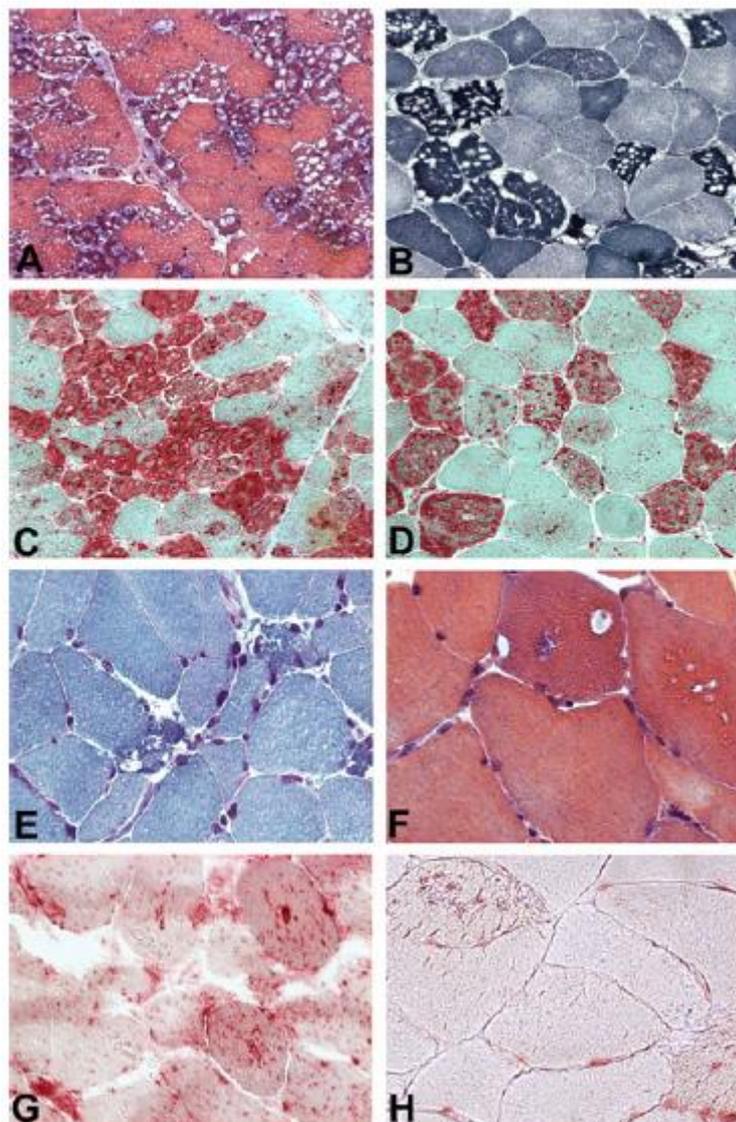
No caso dos doentes com insuficiência respiratória deverão ser usados broncodilatadores em conjunto com técnicas de limpeza/desobstrução das vias aéreas e manobras de desencadeio da tosse de forma a maximizar a limpeza pulmonar do doente, bem como treino dos músculos inspiratórios. Todas as infeções pulmonares devem ser tratadas imediatamente e agressivamente com antibioterapia adequada. Pode ainda ser necessário instituir o uso de CPAP, BiPAP e/ou traqueostomia.<sup>15,16</sup>

Com as emergentes possibilidades de rastreio neonatal, têm vindo a aumentar as controvérsias face à atitude clínica perante doentes com diagnóstico confirmado, mas ainda assintomáticos.<sup>50</sup> Porém, é recomendado que todos os doentes que tenham diagnóstico confirmado por dois testes e que não tenham mutações de que determinem pseudodeficiência, devem iniciar a TRE logo que possível. Isto porque a TRE iniciada o mais precocemente possível relaciona-se com menos alterações histopatológicas irreversíveis e consequentemente, melhor resposta terapêutica.

### 1.10.1 - Terapêutica de reposição enzimática

A terapêutica de reposição enzimática (TRE) tem como principal objetivo a reposição da enzima  $\alpha$ -glicosidase ácida ausente ou deficiente nos tecidos dos doentes de Pompe, através da administração da enzima exógena  $\alpha$ -glucosidase- $\alpha$ .

Qualquer doente com diagnóstico confirmado de doença de Pompe é um potencial candidato a iniciar a TRE, e de modo geral, o tratamento é tanto mais eficaz quanto mais precocemente iniciado, antes que estejam estabelecidas as alterações histopatológicas irreversíveis.<sup>1</sup> Vários investigadores chegaram à conclusão que quando existe uma arquitetura preservada das fibras musculares esqueléticas ao momento do início da TRE, é obtida uma melhor resposta terapêutica, do que se as fibras musculares esqueléticas apresentarem já uma elevada deposição de glicogénio, restos autofágicos ou perda da sua estriação transversal. Sendo neste último caso a recuperação com a TRE será muitíssimo limitada.<sup>3</sup> No entanto, como podemos observar na figura 1.8, por muito ligeira que seja, existe quase sempre uma redução da quantidade de glicogénio depositado nas fibras musculares esqueléticas.



**Figura 1.8** - Biópsias musculares do vasto lateral de dois doentes com doença de Pompe, antes e após o início da TRE. (O paciente 1 é um indivíduo de 17 anos, sexo masculino, com a forma juvenil da doença; imagens A, C antes do início da TRE e B, D com 6 meses de TRE efetuados. O paciente 2 é um indivíduo de 59 anos, sexo feminino, com a forma adulta da doença e já dependente de ventilador; imagens E, G antes do início da TRE e F, H com 2 anos de TRE efetuados). Observando as imagens histológicas do paciente 1 podemos verificar que antes do doente iniciar a TRE o músculo apresentava uma extensa vacuolização com grande quantidade de vacúolos fosfatase ácida positivos. Enquanto que nas imagens histológicas do paciente 2 após o início da TRE, observou-se aumento do tamanho das fibras musculares vacuolizadas e diminuição da intensidade da reação da fosfatase ácida vacuolar (a partir de Angelini e Semplicini, 2012).<sup>49</sup>

Foi comprovado através de estudos, que a TRE é eficaz na forma infantil da doença de Pompe, especialmente na redução da cardiomegália e no aumento do tempo de sobrevivência dos doentes. Pelo contrário, na forma tardia da doença a TRE pode ser eficaz a longo prazo, mas os resultados são quase sempre menos evidentes tornando a questão da TRE na forma tardia da doença bastante controversa devido aos elevados custos implicados no tratamento

destes doentes.<sup>8,27,51</sup> Biópsias musculares realizadas em crianças e adultos com doença de Pompe, antes e depois de iniciarem a TRE demonstraram que a resposta tecidual à alglucosidase- $\alpha$  não é igual para os diferentes tecidos afetados. O primeiro efeito da reposição enzimática é a eliminação do glicogénio nas células endoteliais e seguidamente das camadas musculares lisas dos vasos sanguíneos, perineuro e células de Schwann dos nervos periféricos. Só vários meses após o início da TRE é que se evidencia degradação substancial do glicogénio no músculo esquelético. Assim sendo, não é de esperar resultados clínicos até alguns meses após o início da TRE.<sup>3</sup>

Dos estudos realizados recentemente, sem dúvida que o de maior importância é o estudo “LOTS”, o primeiro estudo de TRE randomizado, duplo cego, controlado com placebo que incluiu 90 doentes de Pompe com 8 ou mais anos de idade e que teve uma duração de 78 semanas. Os instrumentos utilizados para a avaliação da eficácia da TRE foram a distância percorrida no teste da caminhada dos 6 minutos e a percentagem da CVF prevista. Os resultados obtidos com este estudo indicam que o tratamento com a alglucosidase- $\alpha$ , quando comparado com o placebo, tem um efeito, apesar de modesto, bastante positivo na distância percorrida no teste de caminhada de 6 minutos e na função pulmonar dos doentes. Os principais ganhos com a TRE tornaram-se mais evidentes nas primeiras 26 semanas de tratamento e mantiveram-se durante as 78 semanas seguintes até ao fim do estudo. Esta melhoria funcional dos doentes é explicada pela captação celular da alglucosidase- $\alpha$  e consequente degradação do glicogénio indevidamente armazenado nos lisossomas das fibras musculares esqueléticas que ainda não sofreram lesão irreversível.<sup>51</sup>

Para que ocorra resposta terapêutica à alglucosidase- $\alpha$ , tem que ser administrada uma quantidade de enzima que permita ultrapassar o valor limiar no sangue. Para ambas as formas da doença de Pompe, a dose terapêutica recomendada é de 20mg/kg em regime de administração quinzenal, no entanto, se for necessário podem administrar-se doses um pouco mais elevadas. A administração deve ser feita através de uma bomba de infusão que permita um aumento gradual da taxa de infusão que deverá começar com 1mg/kg/h, passando depois a 2mg/kg/h até um máximo de 7mg/kg/h). No entanto, ao contrário do esperado, não é necessário fazer uma reposição completa da deficiência enzimática, uma vez que atividade igual ou superior a 30% do normal é suficiente para prevenir e possivelmente regredir as manifestações clínicas da doença de Pompe.<sup>3,27</sup>

Até recentemente, qualquer clínico que se depara-se com um doente de Pompe não tinha ao seu dispor *guidelines* que o orientassem no sentido do momento de início da TRE, da sua duração e se deveria ou não ser interrompida e em que momento. Atualmente isto está a deixar de ser um problema, porque os resultados de estudos de doentes de Pompe submetidos a TRE têm vindo a ajudar especialistas da área a desenvolverem protocolos terapêuticos cada vez mais pormenorizados. É o caso da forma tardia da doença de Pompe, cujo protocolo terapêutico foi recentemente desenvolvido pela *American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine* (AANEM), com base nos resultados do *Late On-Onset Treatment Study* (LOTS) e está resumido na tabela 1.7.<sup>14,49</sup>

**Tabela 1.7** - Recomendações da AANEM para a TRE em doente com a forma tardia da doença de Pompe, dependendo do estadio e severidade da doença (adaptado de Cupler et al, 2012).<sup>14</sup>

Estado	Recomendação
<b>Doentes pré-sintomáticos sem sinais objetivos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Avaliar o doente a cada 6 meses para fraqueza muscular proximal e função pulmonar;</li> <li>• TRE deve ser iniciada logo que:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Surjam os primeiros sintomas</li> <li>• Ocorra fraqueza muscular proximal detetável ou redução da CFV na posição sentada ou supina</li> </ul> </li> </ul>
<b>Doentes pré-sintomáticos com sinais objetivos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TRE deve ser iniciada se:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Apresentarem fraqueza muscular proximal detetável na escala de força muscular MRC ou redução da CFV na posição sentada ou supina</li> </ul> </li> </ul>
<b>Doentes sintomáticos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TRE deve ser iniciada se:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se existir redução da CFV na posição sentada ou supina ou fraqueza acentuada dos membros inferiores</li> <li>• Doente tem dificuldade em executar as suas tarefas diárias</li> </ul> </li> </ul>
<b>Doentes sintomáticos severos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se o doente está já dependente de cadeira de rodas e a usar ventilação invasiva durante o dia e noite:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• É recomendado realizar TRE por um período de 1 ano e avaliação final da eficácia terapêutica</li> <li>• Após o primeiro ano de TRE, a avaliação deve ser feita individualmente no caso dos doentes com necessidade de ventilação contínua invasiva</li> <li>• Continuar a TRE se os sinais e sintomas estabilizaram ou melhoraram</li> </ul> </li> </ul>

TRE: Terapêutica de reposição enzimática; CVF: capacidade vital forçada; MRC: Escala Medical Research Council;

Durante todo o tratamento, o doente deverá ser reavaliado anualmente para considerar se há benefício na manutenção da TRE. Para além disto, os doentes submetidos à TRE devem ser testados para deteção de anticorpos IgG a cada 3 meses de tratamento durante os primeiros 2 anos de tratamento e daí em diante anualmente. Isto porque a maioria dos doentes tratados com TRE desenvolvem anticorpos IgG contra a  $\alpha$ -glucosidase- $\alpha$ , que acabam por condicionar de modo negativo a resposta terapêutica à TRE. O desenvolvimento destes anticorpos está relacionado com o estado CRIM do doente. Os doentes que apresentam ausência completa de  $\alpha$ -glucosidase endógena são designados como indivíduos CRIM-negativos, porque o seu sistema imunitário não foi exposto à  $\alpha$ -glucosidase endógena durante o normal desenvolvimento. Esta ausência de tolerância imunológica à  $\alpha$ -glucosidase ácida leva ao desenvolvimento de uma resposta imune muito marcada contra a enzima exógena, com elevação do título de anticorpos que a neutralizam. No entanto, doentes de ambas as formas de doença de Pompe podem desenvolver anticorpos contra a proteína exógena, mas os

doentes CRIM negativos tendem a apresentar títulos de anticorpos mais elevados (média de títulos de 1:204,800) do que os CRIM-positivos (média de títulos de 1:1,800).<sup>52</sup> Isto determina uma pior resposta terapêutica à TRE durante a sua administração, evidenciada posteriormente por menores taxas de sobrevivência e de sobrevivência sem necessidade de suporte ventilatório, menor melhoria a nível cardíaco e deterioração da parte muscular. Os doentes de Pompe que apresentam atividade enzimática residual ou enzima não funcionante são designados como pacientes CRIM-positivos. Estes doentes apresentam normalmente alguma tolerância imunológica à  $\alpha$ -glicosidase ácida, determinando assim uma resposta imunológica menos intensa.<sup>8,49</sup>

Nos doentes com a forma infantil da doença de Pompe, a descontinuação da TRE deve ser ponderada em doentes que no momento do início da TRE apresentavam critérios de pior prognóstico, doentes dependentes de ventilação não invasiva contínua, sem atividade motora espontânea ou sempre que a família assim desejar. A descontinuação da TRE em doentes com a forma tardia da doença de Pompe deve ser considerada em algumas situações, como a existência de intolerância à TRE ou ocorrência de efeitos secundários inevitáveis; ausência de resposta à TRE após um período mínimo de tratamento; o doente exprime vontade de cessar a TRE; ou falta de adesão ao tratamento por parte do doente, tornando o seu follow-up difícil.<sup>27</sup>

No caso da doença de Pompe infantil, a TRE determinou um aumento do tempo de sobrevivência destes doentes, dando origem à emergência de complicações a longo prazo que até então não ocorriam. Uma dessas possíveis complicações a longo prazo é o risco de ocorrência de fraturas. Vários fatores poderão contribuir para este aumento de risco de fraturas, entre eles, a reduzida densidade óssea, fraqueza óssea e o baixo peso. A baixa densidade óssea é provavelmente multifatorial devido à imobilidade, reduzida atividade física, reduzido peso, exacerbados pelas dificuldades na alimentação e medicação usada, como diuréticos calciúricos e/ou corticoesteróides. No entanto, nem todos os doentes de Pompe com baixa densidade óssea experienciam fraturas ósseas.<sup>53</sup>

De modo geral a TRE é bem tolerada pelos doentes e é considerada uma terapêutica segura.<sup>3,8</sup> A maioria das reações adversas à TRE são leves ou moderadas e estão relacionadas com a infusão enzimática uma vez que normalmente ocorrem durante ou até 6h após a infusão de  $\alpha$ -glicosidase ácida recombinante. Existe evidência de uma forte correlação entre a ocorrência de reações adversas durante a administração da enzima recombinante e a ausência de atividade enzimática residual nos indivíduos CRIM negativos. Por isto, os doentes com a forma tardia da doença, que normalmente têm uma atividade enzimática residual superior e baixos níveis de anticorpos tendem a experienciar menos reações adversas e quando estas ocorrem, geralmente são muito mais ligeiras.<sup>27</sup> Algumas das reações adversas que podem ser experienciadas pelos doentes são eritema, taquicardia, diminuição da  $SO_2$ , exantema, prurido generalizado, globus faríngeo, edema da mão, surdez aguda, infeção por herpes simplex, polaquíúria, sensações de picadas nos músculos e crise hipertensiva.<sup>54</sup> Este tipo de reações adversas leves a moderadas, normalmente responde à redução da taxa de

infusão ou suspensão e posterior reinício da infusão assim que os sintomas desapareçam. Por outro lado, podem ser facilmente tratadas e/ou prevenidas com a administração prévia à infusão de, fármacos anti-histamínicos ou corticoesteróides, não sendo por vezes necessário suspender a TRE.<sup>27,49,54,55</sup> Doentes de ambas as formas da doença de Pompe descrevem a ocorrência de “sensação de morte iminente”, clinicamente manifestada por dessaturação rápida, cianose perioral, sudorese, mal-estar geral e irritabilidade, que tende a melhorar com a nebulização com  $\beta_2$ -agonistas e redução da taxa de infusão. Verdadeiras reações anafiláticas mediadas por IgE com hipersensibilidade cutânea, urticária, sintomas respiratórios (especialmente broncospasmo e/ou dessaturação do oxigénio) embora raras, podem ocorrer. Por isto, sempre que ocorram reações moderadas a severas associadas à infusão ou reação anafilactóide sugestiva de mediação por IgE (persistência de broncospasmo, hipotensão e/ou urticária), é recomendado realizar um teste cutâneo para deteção de alergia à  $\alpha$ -glicosidade recombinante. O desenvolvimento de reação anafilática severa (choque anafilático) requer suspensão imediata da TRE e avaliação dos níveis de anticorpos IgE, triptase e complemento através do programa de farmacovigilância do produtor da enzima recombinante. Na infusão seguinte não deve ser administrada medicação prévia uma vez que pode mascarar sintomas potencialmente severos da reação anafilática. Os doentes que apresentam maior risco de desenvolverem reações adversas são os que apresentem algum tipo de doença aguda subjacente no momento da administração da enzima recombinante ou administração da perfusão em ritmos elevados. Assim sendo, face à ocorrência de uma reação adversa leve a moderada associada à infusão da  $\alpha$ -glicosidase recombinante deve-se diminuir a taxa de infusão, suspender temporariamente a infusão, e/ou administrar anti-histamínicos e/ou antipiréticos no sentido de amenizar os sintomas do doente.<sup>27</sup> No caso de doentes que desenvolvam frequentemente reações alérgicas que sejam difíceis de controlar com os anti-histamínicos ou corticoesteróides, podem ser usados protocolos de dessensibilização que ajudam a eliminar os efeitos prejudiciais resultantes da formação de anticorpos. Recentemente foi descrito um caso de doente de Pompe CRIM-negativo que foi submetido com sucesso à administração de omalizumab, um anticorpo monoclonal recombinante, devido às múltiplas reações alérgicas que fazia às infusões de  $\alpha$ -glucosidase- $\alpha$ .<sup>52,56</sup>

### 1.10.2 - Perspetivas para o futuro no tratamento da Doença de Pompe

Atualmente as principais limitações da TRE são a dificuldade na alglucosidase- $\alpha$  alcançar especificamente apenas as fibras musculares, onde a densidade do recetor M6P é muito mais baixa quando comparado com os restantes tecidos; a formação de anticorpos contra a enzima exógena, que reduzem a eficácia do tratamento; e a eliminação hepática da enzima exógena.

A primeira limitação referida pode vir a ser ultrapassada através da conjugação da alglucosidase- $\alpha$  com um oligossacarídeo sintético contendo M6P, o que permite melhorar a afinidade da enzima sintética pelo recetor M6P e assim aumentar a quantidade que é entregue ao músculo.

No caso dos doentes em que a TRE induz a formação de anticorpos, é necessário um tratamento alternativo para a deficiência de  $\alpha$ -glicosidase ácida. Por este motivo, está a ser investigado o uso de pequenas moléculas que aumentam a atividade de enzimas mutantes específicas (terapêutica farmacológica com chaperonas), como potencial tratamento para doenças de armazenamento lisossomal, incluindo a doença de Pompe. As chaperonas são moléculas celulares cuja função é controlar as proteínas recém sintetizadas e eliminar as que sofreram processamento incorreto ou as instáveis, através dos proteossomas e do sistema da ubiquitina. Chaperonas farmacológicas como os aminoácidos, têm capacidade de corrigir defeitos na modificação pós-tradução e no transporte de enzimas mutantes permitindo assim a estabilização das moléculas de enzima exógena. No entanto, esta abordagem terapêutica apenas é útil para alguns tipos de fenótipos mutantes de doença de Pompe. Recentemente foi demonstrado que o tratamento com baixas concentrações de inibidores de proteossomas (como o MG132 e o bortezomib) tem capacidade de aumentar a estabilidade, maturação, tráfego celular e atividade de enzimas mutantes em fibroblastos de doentes de Pompe com mutação c.546G>T, sem quaisquer efeitos citotóxicos.<sup>8,57</sup>

Foi previamente demonstrado que a mutação c.546G>T induz a produção de  $\alpha$ -glicosidase ácida processada de forma incorreta e ativação da degradação proteica associada ao retículo endoplasmático. Isto significa que parte da estabilização da  $\alpha$ -glicosidase ácida mutante nos fibroblastos com a mutação referida aparenta resultar da supressão dessa degradação proteica endoplasmática devido ao uso dos inibidores de proteossomas. O inibidor de proteossomas bortezomib, foi recentemente aprovado pela FDA para o tratamento de outras doenças, o que o torna um fármaco clinicamente aplicável como tratamento farmacológico com chaperonas potencialmente útil para doentes de Pompe que têm mutações responsivas às chaperonas.

Está comprovado que a TRE aumenta a sobrevivência e melhora a componente cardíaca da doença, no entanto, em alguns doentes a eliminação do substrato (glicogénio) acumulado no músculo esquelético é insuficiente. O desenvolvimento de novos tratamentos ou o aperfeiçoamento da TRE dependem do conhecimento mais aprofundado dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes à doença.<sup>1,57</sup>

## 1.11 - Prognóstico

Previamente à aplicação da TRE para a doença de Pompe, apenas era instituído tratamento de suporte, pelo que sem um tratamento específico, os doentes com a forma infantil da doença morriam antes do ano de idade, enquanto que os adultos, apesar de uma esperança média de vida de cerca de 27 anos, tornavam-se dependentes do ventilador e incapazes de deambular, necessitando de cadeira de rodas.<sup>12,48</sup> A TRE apesar de não ser um tratamento curativo para a doença de Pompe, é o único tratamento específico para a doença de Pompe existente até ao momento, e quando iniciada precocemente melhora muito o prognóstico dos doentes e altera a morbilidade e mortalidade associadas à doença de Pompe.<sup>23</sup> Não são conhecidos fatores prognósticos precisos relativamente à resposta terapêutica à TRE em doentes de Pompe. Atualmente considera-se que a ausência constitucional da enzima (estado CRIM-negativo), é um preditor de pior prognóstico face ao tratamento devido ao elevado número de doentes que desenvolve anticorpos. Também os doentes que apresentam biópsias musculares demonstrando extenso comprometimento do músculo esquelético e extensa vacuolização das fibras musculares têm pior prognóstico porque a lesão histopatológica irreversível está já estabelecida. Outros fatores prognósticos que eventualmente devem ser considerados são início tardio da TRE e a presença de comorbilidades.<sup>27</sup>

## 1.12 - Acompanhamento do doente de Pompe

Após a introdução da  $\alpha$ -glucosidase recombinante (alglucosidase- $\alpha$ ), a perspetiva sobre a doença de Pompe tem vindo a alterar-se de modo progressivo. E uma vez que os doentes apresentam um maior tempo de sobrevivência, deixou-se de ter uma preocupação exclusiva com os aspetos mais limitantes da doença (principalmente a patologia cardíaca e a insuficiência respiratória), passando a dar-se importância a outros aspetos menos graves, mas que influenciam de forma determinante a qualidade de vida destes doentes.<sup>49</sup> Assim sendo, devido ao seu envolvimento sistémico, é recomendável o seguimento destes doentes por uma equipa multidisciplinar e um médico experiente na doença. Idealmente a equipa deveria incluir um especialista em doenças metabólicas e um conjunto de outros especialistas dependendo dos sinais e sintomas de cada doente como por exemplo, cardiologista, pneumologista, neurologista, ortopedista, terapeuta físico e da fala, geneticista entre outros.

Após o início da TRE, os intervalos de seguimento dos doentes com doença de Pompe devem ser individualizados de acordo com o doente. No entanto, de modo geral é recomendado um seguimento de perto para a forma infantil, com consultas a intervalos mais estreitos e para a forma tardia da doença uma consulta a cada 6 meses e avaliação

complementar anual.<sup>15,27</sup> O acompanhamento dos doentes de Pompe com a forma infantil da doença deverá pelo menos incluir:

- ✚ Fisioterapia motora e respiratória.
- ✚ Terapia da fala com exercício da deglutição e avaliação nutricional, mesmo nos doentes que não apresentem disfagia.
- ✚ Ecocardiografia e Holter a cada 3 meses, para deteção de arritmias intermitentes, principalmente nos doentes com hipertrofia ventricular concêntrica.
- ✚ Avaliação médica mensal de preferência por um médico que não esteja envolvido na administração da TRE.
- ✚ Avaliação da função motora.
- ✚ Gasometria a cada 3 meses para avaliar a progressão da doença e a eficácia da TRE ao nível da hipercapnia crónica durante o sono.
- ✚ Radiografia da coluna lombar e densitometria para deteção de osteopenia.
- ✚ Audiometria
- ✚ Testes para deteção de anticorpos IgG a cada 3 meses

O acompanhamento dos doentes com a forma tardia da doença deverá pelo menos incluir:

- ✚ Reabilitação respiratória e motora.
- ✚ Avaliação da função motora.
- ✚ Avaliação da função pulmonar e polissonografia anuais.
- ✚ Avaliação anual da qualidade de vida.
- ✚ RM muscular (se possível, para determinação quantitativa do envolvimento muscular).

Com base nos exames de monitorização que o doente consegue executar ao momento da avaliação inicial, deve ser elaborado um conjunto de exames que constituam um protocolo de seguimento personalizado para cada doente. Os objetivos terapêuticos devem ser determinados de acordo com o estado funcional basal do doente, considerando pelo menos a estabilização da doença como sucesso terapêutico.<sup>27</sup>

Uma vez que a doença de Pompe tem carácter hereditário autossómico recessivo e a taxa de ocorrência de mutações *de novo* é muito baixa, os progenitores de um doente de Pompe são à partida portadores, por isso deve ser disponibilizado aconselhamento genético a todos os casais com filhos portadores de doença de Pompe e aos próprios doentes.<sup>15</sup>



## Capítulo 2

### Estudo de Casos Clínicos

Neste capítulo, faz-se um estudo descritivo de 2 casos clínicos de doentes com diagnóstico confirmado de doença de Pompe de início tardio e que apresentam relação de parentesco, ou seja, são irmãs. Ambas as doentes são seguidas na consulta de neurologia do Hospital Pêro da Covilhã (Centro Hospitalar Cova da Beira).

#### 2.1 - Apresentação dos casos clínicos

##### Caso Clínico #1

- Identificação

M.J.S.A., sexo feminino, 75 anos de idade, seguida na consulta de Neurologia do Centro Hospitalar Cova da Beira (CHCB).

- Motivo da consulta

Doente com tetraparésia predominantemente proximal e dificuldades na marcha.

- História da doença actual

Doente de 75 anos apresentou-se na consulta de neurologia do CHCB, enviada pelo médico de família com um quadro clínico de dor lombar de cerca de 50 anos de evolução com melhorias e agravamentos sucessivos. Há cerca de 15 anos, iniciou diminuição da força muscular predominantemente proximal em ambos os membros inferiores que se traduzia principalmente por dificuldades na marcha e em subir escadas ou levantar-se de cadeiras. Este quadro foi acompanhado do desenvolvimento de ptose palpebral progressiva unilateral do lado esquerdo, na ausência de outras queixas visuais. Desde há 5 anos que se tem vindo a queixar de dispneia de esforço e menos proeminentemente também de repouso. Todo este quadro clínico tinha já impacto muito significativo nas atividades de vida diárias. Devido às queixas de dispneia foi avaliada pela Pneumologia em Março de 2009, tendo sido recomendado o uso noturno de VNI com BiPAP.

- Antecedentes pessoais e familiares

Sem antecedentes pessoais ou familiares relevantes.

- Exames complementares relevantes

Em Outubro de 2007 realizou Eletromiografia e Ressonância Magnética. O EMG revelou sinais compatíveis com sofrimento miopático na maioria dos músculos proximais e distais que foram avaliados. Presença de atividade desnerativa aguda. A RM revelou existência de escoliose em “S” de convexidade esquerda entre D12 e L1 e direita em L4-L5 e discos intervertebrais desidratados, particularmente entre L4 e S1, com abaulamentos difusos, posteriores, sem características herniárias.

Seguidamente, em Dezembro de 2007, realizou biópsia muscular (no músculo deltóide), que revelou a existência de discretas lesões de perfil miopático e acumulação de glicogénio. O estudo morfológico da amostra obtida sugeriu a possibilidade de se tratar da forma de início tardio da doença de Pompe.

Em Julho de 2008 procedeu-se ao estudo bioquímico lisossomal em amostra de leucócitos totais de sangue periférico e ao doseamento de oligossacarídeos urinários, cujo resultado é apresentado na tabela 2.1.

**Tabela 2.1** - Resultado obtido no estudo bioquímico lisossomal em amostra de leucócitos de sangue total do doente #1.

Enzima lisossomal	Valor obtido	Valor de Referência
$\beta$ -galactosidase	203 nmol/h/mg proteína	73-585 nmol/h/mg proteína
$\alpha$ -Glucosidase ácida (+ acarbose)	3 nmol/h/mg proteína	44,1-144 nmol/h/mg proteína

Chegou-se à conclusão que os resultados obtidos na determinação da atividade enzimática da  $\alpha$ -glucosidase e na análise do perfil cromatográfico da excreção urinária de oligossacarídeos eram compatíveis com o diagnóstico de Doença de Pompe.

Para confirmação do diagnóstico, realizou-se o estudo bioquímico lisossomal em amostra de cultura de fibroblastos cutâneos em Outubro de 2008.

**Tabela 2.2** - Resultado obtido no estudo bioquímico lisossomal em amostra de cultura de fibroblastos cutâneos do doente #1.

Enzima lisossomal	Valor obtido	Valor de Referência
$\beta$ -galactosidase	564 nmol/h/mg proteína	166-2037 nmol/h/mg proteína
$\alpha$ -Glucosidase ácida	33 nmol/h/mg proteína	64-567 nmol/h/mg proteína

O resultado do estudo bioquímico lisossomal apresentado na tabela 2.2 confirma o diagnóstico de doença de Pompe de início tardio.

- Evolução Clínica

Tendo sido diagnosticada com doença de Pompe, a doente foi proposta à Comissão de doenças raras para iniciar o Tratamento de Reposição Enzimática com alglucosidase- $\alpha$ . O 1º ciclo de tratamento foi iniciado em 2 de Dezembro de 2010 segundo o protocolo de 20 mg/kg de peso do doente em regime de administração quinzenal.

Ao momento do início do tratamento foi realizada a avaliação basal que contemplou a realização do exame neurológico e análises sanguíneas.

**Tabela 2.3** - Valores enzimáticos à data de início do tratamento de reposição enzimática.

Enzima	Valor obtido	Valor de Referência
CK	140 U/L	26-192 U/L
AST (GOT)	30 U/L	0-32 U/L
ALT /GPT)	27 U/L	0-31 U/L
LDH	470 U/L	240-480

CK: creatina fosfoquinase; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; LDH: lactato desidrogenase;

A tabela 2.3 mostra os resultados das análises sanguíneas, que não revelaram quaisquer alterações relevantes e a doente apresentava os valores de CK, AST, ALT e LDH dentro dos parâmetros considerados normais.

O mais relevante no exame neurológico foi a avaliação da marcha e da função motora, nomeadamente a força e tónus muscular, reflexos profundos e superficiais. A marcha é feita com movimentos basculantes proeminentes das ancas, característico de marcha miopática. A deambulação encontrava-se bastante comprometida, necessitando do auxílio de canadianas. Para se levantar da posição sentada a doente apresentava muita dificuldade e necessitava de apoiar-se nas coxas para depois levantar o tronco - sinal de Gowers. Relativamente aos reflexos profundos, a doente apresentava abolição dos reflexos patelar e aquiliano bilateralmente, mas com o cutâneo plantar em flexão presente e simétrico. Os reflexos dos membros superiores (tricipital, bicipital e radial) encontravam-se diminuídos e dos cutâneo abdominais, apenas os superiores estavam presentes. A força muscular segmentar foi avaliada segundo a Escala MRC e o resultado é apresentado na tabela 2.4.

**Tabela 2.4** - Avaliação da força muscular segmentar da doente #1 com a Escala MRC (ao início da TRE).

Membros superiores	Membro direito	Membro esquerdo
Flexão braços/antebraços	3/4	3/4
Extensão braços/antebraços	2/3	2/3
Abdução braços	4	4
Adução braços	3	3
Membros inferiores	Membro direito	Membro esquerdo
Flexão coxas	2	3
Extensão coxas	2	3
Abdução coxas	2	2
Adução coxas	4	4
Dorsiflexão pés	4	4

No contexto da avaliação pré-TRE, foi realizado o estudo pulmonar funcional em Novembro de 2010, que revelou CVF, FEV1 e Índice de Tiffeneau dentro dos parâmetros normais (83.2%, 85.7% e 82.83% respetivamente).

Em Janeiro de 2012 foi realizada a pesquisa de anticorpos que demonstrou a existência de títulos normais (tabela 2.5).

**Tabela 2.5** - Valores obtidos na pesquisa de anticorpos.

Anticorpo	Valor obtido	Valor de Referência
IgA	110 mg/dL	70-400 mg/dL
IgG	779 mg/dL	700-1600 mg/dL
IgM	77 mg/dL	40-230 mg/dL

Recentemente, em Maio de 2012 e após 16 meses de TRE, a doente foi re-avaliada. A doente mantém a marcha miopática descrita na primeira avaliação, porém com melhora significativa na deambulação já não necessitando do auxílio permanente de canadianas. Esta re-avaliação revelou ausência dos reflexos profundos patelares e aquilianos com manutenção do cutâneo-plantar em flexão. Reflexos tricipitais e radiais diminuídos bilateralmente e bicipital normal e simétrico. Os cutâneo abdominais presentes mas diminuídos. Na manobra de Mingazinni, a doente não consegue manter os membros inferiores em posição, nem realizando a manobra apenas com um membro de cada vez. Realizou-se também avaliação da força segmentar com a escala MRC, estando o resultado obtido apresentado na tabela 2.6.

**Tabela 2.6** - Avaliação da força muscular segmentar da doente #1 com a Escala MRC (re-avaliação após 16 meses de TRE).

Membros superiores	Membro direito	Membro esquerdo
Flexão braços/antebraços	4	4
Extensão braços/antebraços	3	3
Abdução braços	4	4
Adução braços	3	3
Membros inferiores	Membro direito	Membro esquerdo
Flexão coxas	3	3
Extensão coxas	2	2
Abdução coxas	3	3
Adução coxas	3	2
Dorsiflexão pés	4	4
Extensão pés	2	2

Foi também reavaliada a função pulmonar em Fevereiro de 2012 que revelou a manutenção do FVC, FEV1 e Índice de Tiffeneau dentro dos parâmetros normais, porém com valores um pouco melhor que na avaliação pré-TRE (84.4%, 87.6% e 83.19% respetivamente).

## Caso Clínico #2

- Identificação

M.G.S.A., sexo feminino, 68 anos de idade, seguida na consulta de Neurologia do Centro Hospitalar Cova da Beira (CHCB).

- Motivo da consulta

Fraqueza muscular progressiva e cansaço.

- História da doença actual

Doente de 68 anos apresentou-se na consulta de Neurologia do CHCB com queixas de fraqueza muscular progressiva com agravamento mais proeminente nestes últimos 5 anos. A doente refere que de dia para dia tem vindo a piorar, mas o quadro clínico ainda não tem impacto significativo na realização das atividades de vida diárias, sendo esta ainda totalmente autónoma. A doente tem uma irmã mais velha, M.J.S.A de 75 anos diagnosticada

com Doença de Pompe de início tardio, porém já sintomática desde os 50-60 anos de idade. Já se encontra a realizar TRE há quase 3 meses.

- Antecedentes pessoais e familiares

Doente parcialmente mastectomizada por neoplasia maligna na mama direita há cerca de 7 anos. Realizou quimioterapia e radioterapia e até ao momento não apresentou recidiva. Já foi submetida a cirurgia à coluna lombar por patologia do disco intervertebral. Hipotireoidismo tratado farmacologicamente. Viligo evidente nas mãos. Sem outros antecedentes pessoais relevantes.

- Exames complementares relevantes

Em Outubro de 2008, realizou-se estudo bioquímico lisossomal em amostra de leucócitos totais de sangue periférico.

**Tabela 2.7** - Resultado obtido no estudo bioquímico lisossomal em amostra de leucócitos de sangue total da doente #2.

Enzima lisossomal	Valor obtido	Valor de Referência
β-galactosidase	293 nmol/h/mg proteína	73-585 nmol/h/mg proteína
α-Glucosidase ácida (+ acarbose)	0 nmol/h/mg proteína	44,1-144 nmol/h/mg proteína

O resultado do estudo bioquímico lisossomal, apresentado na tabela 2.7, é compatível com o diagnóstico de doença de Pompe.

Em Novembro de 2011, para confirmação do diagnóstico, realizou-se o estudo bioquímico lisossomal em amostra de cultura de fibroblastos cutâneos, tendo-se obtido uma atividade enzimática de α-glicosidase ácida de 28,8 nmol/h/mg (valor de referência entre 64 e 567 nmol/h/mg).

Em Abril de 2011 procedeu-se ao estudo de regiões do gene GAA abrangendo os exões 2 e 16 e respetivas zonas flanqueantes, em DNA genómico obtido de sangue periférico. Esta análise permitiu detetar a presença, em heterozigotia composta de 2 mutações, que são descritas como sendo causais da doença de Pompe:

[GAA] c.-32-13T>G (intrão 1) - Heterozigota

[GAA] c.2237G>A (p.W746X) (exão 16) - Heterozigota

Os resultados obtidos confirmaram o diagnóstico de doença de Pompe de início tardio.

Ainda antes de iniciar o tratamento, a doente realizou estudo funcional respiratório e estudo poligráfico do sono em Julho de 2011. O primeiro revelou diminuição da CVF e do volume expiratório máximo no 1º segundo, com um índice de Tiffeneau normal e o estudo poligráfico do sono confirmou a existência de SAOS moderada.

- Evolução Clínica

Tendo sido diagnosticada com doença de Pompe, a doente foi proposta à Comissão de doenças raras para iniciar o Tratamento de Reposição Enzimática com alglucosidase- $\alpha$ . O 1º ciclo de tratamento foi iniciado em Setembro de 2011 segundo o protocolo de 20 mg/kg de peso do doente em regime de administração quinzenal. Ao momento do início do tratamento foi realizada a avaliação basal que contemplou a realização do exame neurológico e análises sanguíneas.

As análises revelavam apenas alteração ligeira da função hepática (tabela 2.8) e a pesquisa de anticorpos que demonstrou a existência de títulos normais (tabela 2.9).

**Tabela 2.8** - Valores enzimáticos à data de início da TRE de reposição enzimática.

Enzima	Valor obtido	Valor de Referência
AST (GOT)	38 U/L	0-32 U/L
ALT /GPT)	41 U/L	0-31 U/L
$\gamma$ -GT	16 U/L	7-39 U/L

AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase;  $\gamma$ -GT: gama glutamiltransferase; LDH: lactato desidrogenase;

**Tabela 2.9** - Valores obtidos na pesquisa de anticorpos (início da TRE).

Anticorpo	Valor obtido	Valor de Referência
IgA	165 mg/dL	70-400 mg/dL
IgG	1006 mg/dL	700-1600 mg/dL
IgM	159 mg/dL	40-230 mg/dL

Do exame neurológico realizado, o mais relevante foi a avaliação da marcha e da função motora, nomeadamente a força e tónus muscular, reflexos profundos e superficiais. A marcha é discretamente parética, com movimentos basculantes discretos das ancas, característico de marcha miopática. Relativamente aos reflexos profundos, a doente apresentava abolição dos reflexos patelar e aquiliano bilateralmente, mas com o cutâneo plantar em flexão presente e simétrico. Os reflexos dos membros superiores (tricipital, bicipital e radial) encontravam-se diminuídos e os três reflexos cutâneo abdominais estavam presentes. Relativamente à avaliação global da força, a doente consegue manter a posição na manobra de Mingazinni realizada com um membro inferior de cada vez e na manobra de Barré. A força muscular segmentar foi avaliada segundo a Escala MRC, estando o resultado apresentado na tabela 2.10.

**Tabela 2.10** - Avaliação da força muscular segmentar da doente #2 com a Escala MRC (prévia ao início da TRE).

Membros superiores	Membro direito	Membro esquerdo
Flexão braços/antebraços	4/5	4/5
Extensão braços/antebraços	4/5	4/5
Abdução braços	4/5	4/5
Adução braços	4/5	4/5

Membros inferiores	Membro direito	Membro esquerdo
Flexão coxas	4/5	4/5
Extensão coxas	4/5	4/5
Dorsiflexão pés	4/5	4/5

Em Janeiro de 2012 foi realizada a pesquisa de anticorpos que demonstrou a manutenção de títulos normais (tabela 2.11).

**Tabela 2.11** - Valores obtidos na pesquisa de anticorpos (após 4 meses de TRE).

Anticorpo	Valor obtido	Valor de Referência
IgA	171 mg/dL	70-400 mg/dL
IgG	963 mg/dL	700-1600 mg/dL
IgM	160 mg/dL	40-230 mg/dL

Recentemente, em Maio de 2012 e após 7 meses de TRE, a doente foi reavaliada. Esta reavaliação revelou manutenção da marcha descrita anteriormente e ausência dos reflexos profundos patelares e aquilianos com manutenção do cutâneo-plantar em flexão. Reflexos tricipitais e radiais diminuídos bilateralmente e bicipital normal e simétrico. Os cutâneo abdominais presentes mas diminuídos. Na manobra de Mingazinni, a doente não consegue manter os membros inferiores em posição, nem realizando a manobra apenas com um membro de cada vez. Realizou-se também avaliação da força segmentar com a escala MRC, sendo o resultado obtido apresentado na tabela 2.12.

Tabela 2.12 - Avaliação da força muscular segmentar da doente #2 com a Escala MRC (após 7 meses de TRE).

Membros superiores	Membro direito	Membro esquerdo
Flexão braços/antebraços	4/5	4/5
Extensão braços/antebraços	4/5	4/5
Abdução braços	4/5	4/5
Adução braços	4/5	4/5
Membros inferiores	Membro direito	Membro esquerdo
Flexão coxas	4/5	4/5
Extensão coxas	4	4
Abdução coxas	4/5	4/5
Adução coxas	4/5	4/5
Dorsiflexão pés	4/5	4/5
Extensão pés	4/5	4/5

## 2.2 - Discussão dos casos clínicos

A doença de Pompe de início tardio, tal como foi referido, tem uma apresentação clínica insidiosa traduzida por sinais e sintomas inespecíficos que são muitas vezes desvalorizados quer pelo doente, quer pelo clínico resultando num longo intervalo de tempo entre o início dos sintomas e a suspeição da existência de doença de Pompe. Foi exatamente isto que ocorreu com a doente #1, que iniciou sintomatologia inespecífica com dor lombar por volta dos 25 anos, com posterior dificuldade na marcha e teve dois períodos de internamento para investigação etiológica. Relativamente à doente #2 todo o processo foi muito mais célere devido ao diagnóstico confirmado de doença de Pompe da irmã, a doente #1.

Relativamente ao tipo de exames complementares de diagnóstico realizados por cada uma delas, estes foram até certo ponto distintos por vários motivos. Primeiro porque nestes últimos anos ocorreu um grande investimento no desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas, menos invasivas e mais específicas, alterando-se por isso o tipo de exames complementares de diagnóstico recomendados. Em segundo lugar, a doente #2 como tinha a irmã com o diagnóstico confirmado e apresentava já sintomatologia consistente com o quadro clínico de doença de Pompe, foi assim possível excluir a realização da biópsia muscular e EMG, passando diretamente à determinação da atividade enzimática da  $\alpha$ -glicosidase ácida. A doente #1, por se apresentar com um quadro clínico evidentemente miopático de etiologia desconhecida e devido à idade que apresentava na altura (70 anos), realizou a biópsia

muscular e EMG. Estes serviram para confirmar a existência de alterações miopáticas ao nível do músculo-esquelético e apenas posteriormente e já com a confirmação histopatológica é que se realizou o doseamento dos oligossacarídeos urinários e a determinação da atividade da  $\alpha$ -glicosidase ácida em leucócitos de sangue total periférico. Estas análises revelaram uma excreção aumentada de oligossacarídeos urinários e uma atividade bastante reduzida de  $\alpha$ -glicosidase ácida (3 nmol/h/mg proteína). Para confirmação diagnóstica a doente realizou estudo genético e a determinação da atividade enzimática em amostra de cultura de fibroblastos cutâneos, tendo-se obtido resultados consistentes com o diagnóstico de doença de Pompe. No caso da doente #2, esta realizou a determinação da atividade enzimática em leucócitos de sangue periférico e posteriormente para confirmação diagnóstico realizou a mesma análise em amostra de cultura de fibroblastos e análise genética. A análise genética da doente #2 revelou a existência de 2 mutações descritas como causais de doença de Pompe, a c.-32-13T>G (mais frequentemente encontrada na população caucasiana) e a c.2237G>A (p.W746X). De realçar que estas doentes, ambas com a forma tardia da doença, apesar de apresentarem valores enzimáticos muitíssimo reduzidos, apenas iniciaram sintomatologia evidente já muito tardiamente por volta dos 50-60 anos.

Relativamente à evolução das doentes face à instituição da TRE, no caso da doente #2, como ao momento do início da TRE esta ainda não apresentava sintomatologia muito proeminente e ainda realizou apenas 7 meses de TRE, os resultados são ainda pouco evidentes. No entanto, a doente refere ter melhorado o cansaço de que se vinha a queixar ao longo dos últimos anos. No caso da doente #1, esta já realizou 16 meses de TRE e quando comparamos a avaliação “basal” no início do tratamento com a última avaliação, realizada em Maio de 2012, chegamos à conclusão que a doente tem de facto beneficiado do tratamento. Este benefício é demonstrado de forma direta pelos resultados obtidos nos testes de força muscular segmentar e de forma indireta, através do relato da doente que refere sentir-se muito melhor e ter conseguido retomar a realização de tarefas da vida diária que já há algum tempo tinha deixado de conseguir realizar.

É evidente que nos casos de início tardia da doença de Pompe, os efeitos benéficos da TRE podem não ser tão evidentes como no caso da forma infantil da doença, porém, através do relato do caso #1 podemos inferir que apesar do benefício da TRE poder ser limitado no caso destes doentes, ocorre sem dúvida uma melhoria significativa na qualidade de vida que deve ser tida em atenção. A tabela 2.13 estabelece uma comparação sumária entre os dois casos clínicos.

Tabela 2.13 - Comparação sumária dos dois casos clínicos.

Doente	Género	Idade de início dos sintomas (anos)	Idade de diagnóstico (anos)	Idade atual (anos)	TRE (meses)	<u>Exame Neurológico</u> Local de Fraqueza Muscular	<u>Exame Neurológico</u> Escala de Força Muscular MRC	Função Respiratória	EMG	CK (26-155 U/l)	$\alpha$ -glicosidase ácida em leucócitos totais de sangue periférico (44, 1-144 nmol/h/mg proteína)
#1	F	50-60	71	75	16	Músculos da cintura pélvica	2/3	BiPAP (início a 26/3/2009)	Padrão Miopático	41	3
#2	F	65	68	68	7	Músculos da cintura pélvica	4/5	—	—	—	0

F: Feminino; TRE: Terapêutica de Substituição Enzimática; MRC: Medical Research Council; EMG: Eletromiografia; CK: Creatina fosfoquinase



## Capítulo 3

### Conclusão

A doença de Pompe, em todo o seu espectro clínico, é por vezes difícil de diagnosticar devido à inespecificidade sintomática e pelo facto de ser uma doença rara. No entanto, face ao desenvolvimento da nova terapêutica de reposição enzimática com alglucosidase- $\alpha$ , impõe-se o diagnóstico atempado desta doença, uma vez que a TRE melhora os sintomas e a qualidade de vida dos doentes, aumentando significativamente a sua esperança média de vida.

Nos próximos tempos, com os resultados de estudos que avaliam a eficácia da TRE irão certamente estabelecer-se *guidelines* cada vez mais pormenorizadas de forma a que os doentes recebam o melhor tratamento possível.

Estes dois casos clínicos ajudam-nos certamente a compreender a importância do tratamento dos doentes com a forma tardia da doença, mesmo que em termos fisiopatológicos os benefícios da TRE sejam aparentemente ténues.



## Referências Bibliográficas

1. Muraoka T, Murao K, Imachi H, Kikuchi F, Yoshimoto T, Iwama H, Hosokawa H, Nishino I, Fukuda T, Sugie H, Adachi K, Nanba E, Ishida T. Novel mutations in the Gene Encoding Acid  $\alpha$ -1,4-glucosidase in a patient with Late-onset Glycogen Storage Disease Type II (Pompe Disease) with Impaired Intelligence. *Intern Med.* 2011;50(24):2987-2991.
2. Hagemans ML, Winkel LP, Van Doorn PA, Hop WJ, Loonen MC, Reuser AJ, Van der Ploeg AT. Clinical manifestations and natural course of late-onset pompe's disease in 54 Dutch patients. *Brain.* 2005 Mar; 128(3):671-677.
3. van der Ploeg AT, Reuser AJ. Pompe's Disease. *Lancet.* 2008 Oct; 372(9646):1342-1353.
4. Al-Lozi MT, Amato AA, Barohn RJ, Cupler EJ, Kishnani PS, Leshner RT, Mozaffar T. Diagnostic criteria for late-onset (childhood and adult) Pompe disease. *Muscle Nerve.* 2009 Jul; 40(1):149-160.
5. JC Pompe. Over idiopathische hypertrophie van het hart. *Ned Tijdschr Geneesk.* 1932; 76:304-312.
6. Parkinson-Lawrence EJ, Shandala T, Prodoehl M, Plew R, Borlace GN, Brooks DA. Lysosomal storage disease: revealing lysosomal function and physiology. *Physiology (Bethesda).* 2010 Apr; 25(2):102-115.
7. Hug G, Schubert WK. Lysosomes in type II glycogenosis. Changes during administration of extract from *Aspergillus niger*. *J Cell Biol.* 1967 Oct; 35(1):1-6.
8. Angelini C, Semplicini C. Metabolic Myopathies: the challenge of new treatments. *Curr Opin Pharmacol.* 2010; 10(3):338-345.
9. McVie-Wylie AJ, Lee KL, Qiu H, Jin X, Do H, Gotschall R, Thurberg BL, Rogers C, Raben N, O'Callaghan M, Canfield W, Andrews L, McPherson JM, Mattaliano RJ. Biochemical and Pharmacological characterization of diferente recombinante acid alfa-glucosidase preparations evaluated for the treatment of Pompe Disease. *Mol Genet Metab.* 2008 Aug; 94(4):448-455.
10. Pompe center [Homepage na internet]. 2012 [acesso em 20 Janeiro 2012]. Disponível em: [http://www.erasmusmc.nl/klinische\\_genetica/research/pompe\\_center/?lang=en](http://www.erasmusmc.nl/klinische_genetica/research/pompe_center/?lang=en)
11. Strothotte S, Strigl-Pill N, Grunert B, Kornblum C, Eger K, Wessig C, Deschauer M, Breunig F, Glocker FX, Vielhaber S, Brejova A, Hiltz M, Reiners K, Müller-Felber W, Mengel E, Spranger M, Schoser B. Enzyme replacement therapy with alglucosidase alfa in 44 patients with late-onset glycogen storage disease type 2: 12-month results of an observational clinical trial. *J Neurol.* 2010 Jan; 257(1):91-97.
12. Kanters TA, Hagemans ML, van der Beek NA, Rutten FF, van der Ploeg AT, Hakkaart L. Burden of illness of Pompe disease in patients only receiving supportive care. *J Inheret Metab Dis.* 2011; 34(5):1045-1052.

13. Papadimas GK, Spengos K, Konstantinopoulou A, Vassilopoulou S, Vontzalidis A, Papadopoulos C, Michelakakis H, Manta P. Adult Pompe disease: Clinical manifestations and outcome of the first Greek patients receiving enzyme replacement therapy. *Clin Neurol Neurosurg.* 2011; 113(4):303-307.
14. Cupler EJ, Berger KI, Leshner RT, Wolfe GI, Han JJ, Barohn RJ, Kissel JT; AANEM Consensus Committee on Late-onset Pompe Disease. Consensus Treatment recommendations for late-onset pompe disease. *Muscle Nerve.* 2012 Mar; 45(3):319-333.
15. Kishnani PS, Steiner RD, Bali D, Berger K, Byrne BJ, Case LE, Crowley JF, Downs S, Howell RR, Kravitz RM, Mackey J, Marsden D, Martins AM, Millington DS, Nicolino M, O'Grady G, Patterson MC, Rapoport DM, Slonim A, Spencer CT, Tiffet CJ, Watson MS. Pompe disease diagnosis and management guideline. *Genet Med.* 2006 May; 8(5):267-288.
16. Tinkle BT, Leslie N. Glycogen Storage Disease Type II (Pompe Disease) 2007 Aug 31 [Updated 2010 Aug 12]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2012.
17. Kuo WL, Hirschhorn R, Huie ML, Hirschhorn K. Localization and ordering of acid alpha-glucosidase (GAA) and thymidine kinase (TK1) by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet.* 1996 Mar; 97(3):404-406.
18. Labrousse P, Chien YH, Pomponio RJ, Keutzer J, Lee NC, Akmaev VR, Scholl T, Hwu WL. Genetic heterozygosity and pseudodeficiency in the Pompe disease newborn screening pilot program. *Mol Genet Metab.* 2010 Apr; 99(4):379-383.
19. Kroos M, Hoogeveen-Westerveld M, van der Ploeg A, Reuser AJ. The genotype-phenotype correlation in Pompe disease. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2012 Feb; 160(1):59-68.
20. Kroos MA, Pomponio RJ, Hagemans ML, Keulemans JL, Phipps M, DeRiso M, Palmer RE, Ausems MG, Van der Beek NA, Van Diggelen OP, Halley DJ, Van der Ploeg AT, Reuser AJ. Broad spectrum of Pompe disease in patients with the same c.-32-13T->G haplotype. *Neurology.* 2007 Jan; 68(2):110-115.
21. Raben N, Takikita S, Pittis MG, Bembi B, Marie SK, Roberts A, Page L, Kishnani PS, Schoser BG, Chien YH, Ralston E, Nagaraju K, Plotz PH. Deconstructing Pompe disease by analyzing single muscle fibers: to see a world in a grain of sand... *Autophagy.* 2007 Nov-Dec; 3(6):546-552.
22. Hesselink RP, Wagenmakers AJ, Drost MR, Van der Vusse GJ. Lysosomal dysfunction in muscle with special reference to glycogen storage disease type II. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Mar; 1637(2):164-170.
23. Hendriksz CJ, Gissen P. Glycogen storage disease. *Pediatrics and child health.* 2010. 21(2):84-89
24. Shimada Y, Kobayashi H, Kawagoe S, Aoki K, Kaneshiro E, Shimizu H, Eto Y, Ida H, Ohashi T. Endoplasmic reticulum stress induces autophagy through activation of p38

- MAPK in fibroblasts from Pompe disease patients carrying c.546GNT mutation. *Mol Genet Metab.* 2011 Dec; 104(4):566-573.
25. Winkel LP, Hagemans ML, van Doorn PA, Loonen MC, Hop WJ, Reuser AJ, van der Ploeg AT. The natural course of non-classic Pompe's disease: a review of 225 published cases. *J Neurol.* 2005 Aug; 252(8):875-884.
  26. Dubrovsky A, Corderi J, Lin M, Kishnani PS, Jones HN. Expanding the phenotype of late-onset pompe disease: tongue weakness: a new clinical observation. *Muscle Nerve.* 2011 Dec;44(6):897-901.
  27. Llerena JC Jr, Horovitz DM, Marie SK, Porta G, Giugliani R, Rojas MV, Martins AM; Brazilian Network for Studies in Pompe Disease (ReBrPOM). The Brazilian Consensus on the Management of Pompe Disease. *J Pediatr.* 2009 Oct; 155(4 Suppl):S47-56.
  28. Bernstein DL, Bialer MG, Mehta L, Desnick RJ. Pompe disease: dramatic improvement in gastrointestinal function following enzyme replacement therapy. A report of three later-onset patients. *Mol Genet Metab.* 2010 Oct-Nov; 101(2-3):130-133.
  29. Soliman OI, van der Beek NA, van Doorn PA, Vletter WB, Nemes A, Van Dalen BM, ten Cate FJ, van der Ploeg AT, Geleijnse ML. Cardiac involvement in adults with Pompe disease. *J Intern Med.* 2008 Oct; 264(4):333-339.
  30. Sacconi S, Bocquet JD, Chanalet S, Tanant V, Salviati L, Desnuelle C. Abnormalities of cerebral arteries are frequent in patients with late-onset Pompe disease. *J Neurol.* 2010 Oct; 257(10):1730-1733.
  31. Nemes A, Soliman OI, Geleijnse ML, Anwar AM, van der Beek NA, van Doorn PA, Gavallér H, Csajbók E, ten Cate FJ. Increased aortic stiffness in glycogenosis type 2 (pompe's disease). *Int J Cardiol.* 2007 Aug; 120(1):138-141.
  32. Pompe Disease Diagnostic Working Group, Winchester B, Bali D, Bodamer OA, Caillaud C, Christensen E, Cooper A, Cupler E, Deschauer M, Fumić K, Jackson M, Kishnani P, Lacerda L, Ledvinová J, Lugowska A, Lukacs Z, Maire I, Mandel H, Mengel E, Müller-Felber W, Piraud M, Reuser A, Rupar T, Sinigerska I, Szlago M, Verheijen F, van Diggelen OP, Wuyts B, Zakharova E, Keutzer J. Methods for a prompt and reliable laboratory diagnosis of Pompe disease: Report from an international consensus meeting. *Mol Genet Metab.* 2008 Mar; 93(3):275-281.
  33. Hoeksma M, Boon M, Niezen-Koning KE, van Overbeek-van Gils L, van Spronsen FJ. Isolated elevated serum transaminases leading to the diagnosis of asymptomatic Pompe disease. *Eur J Pediatr.* 2007 Aug; 166(8):871-874.
  34. Manwaring V, Prunty H, Bainbridge K, Burke D, Finnegan N, Franses R, Lam A, Vellodi A, Heales S. Urine analysis of glucose tetrasaccharide by HPLC; a useful marker for the investigation of patients with Pompe and other glycogen storage diseases. *J Inherit Metab Dis.* 2012 Mar; 35(2):311-316.
  35. Bali DS, Tolun AA, Goldstein JL, Dai J, Kishnani PS. Molecular analysis and protein processing in late-onset pompe disease patients with low levels of acid  $\alpha$ -glucosidase activity. *Muscle Nerve.* 2011 May; 43(5):665-670.

36. Raben N, Ralston E, Chien YH, Baum R, Schreiner C, Hwu WL, Zaal KJ, Plotz PH. Differences in the predominance of lysosomal and autophagic pathologies between infants and adults with Pompe disease: implications for therapy. *Mol Genet Metab.* 2010; 101(4):324-331.
37. Prajnaya R, Rehder C, Phadke SR, Bali D. Prenatal diagnosis of Pompe Disease - Enzyme Assay or Molecular testing? 2010. Prajnaya. *Indian Pediatr.* 2011 Nov; 48:901-902.
38. Chien YH, Lee NC, Huang HJ, Thurberg BL, Tsai FJ, Hwu WL. Later-Onset Pompe Disease: Early Detection and Early Treatment Initiation Enabled by Newborn Screening. *J Pediatr.* 2011 Jun; 158(6):1023-1027.
39. Oda E, Tanaka T, Migita O, Kosuga M, Fukushi M, Okumiya T, Osawa M, Okuyama T. Newborn screening for Pompe disease in japan. *Mol Genet Metab.* 2011 Dec; 104(4):560-565.
40. Moreland RJ, Jin X, Zhang XK, Decker RW, Albee KL, Lee KL, Cauthron RD, Brewer K, Edmunds T, Canfield WM. Lysosomal acid alpha-glucosidase consists of four different peptides processed from a single chain precursor. *J Biol Chem.* 2005 Feb; 280(8):6780-6791.
41. Carlier RY, Laforet P, Wary C, Mompoin D, Laloui K, Pellegrini N, Annane D, Carlier PG, Orlikowski D. Whole-body muscle MRI in 20 patients suffering from late onset Pompe disease: Involvement patterns. *Neuromuscul Disord.* 2011 Nov; 21(11):791-799.
42. Pichiecchio A, Uggetti C, Ravaglia S, Egitto MG, Rossi M, Sandrini G, Danesino C. Muscle MRI in adult-onset acid maltase deficiency. *Neuromuscul Disord.* 2004 Jan; 14(1):51-55.
43. Hagemans ML, Stigter RL, van Capelle CI, van der Beek NA, Winkel LP, van Vliet L, Hop WC, Reuser AJ, Beishuizen A, van der Ploeg AT. PAS-positive lymphocyte vacuoles can be used as diagnostic screening test for Pompe disease. *J Inherit Metab Dis.* 2010 Apr; 33(2):133-139.
44. van Capelle CI, Goedegebure A, Homans NC, Hoeve HL, Reuser AJ, van der Ploeg AT. Hearing loss in Pompe disease revisited: results from a study of 24 children. *J Inherit Metab Dis.* 2010 Oct; 33(5):597-602.
45. Haley SM, Fragala MA, Aseltine R, Ni P, Skrinar AM. Development of a disease-specific disability instrument for Pompe disease. *Pediatr Rehabil.* 2003 Apr-Jun; 6(2):77-84.
46. Hoeksma M, Boon M, Niezen-Koning KE, van Overbeek-van Gils L, van Spronsen FJ. Isolated elevated serum transaminases leading to the diagnosis of asymptomatic Pompe disease. *Eur J Pediatr.* 2007 Aug; 166(8):871-874.
47. van der Beek NA, Verschuure H, Reuser AJ, van der Ploeg AT, van Doorn PA, Poublon RM. Hearing in adults with Pompe disease. *J Inherit Metab Dis.* 2012 Mar; 35(2):335-341.
48. Güngör D, de Vries JM, Hop WC, Reuser AJ, van Doorn PA, van der Ploeg AT, Hagemans ML. Survival and associated factors in 268 adults with Pompe disease prior to treatment with enzyme replacement therapy. *Orphanet J Rare Dis.* 2011; 6:34.

49. Angelini C, Semplicini C. Enzyme Replacement Therapy for Pompe Disease. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2012; 12(1):70-75.
50. Hoeksma M, Boon M, Niezen-Koning KE, van Overbeek-van Gils L, van Spronsen FJ. Isolated elevated serum transaminases leading to the diagnosis of asymptomatic Pompe disease. *Eur J Pediatr.* 2007 Aug; 166(8):871-874.
51. van der Ploeg AT, Clemens PR, Corzo D, Escolar DM, Florence J, Groeneveld GJ, Herson S, Kishnani PS, Laforet P, Lake SL, Lange DJ, Leshner RT, Mayhew JE, Morgan C, Nozaki K, Park DJ, Pestronk A, Rosenbloom B, Skrinar A, van Capelle CI, van der Beek NA, Wasserstein M, Zivkovic SA. A randomized Study of Alglucosidase Alfa in Late-Onset Pompe's Disease. *N Engl J Med.* 2010 Apr; 362(15):1396-1406.
52. Rohrbach M, Klein A, Köhli-Wiesner A, Veraguth D, Scheer I, Balmer C, Lauener R, Baumgartner MR. CRIM-negative infantile Pompe disease: 42-month treatment outcome. *J Inherit Metab Dis.* 2010 Dec; 33(6):751-757.
53. Case LE, Hanna R, Frush DP, Krishnamurthy V, DeArmev S, Mackey J, Boney A, Morgan C, Corzo D, Bouchard S, Weber TJ, Chen YT, Kishnani PS. Fractures in children with Pompe disease: a potencial long-term complication. *Pediatr Radiol.* 2007 May; 37(5):437-445.
54. Strothotte S, Strigl-Pill N, Grunert B, Kornblum C, Eger K, Wessig C, Deschauer M, Breunig F, Glocker FX, Vielhaber S, Brejova A, Hiltz M, Reiners K, Müller-Felber W, Mengel E, Spranger M, Schoser B. Enzyme replacement therapy with alglucosidase alfa in 44 patients with late-onset glycogen storage disease type 2: 12-month results of an observational clinical trial. *J Neurol.* 2010 Jan; 257(1):91-97.
55. van der Ploeg AT. Where do we stand in enzyme replacement therapy in Pompe's disease? *Neuromuscul Disord.* 2010; 20(12):773-774.
56. de Vries JM, van der Beek NA, Kroos MA, Ozkan L, van Doorn PA, Richards SM, Sung CC, Brugma JD, Zandbergen AA, van der Ploeg AT, Reuser AJ. High antibody titer in an adult with Pompe disease affects treatment with alglucosidase alfa. *Mol Genet Metab.* 2010 Dec; 101(4):338-345.
57. Shimada Y, Nishida H, Nishiyama Y, Kobayashi H, Higuchi T, Eto Y, Ida H, Ohashi T. Proteasome inhibitors improve the function of mutant lysosomal  $\alpha$ -glucosidase in fibroblasts from Pompe disease patient carrying c.546G>T mutation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Nov; 415(2):274-278.