

POSITION PAPER

IL DEFICIT DELLA LIPASI ACIDA LISOSOMIALE: UNA CAUSA SPESSO NON DIAGNOSTICATA DI MALATTIA EPATICA E DI DISLIPIDEMIA*

Lisosomal acid lipase deficiency: an often non-diagnosed cause of liver disease and hyperlipidemia

FRANCESCO ANGELICO¹, MAURIZIO AVERNA², ALBERICO L. CATAPANO³, SILVIA FARGION⁴, ORNELLA GUARDAMAGNA⁵, GIUSEPPE INDOLFI⁶, SANDRO MUNTONI⁷, VALERIO NOBILI⁸

¹Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza, Università degli Studi di Roma; ²Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica, Università degli Studi di Palermo; ³Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano; ⁴Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi di Milano; ⁵Dipartimento di Scienze della Sanità Pubblica e Pediatriche, Università degli Studi di Torino; ⁶Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer, Pediatria Medica, Firenze; ⁷Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli studi di Cagliari; ⁸Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

*Gli autori si sono incontrati per la stesura di una bozza del position paper a Milano il 26/02/2016. La riunione è stata supportata da un grant incondizionato della Alexion Pharma Italy.

SUMMARY

Lysosomal acid lipase (LAL) is a key enzyme for lysosomal cholesterol ester hydrolysis. LAL deficiency is a rare autosomal recessive genetic disorder affecting LIPA gene, which promotes an increased cholesterol ester storage in lysosomes. Wolman disease and cholesterol ester storage disease (CESD) are two rare genetic diseases characterized by a clinical continuum due to the size of the residual activity of the LAL which is absent in the case of Wolman disease, and greatly reduced (<10%) in the case of the CESD. Wolman disease is characterized by total LAL deficiency and has an early onset phenotype with hepato-splenomegaly, malabsorption, rapid multi-organ failure and death within the first year of life. CESD is a less severe disease which may develop during childhood and adulthood and the diagnosis is often casual. It is characterized by accelerated atherosclerosis, hypercholesterolemia and fatty liver rapidly progressing to fibrosis and cirrhosis. LAL deficiency should be always suspected in non-obese patients, diagnosed with NAFLD and / or cryptogenic cirrhosis, unexplained persistently elevated transaminases or with high levels of triglycerides, LDL cholesterol and low HDL cholesterol.

Key words: lysosomal acid lipase, Wolman disease, cholesterol ester storage disease (CESD), non-alcoholic fatty liver disease, hypercholesterolemia.

Indirizzo per la corrispondenza

Francesco Angelico
Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive - Sapienza, Università degli Studi di Roma
I Clinica Medica - Policlinico Umberto I - Viale del Policlinico, 155 - 00161 Roma
E-mail: francesco.angelico@uniroma1.it

La lipasi acida lisosomiale

La lipasi acida lisosomiale (LAL) è un enzima coinvolto nel metabolismo intracellulare dei lipidi. Essa è responsabile all'interno dei lisosomi dell'idrolisi degli esteri di colesterolo e, in misura minore, dei trigliceridi in colesterolo libero ed acidi grassi (1).

Il difetto di lipasi acida lisosomiale è un raro disordine genetico autosomico recessivo a carico del gene LIPA, caratterizzato da accumulo di esteri del colesterolo (CE) e trigliceridi in diversi tessuti (2). La riduzione di attività della LAL determina un accumulo intra-lisosomiale di lipidi ed una conseguente riduzione del colesterolo libero nel citosol. Ciò può promuovere l'attività delle proteine che regolano la sintesi di steroli (SREBPs) causando un aumento della lipogenesi e della biosintesi di colesterolo e VLDL (3, 4). Contemporaneamente, vi è una riduzione dell'espressione di recettori X del fegato (LXR) che causa la riduzione dell'efflusso del colesterolo e della sintesi delle HDL (Figura 1). La tipica dislipidemia descritta nei pazienti con mutazioni omozigote del gene LIPA è una dislipidemia con fenotipo prevalentemente di tipo IIB; quindi dislipidemia mista con ipoalfalipoproteinemia (5, 6).

I difetti congeniti di attività della LAL

La mutazione più comune è la variante E8SJM, una singola mutazione a carico del gene LIPA a livello della giunzione dell'esone 8 (5). La mutazione E8SJM è stata descritta nel 56-60% dei casi di deficit della LAL (LAL-D) riscontrati nei bambini e negli adulti. La prevalenza stimata del deficit di lipasi acida varia da 1 a 40.000 a 1 a 300.000 nelle diverse popolazioni studiate. Muntoni et al. (7), in uno studio di epidemiologia genetica effettuato in una

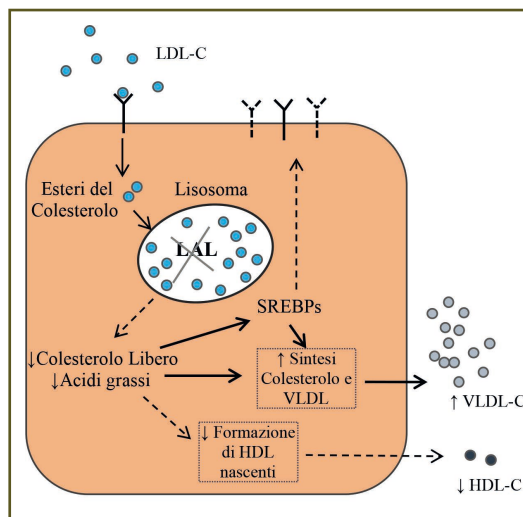


Figura 1 - Deficit di LAL e alterato metabolismo intracellulare dei lipidi: la ridotta attività della LAL determina un accumulo intra-lisosomiale di lipidi ed una conseguente riduzione del colesterolo libero nel citosol, che promuove a sua volta l'attività delle proteine che regolano la sintesi di steroli (SREBPs), causando un aumento della sintesi di colesterolo e di VLDL; si verifica, inoltre, una riduzione dell'espressione di recettori X del fegato (LXR), con conseguente riduzione dell'efflusso del colesterolo e della sintesi delle HDL.

popolazione tedesca afferente allo Studio PROCAM, hanno trovato una frequenza allelica di 0,0025, ossia un portatore della E8SJM ogni 200 abitanti.

La malattia di Wolman e la malattia da accumulo degli esteri del colesterolo (CESD) sono malattie genetiche rare dovute all'accumulo lisosomiale prevalentemente di esteri di colesterolo, conseguente all'assente o fortemente ridotta attività della LAL (8-10).

Le due malattie rappresentano un continuum clinico dovuto all'entità dell'attività residua della LAL che risulta assente nel caso della malattia di Wolman e fortemente ridotta (<10%) nel caso della CESD. La gravità del quadro clinico dipende dal livello dell'attività residua della LAL (11).

La malattia di Wolman, ad esordio pre-

coce, si manifesta più frequentemente durante il sesto o settimo mese di vita e porta rapidamente a morte. È tuttavia possibile che l'esordio possa essere più precoce e che i sintomi della malattia siano già presenti fin dalle prime settimane di vita. I lattanti con difetto di LAL mostrano una crescita ritardata, associata a segni di malassorbimento, epatosplenomegalia, severa disfunzione epatica, anemia rapidamente progressiva e insufficienza multi-organo. Le calcificazioni surrenaliche sono il segno patognomonico della malattia di Wolman, anche se tale segno non è frequente e riguarda circa il 20% dei casi (12). La sopravvivenza oltre l'anno di età è un evento molto raro (13).

La CESD è il fenotipo a insorgenza tardiva. Il quadro clinico può essere molto variabile (9). Esso si presenta con steatosi epatica, elevati livelli di aminotransferasi, epatomegalia e dislipidemia, caratterizzata da elevati livelli di colesterolo associato a lipoproteine a bassa densità (LDL-C) e bassi valori di colesterolo associato a lipoproteine ad alta densità (HDL-C), più frequentemente con rialzo dei trigliceridi. La CESD può manifestarsi durante l'infanzia, l'adolescenza o in età adulta e spesso non

viene diagnosticata, poiché si presenta con sintomi che si confondono con quelli di altre condizioni cliniche. I pazienti hanno un'età variabile alla presentazione clinica della malattia, andando da 5 a 44 anni o anche più; quest'ultima si caratterizza per un decorso più mite.

La storia naturale e le manifestazioni cliniche della CESD sono più sfumate rispetto a quelle della malattia di Wolman, così la diagnosi è spesso occasionale. Comune è il riscontro di una dislipidemia e spesso i pazienti presentano all'esordio segni sistemici di aterosclerosi. L'epatomegalia e la splenomegalia, accompagnate da quadri di steatosi microvescicolare e danno degli epatociti, rimangono le caratteristiche più frequenti della patologia. Le principali caratteristiche cliniche e l'attività enzimatica nei difetti congeniti di LAL sono riassunti nella *Figura 2*.

Le riduzioni di attività della LAL di origine non genetica

Nella popolazione sana è stata osservata una notevole variabilità dell'attività della LAL, anche in assenza di mutazioni genetiche omozigoti o eterozigoti del gene LIPA. Tuttavia, ad oggi non si conoscono i fattori epigenetici, ambientali, clinici e metabolici in grado di modulare l'attività della LAL nei soggetti che presentano una ridotta attività in assenza di difetti genetici. Inoltre, non sono noti i quadri clinici secondari in presenza di riduzioni dell'attività della LAL di origine non genetica.

Recentemente, è stata dimostrata per la prima volta una ridotta attività di LAL nel sangue di pazienti con NAFLD (14). L'attività della LAL risultava particolarmente ridotta in 240 pazienti con NAFLD, comparata con quella di 100 soggetti sani [0,78 (0,61-1,01) vs 1,15 (0,94-1,72) nmol/spot/h, p <0,001]. Inoltre, i pazienti NA-

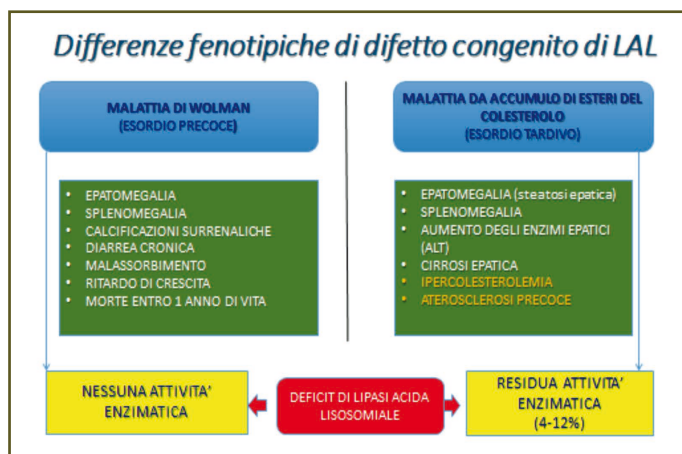


Figura 2 - Caratteristiche cliniche e attività enzimatica nei difetti congeniti di lipasi acida lisosomiale.

In quali soggetti misurare l'attività della LAL?

Nei pazienti con inspiegabile:

- MALATTIA EPATICA (≥ 1 dei seguenti)
 Persistente aumento delle ALT
 Presenza di epatomegalia
 Presenza di steatosi
 (In soggetti con BMI < 30)
 E/O
- DISLIPIDEMIA (≥ 1 dei seguenti)
 Aumentato colesterolo LDL
 (≥ 160 mg/dl - 4.1 mmol/L)
 Basso colesterolo HDL (≤ 40 mg/dl nei maschi;
 ≤ 50 mg/dl nelle femmine)
 (In assenza di familiarità
 per ipercolesterolemia)

Figura 3 - Principali indicazioni per la ricerca di deficit di attività della LAL.

FLD con attività enzimatica al di sotto della mediana avevano valori più alti di colesterolo totale sierico ($p < 0,05$) e colesterolo LDL-C ($p < 0,05$), e livelli sierici più elevati di aminotransferasi (ALT, $p < 0,001$; AST, $p < 0,01$; GGT, $p < 0,01$). Inoltre, stratificando i pazienti in base alla presenza di steatosi semplice o di NASH diagnosticata istologicamente, veniva osservato un progressivo decremento dell'attività di LAL nei soggetti sani rispetto ai pazienti con steatosi semplice [0,84 (0,62-1,08) nmol/spot/h, $p < 0,001$] e a quelli con NASH [0,67 (0,51-0,77) nmol/spot/h, $p < 0,001$ vs. soggetti sani HS; $p < 0,001$, tra i gruppi] (15). Recentemente è stata inoltre dimostrata una correlazione tra bassi livelli enzimatici di LAL e progressione del danno fibrotico epatico in adolescenti Italiani affetti da steatoepatite non-alcolica (16).

Interessanti, infine, i risultati preliminari di alcune ricerche che hanno documentato una riduzione significativa dell'attività della LAL nei soggetti con cirrosi criptogenetica e una correlazione fra attività enzimatica e severità clinica ed istologica della cirrosi (17, 18).

L'impiego del DBS (dried blood spot) per la diagnosi del deficit di lipasi acida lisosomiale

L'attività della LAL viene misurata per mezzo di un test rapido di screening su gocce di sangue essiccato (DBS - dried blood spot) (19). Il metodo DBS è impiegato da alcuni anni per lo screening delle malattie genetiche neonatali. Esso si basa sull'applicazione di una singola goccia di sangue su una carta da filtro che viene lasciata asciugare all'aria. La goccia può essere ottenuta da sangue capillare «a caduta» dal polpastrello oppure da sangue raccolto in EDTA tramite puntura venosa. In entrambi i casi occorre porre particolare attenzione affinché l'alcool, utilizzato per disinfettare la zona del prelievo, sia del tutto evaporato prima di procedere alla raccolta del campione. Inoltre, il sangue deve essere trasferito sullo spot di carta da filtro nel più breve tempo possibile e lasciato essiccare. Successivamente, ne viene rimosso un frammento di 3 mm, che viene trattato con solventi ed analizzato. Su un singolo campione si possono effettuare 50 dosaggi di differenti *markers*. Una volta essiccato, il campione può essere inserito in una busta apposita e spedito al laboratorio di riferimento per la determinazione dell'attività della LAL, dove viene misurata l'attività lipasica totale e quella in presenza di LALSTAT2, suo inibitore specifico.

I pazienti omozigoti per il deficit di attività della LAL hanno un'attività residua pari o prossima allo 0. Il limite inferiore del *range* di normalità nel test di validazione della metodica, è risultato di 0,8 nmol/spot/h.

In quali soggetti misurare l'attività della LAL?

Di particolare interesse è la misura dell'attività della LAL nei soggetti non

obesi con NAFLD o NASH e in quelli con persistente aumento degli enzimi epatici e con epato-splenomegalia difficilmente spiegabili. I pazienti con LAL-D vanno ricercati all'interno della popolazione NAFLD/NASH, soprattutto se una biopsia epatica ha mostrato la presenza di una steatosi microvescicolare. In questi pazienti è necessaria la diagnosi differenziale con altre patologie croniche del fegato, in particolare con il Morbo di Wilson, la NAFLD e la NASH metabolica, compresa la steatosi su base alcolica (20).

Altra forte indicazione alla misura dell'attività della LAL è la presenza di ipercolesterolemia, mista e non, sia in termini di aumento del colesterolo totale, trigliceridi e LDL, ma soprattutto di riduzione del colesterolo HDL; in particolare, negli adulti è fortemente indicativo l'aumento della colesterolemia LDL al di sopra di 160 mg/dl e la riduzione del colesterolo HDL al di sotto di 40 mg/dl. In questi pazienti è importante la diagnosi differenziale con l'Iperlipemia Combinata (fenotipo IIB), che si presenta con dislipidemia mista, ipoalfalipoproteinemia e steatosi epatica e con l'Ipercolesterolemia Familiare eterozigote (fenotipo IIA), che può essere esclusa in assenza di familiarità e di bassi valori di HDL. Valori soglia più bassi di colesterolemia (>130 mg/dl) possono costituire una forte indicazione alla misura dell'attività della LAL nei soggetti in età pediatrica.

Infine, il riscontro di NAFLD e/o NASH in pazienti non obesi con associata dislipidemia, dovrebbe comportare la diagnosi differenziale tra difetti di LAL e altre cause metaboliche di NAFLD, come la sindrome metabolica, il diabete di tipo 2 e l'ipertrigliceridemia.

In conclusione, una riduzione dell'attività della LAL dovrebbe essere sospettata sempre in pazienti non obesi, con diagnosi di NAFLD e/o cirrosi criptogenetica, in-

spiegabili livelli persistentemente elevati di transaminasi o con alti livelli di trigliceridi, colesterolo LDL e basso colesterolo HDL. In tutti questi pazienti occorre effettuare un'accurata anamnesi per escludere potenziali fattori che contribuiscono alla steatosi, come infezioni virali, abuso alcolico e presenza di Iperlipemia Combinata o Ipercolesterolemia Familiare.

Segni clinici caratteristici

Malattia di Wolman: presenza di vomito, diarrea, ritardo nella crescita in età infantile; epatomegalia e splenomegalia; malnutrizione; presenza di calcificazioni nelle ghiandole surrenaliche. La malattia è letale durante il primo anno di vita.

CESD: presenza di epato-splenomegalia, steatosi epatica microvescicolare e fibrosi, accumulo di lipidi nella parete addominale, xantelasmi. La malattia può portare a cirrosi epatica e ad insufficienza epatica. È frequente la presenza di una diffusa aterosclerosi precoce.

Perché è importante diagnosticare i difetti genetici di LAL?

Le malattie da deficit di attività della LAL sono malattie gravi che possono comportare un pericolo di vita. Sino a poco tempo fa non erano disponibili trattamenti specifici in grado di migliorare il decorso clinico della malattia. La terapia aveva pertanto l'obiettivo di fornire un supporto nutrizionale, di ridurre i livelli dei lipidi e proteggere nei confronti dell'arteriosclerosi. Tuttavia, non vi erano farmaci in grado di correggere le gravi manifestazioni epatiche che in taluni casi rendono necessario il ricorso al trapianto di fegato.

Dal 2015 esiste una terapia sostitutiva specifica mediante una lipasi acida lisosomiale umana ricombinante, la Sebelipasi

alfa - approvata inizialmente negli USA e quindi anche in Europa. Recentemente, uno studio di fase 3, pubblicato su *N Engl J Med* (21, 22), ha mostrato che la Sebelipasi-alfa, somministrata a 66 pazienti, sia adulti che bambini, affetti da deficit di lipasi acida lisosomiale, è in grado di ridurre significativamente le transaminasi, l'epatomegalia e la quantità del grasso epatico, con un miglioramento significativo dei lipidi plasmatici (riduzione del colesterolo LDL ed aumento del colesterolo HDL).

Poiché il deficit di attività della LAL è una malattia sotto diagnosticata e spesso confusa con l'Iperlipemia Combinata, con

l'Ipercolesterolemia Familiare o con l'epatopatia steatosica non alcolica, appare oggi molto importante effettuare una corretta diagnosi differenziale ed avviare precocemente al trattamento i soggetti affetti. Il trattamento sostitutivo potrebbe rappresentare una terapia salvavita per i pazienti con le forme più gravi ad esordio precoce ed una possibilità terapeutica nei casi ad esordio tardivo. In particolare, nei soggetti con CESD la terapia potrebbe essere utile per prevenire lo sviluppo di aterosclerosi precoce e rallentare la progressione della steatosi epatica verso l'epatite cronica e la cirrosi epatica.

RIASSUNTO

La lipasi acida lisosomiale (LAL) è un enzima responsabile all'interno dei lisosomi dell'idrolisi degli esteri di colesterolo. Il difetto di lipasi acida lisosomiale è un raro disordine genetico autosomico recessivo a carico del gene LIPA che determina un accumulo intra-lisosomiale di lipidi. La malattia di Wolman e la malattia da accumulo degli esteri del colesterolo (CESD) sono due rare malattie genetiche caratterizzate da un continuum clinico dovuto all'entità dell'attività residua della LAL, che risulta assente nel caso della malattia di Wolman e fortemente ridotta (<10%) nel caso della CESD. La malattia di Wolman è caratterizzata dal deficit totale di attività della LAL e dall'esordio precoce con epatosplenomegalia, severa disfunzione epatica, anemia rapidamente progressiva, insufficienza multi-organo e morte entro il primo anno di vita. La CESD può manifestarsi durante l'infanzia e l'età adulta. Il quadro clinico è meno grave e la diagnosi è spesso occasionale. È caratterizzata dalla presenza di arteriosclerosi accelerata, ipercolesterolemia e steatosi epatica con rapida progressione a fibrosi e cirrosi. Il deficit di attività della LAL dovrebbe essere sospettato sempre nei pazienti non obesi, con diagnosi di NAFLD e/o cirrosi criptogenetica, inspiegabili livelli persistentemente elevati di transaminasi o con alti livelli di trigliceridi, colesterolo LDL e basso colesterolo HDL.

Parole chiave: *lipasi acida lisosomiale, malattia di Wolman, malattia da accumulo di esteri di colesterolo (CESD), steatosi epatica non alcolica, ipercolesterolemia.*

Bibliografia

1. Young EP, Patrick AD. Deficiency of acid esterase activity in Wolman's disease. *Arch Dis Child*. Assmann G, Seedorf U. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. 1970; 45: 664-8.
2. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: McGraw Hill Inc. 2001; 3551-72.
3. Fasano T, Pisciotto L, Bocchi L, et al. Lysosomal lipase deficiency: molecular characterization of eleven patients with Wolman or cholesteryl ester storage disease. *Mol Genet Metab*. 2012; 105: 450-56.
4. Dubland JA, Francis GA. Lysosomal acid lipase: At the crossroads of normal and atherogenic cholesterol metabolism. *Front Cell Dev Biol*. 2015; 3: 1-11.
5. Muntoni S, Wiebusch H, Jansen-Rust M, et al. Heterozygosity for lysosomal acid lipase E8SJM mutation and serum lipid concentrations. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013; 23: 732-6.
6. Reiner Z, Guardamagna O, Nair D, et al. Lysosomal acid lipase deficiency-an under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction. *Atherosclerosis*. 2014; 235: 21-30.
7. Muntoni S, Wiebusch H, Jansen-Rust M, et al. Prevalence of cholesteryl ester storage disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27: 1866-8.
8. Porto AF. Lysosomal acid lipase deficiency:

- diagnosis and treatment of Wolman and Cholesteryl Ester Storage Diseases. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2014; 12: (Suppl. 1): 125-32.
9. Pisciotta L, Fresa R, Bellocchio A, et al. Cholesteryl ester storage disease (CESD) due to novel mutations in the LIPA gene. *Mol Genet Metab.* 2009; 97: 143-48.
 10. Bernstein DL, Hulkova H, Bialer MG, Desnick RJ. Cholesteryl ester storage disease: Review of the findings in 135 reported patients with an underdiagnosed disease. *J Hepatol.* 2013; 58: 1230-43.
 11. Burton BK, Deegan PB, Enns GM, et al. Clinical features of lysosomal acid lipase deficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015; 61: 619-25.
 12. Marshall WC, Ockenden BG, Fosbrooke AS, et al. Wolman's disease. A rare lipidosis with adrenal calcification. *Arch Dis Child.* 1969; 44: 331-41.
 13. Jones SA, Valayannopoulos V, Schneider E, et al. Rapid progression and mortality of lysosomal acid lipase deficiency presenting in infants. *Genet Med.* 2016; 18: 452-8.
 14. Baratta F, Pastori D, Polimeni L, et al. Does Lysosomal Acid Lipase Reduction Play a Role in Adult Non-Alcoholic Fatty Liver Disease? *Int J Mol Sci.* 2015; 16: 28014-21.
 15. Baratta F, Pastori D, Del Ben M, et al. Reduced lysosomal acid lipase activity in adult patients with non-alcoholic fatty liver disease. *EBioMedicine.* 2015; 2: 750-4.
 16. Selvakumar PK, Kabbany MN, Lopez R, et al. Reduced lysosomal acid lipase activity - A potential role in the pathogenesis of non alcoholic fatty liver disease in pediatric patients. *Dig Liver Dis.* 2016; 48: 909-13.
 17. Vespasiani-Gentilucci U, Gallo P, Piemonte F, et al. Lysosomal Acid Lipase Activity Is Reduced Both in Cryptogenic Cirrhosis and in Cirrhosis of Known Etiology. *PLoS One.* 2016; 11: e0156113.
 18. Shteyer E, Villenchik R, Mahamid M, et al. Low Serum Lysosomal Acid Lipase Activity Correlates with Advanced Liver Disease. *Int J Mol Sci.* 2016; 17: 312-22.
 19. Hamilton J, Jones I, Srivastava R, Galloway P. A new method for the measurement of lysosomal acid lipase in dried blood spots using the inhibitor lalistat 2. *Clin Chim Acta.* 2012; 413: 1207-10.
 20. Valayannopoulos V, Mengel E, Brassier A, Grabowski G. Lysosomal acid lipase deficiency: Expanding differential diagnosis. *Mol Genet Metab.* 2016. [Epub ahead of print].
 21. Burton BK, Balwani M, Feillet F, et al. A phase 3 trial of Sebelipase Alfa in lysosomal acid lipase deficiency. *N Engl J Med.* 2015; 373: 1010-20.
 22. Frampton JE. Sebelipase Alfa: A Review in Lysosomal Acid Lipase Deficiency. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2016; 16: 461-68..