

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**ESTUDO DE DIFERENTES PARÂMETROS
DE ESTRESSE OXIDATIVO NA
ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AO X**

MARION DEON

Orientadora: Prof^a. Dra. Carmen Regla Vargas

Co-orientador: Prof. Dr. Moacir Wajner

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica – do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre
2004

Aos meus pais, Augusto e Marlina, pelo amor incondicional e absoluto.

Ao meu irmão, Pedro, por todo amor e companheirismo.

À minha avó, Inez, pela torcida e orações.

Agradecimentos

Minha gratidão profunda à Prof^a. Dra. Carmen Regla Vargas, minha orientadora, profissional competente e objetiva, pelos ensinamentos, pela amizade e dedicação e, principalmente, pela confiança e oportunidade para realização deste trabalho.

Ao Prof. Moacir Wajner, exemplo de pesquisador, por estar sempre disposto a conversar e a ajudar e também por suas sugestões que muito contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Lisana Regini Sirtori, minha “orientadora espiritual”, pela amizade e cumplicidade e por toda disponibilidade e imensurável ajuda para realização dos experimentos.

À Vânia Pulrolnik, amiga e “culpada” por este mestrado em Bioquímica. Obrigada por me apresentar às pessoas certas.

Aos meus amigos do Laboratório de Análises de Metabólitos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre: Daniella, Marina, Ângela, Gustavo, Douglas, Franciele, Sharon, Renata e Bárbara, pela ajuda, pelas risadas e pelos bons momentos que juntos passamos.

Ao Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio e auxílio para que este trabalho fosse realizado.

Aos novos amigos: Gislane, Lessandra, Rafael, Régis, Juarez, Alethéa e Ana Paula, pelo carinho.

Ao grupo de Erros Inatos do Metabolismo (laboratórios 34, 36 e 38) pelo conhecimento compartilhado nos seminários, pela colaboração e pelo empréstimo de material.

A CAPES, pela bolsa concedida.

À minha super amiga Tati, pelas palavras amigas e pelos e-mails divertidos.

Aos meus familiares, por todo apoio, torcida e carinho.

À minha vovó querida, pelos mimos e conselhos.

Ao meu irmãozinho adorado, meu amigo, por seu estímulo e carinho.

À minha mãe amada, pelo colo, amor, força, carinho e por acreditar incondicionalmente em mim.

Ao meu pai, meu grande mestre, melhor professor do mundo, por me indicar caminhos e apoiar as minhas escolhas. Obrigada por tudo.

A Deus, por estar sempre presente na minha vida.

Resumo

A adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (X-ALD) é uma doença peroxissomal bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo de ácidos graxos de cadeia muito longa (“Very Long Chain Fatty Acids” - VLCFA), principalmente os ácidos hexacosanóico (C_{26:0}) e tetracosanóico (C_{24:0}), em diferentes tecidos e fluidos orgânicos. A doença é clinicamente caracterizada por progressiva desmielinização central e periférica e insuficiência adrenal. Os mecanismos exatos do dano cerebral na X-ALD são pouco conhecidos. O tratamento usual para X-ALD com a mistura gliceroltrioleato/gliceroltrierucato na proporção 4:1, conhecido como óleo de Lorenzo (OL), em combinação com uma dieta de restrição dos VLCFA normaliza os níveis de VLCFA, mas em pacientes sintomáticos os sintomas neurológicos persistem ou progridem.

Os radicais livres parecem estar envolvidos em um grande número de enfermidades no ser humano, tais como nas doenças neurodegenerativas (como doença de Parkinson, doença de Alzheimer e esclerose múltipla), nas doenças crônico-inflamatórias, nas doenças vasculares e no câncer. Considerando que a geração de radicais livres está envolvida em várias desordens neurodegenerativas, no presente estudo foram avaliados vários parâmetros de estresse oxidativo em plasma, eritrócitos e fibroblastos de pacientes sintomáticos com X-ALD. Também foi avaliado o efeito do tratamento com OL sobre diferentes parâmetros de estresse oxidativo em plasma e em eritrócitos de pacientes sintomáticos e assintomáticos com X-ALD tratados e não tratados com OL. Considerando que não é possível estudar estresse oxidativo em córtex cerebral de pacientes com X-ALD, foi avaliado o efeito *in vitro* da mistura

ácido oleico ($C_{18:1}$)/ácido erúico ($C_{22:1}$) sobre diversos parâmetros de estresse oxidativo em plasma e em eritrócitos humanos normais e em córtex cerebral de ratos adicionados dos ácidos hexacosanóico($C_{26:0}$) e tetracosanóico($C_{24:0}$).

Foi verificado um aumento significativo da quimiluminescência e das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), refletindo uma indução da peroxidação lipídica, bem como uma diminuição da reatividade antioxidante total (TAR) medida em plasma de pacientes sintomáticos, indicando uma capacidade deficiente em rapidamente combater um aumento das espécies reativas. Também foi observado um aumento da atividade da glutathione peroxidase (GPx) em eritrócitos e das atividades da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) em fibroblastos dos pacientes sintomáticos estudados. Estes dados sugerem que o estresse oxidativo pode estar envolvido na fisiopatologia da X-ALD.

Verificamos também que o OL não reverteu o aumento do TBA-RS no plasma de indivíduos X-ALD. A determinação de TAR não apresentou alterações no plasma de pacientes X-ALD sintomáticos e assintomáticos antes e após o tratamento com OL. A atividade das enzimas antioxidantes CAT, GPx e SOD não se mostrou alterada em eritrócitos destes pacientes tratados ou não com OL.

Nos experimentos *in vitro*, foi constatado um aumento significativo da quimiluminescência e de TBA-RS em plasma humano e em córtex cerebral de ratos adicionados dos ácidos $C_{26:0}C_{24:0}$, porém a mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ não reverteu este efeito. A medida de TAR não se mostrou alterada em córtex cerebral de ratos adicionado de $C_{26:0}C_{24:0}$, bem como não foi modificada pela mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$. Por outro lado, a adição de $C_{26:0}C_{24:0}$ em plasma humano diminuiu a medida de TAR, porém a mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ não alterou esse efeito. As atividades das enzimas antioxidantes CAT e GPx não foram alteradas em eritrócitos humanos e em córtex cerebral de ratos pela adição

de $C_{26:0}C_{24:0}$, nem pela mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$. O mesmo foi observado na medida de SOD em eritrócitos humanos adicionados de $C_{26:0}C_{24:0}$. A medida da atividade da SOD em córtex cerebral de ratos apresentou um aumento significativo induzido por $C_{26:0}C_{24:0}$, porém a presença da mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ não modificou este efeito.

Estes resultados sugerem fortemente que o estresse oxidativo possa estar envolvido na fisiopatologia da X-ALD e que o tratamento com óleo de Lorenzo não modifica estes parâmetros de estresse oxidativo. Assim, novas estratégias terapêuticas deveriam ser investigadas para pacientes de X-ALD.

Abstract

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is an hereditary disorder of peroxisomal metabolism biochemically characterized by the accumulation of very long chain fatty acids (VLCFA), particularly hexacosanoic acid (C_{26:0}) and tetracosanoic acid (C_{24:0}) in different tissues and biological fluids. The disease is clinically characterized by central and peripheral demyelination and adrenal insufficiency. The mechanisms underlying the brain damage in X-ALD are poorly known. The current treatment for X-ALD with a mixture 4:1 of glyceroltrioleate/glyceroltrierucate namely Lorenzo's oil (LO) combined with a VLCFA-poor diet normalizes VLCFA concentrations, but in the symptomatic patients the neurological symptoms persist or progress. Free radicals seem to be involved in a large number of human diseases. Increasing evidence show that damage caused by free radicals is an important contributing factor in neurodegenerative (e.g Parkinson's disease, Alzheimer's disease and multiple sclerosis), chronic-inflammatory, vascular and neoplastic diseases.

Considering that free radical generation is involved in various neurodegenerative disorders, in the present study it was evaluated various oxidative stress parameters in plasma, erythrocytes and fibroblasts of symptomatic, as well as it was evaluated the effect of LO treatment on different oxidative stress parameters in plasma and erythrocytes of symptomatic and asymptomatic X-ALD patients before and after LO treatment. Considering that is not possible to study oxidative stress in human brain of X-ALD patients, it was evaluated the *in vitro* effects of mixture of oleic acid (C_{18:1})/erucic acid (C_{22:1}) on oxidative stress parameters in normal human plasma and erythrocytes and in brain of young rats added with C_{26:0}C_{24:0}.

It was verified a significant increase of plasma chemiluminescence and tiobarbituric acid reactive species (TBA-RS), reflecting induction of lipid peroxidation, as well as a decrease of plasma total antioxidant reactivity (TAR), indicating a deficient capacity to rapidly handle an increase of reactive species. It was also observed a significant increase of erythrocytes glutathione peroxidase (GPx) activity, and also of catalase and superoxide dismutase activities in fibroblasts from the patients studied. This data suggested that oxidative stress may be involved in pathophysiology of X-ALD.

It was verified that LO did not revert the TBA-RS increase in plasma of X-ALD individuals. The TAR measurement did not show alterations in plasma of symptomatic and asymptomatic X-ALD patients before and after LO treatment. The antioxidant enzymes activities CAT, SOD and GPx were not altered in erythrocytes of these patients treated or not with LO.

In vitro experiments demonstrated a significant increase of chemiluminescence and TBA-RS in human plasma and rat cerebral cortex added with C_{26:0}C_{24:0} acids, and the addition of the mixture C_{18:1} and C_{22:1} did not alter these effect. The TAR measurement was not altered in cerebral cortex of rats added by C_{26:0}C_{24:0} acids and was not not modified by C_{18:1} and C_{22:1} mixture. On the other hand, the addition of C_{26:0}C_{24:0} acids in human plasma decreased the TAR measurement, but the mixture of C_{18:1} and C_{22:1} did not alter this effect. The antioxidant enzymes activities CAT and GPx were not altered in human erythrocytes and rat cerebral cortex by C_{26:0}C_{24:0} addition neither by C_{18:1} and C_{22:1} mixture. The same was observed on SOD activity in human erythrocytes added by C_{26:0}C_{24:0} acids. SOD activity in rat cerebral cortex was increased by C_{26:0}C_{24:0} acids addition but C_{18:1}/C_{22:1} mixture did not modified this effect.

These data strongly suggested that oxidative stress could be involved in pathophysiology X-ALD and that LO treatment do not change the parameters of oxidative stress. Therefore new therapeutic strategies should be investigated for X-ALD patients.

Índice

LISTA DE FIGURAS **XIII**

LISTA DE TABELAS **XIV**

LISTA DE ABREVIATURAS **XV**

1. INTRODUÇÃO **1****1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO** **1**

1.1.1 HISTÓRICO 1

1.1.2 CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO 2

1.2 PEROXISSOMAS **4****1.3 DOENÇAS PEROXISSOMAIS** **7****1.4 X-ALD** **8**

1.4.1 APRESENTAÇÃO CLÍNICA 10

1.4.2 DIAGNÓSTICO 16

1.4.3 TRATAMENTO 18

1.5 RADICAIS LIVRES **30**

1.5.1 DEFINIÇÃO E GENERALIDADES 30

1.6 DEFESAS ANTIOXIDANTES **33**

1.6.1 ENZIMAS ANTIOXIDANTES 34

1.6.2 DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICAS 36

1.7 ESTRESSE OXIDATIVO **36**

1.7.1 DANO CELULAR CAUSADO POR ESTRESSE OXIDATIVO 38

1.7.2 RADICAIS LIVRES E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL 40

1.7.3 ESTRESSE OXIDATIVO E OS ERROS INATOS DO METABOLISMO 41

2. OBJETIVOS **43****2.1 GERAL** **43****2.2 ESPECÍFICOS** **43**

3. MATERIAL E MÉTODOS **46****3.1 REAGENTES, EQUIPAMENTOS E MATERIAIS** **46**

3.1.1 REAGENTES E OUTROS MATERIAIS DE CONSUMO 46

3.1.2 EQUIPAMENTOS 48

3.2 AMOSTRAS **49**

3.2.1 PACIENTES E CONTROLES 49

3.2.2 ANIMAIS	50
3.2.3 PREPARAÇÃO DOS TECIDOS	51
3.3 COMPLEXAÇÃO DOS ÁCIDOS HEXACOSANÓICO (C_{26:0}) E TETRACOSANÓICO (C_{24:0}) COM ALBUMINA	52
3.4 PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES DE ÁCIDO OLEICO (C_{18:1}) E DE ÁCIDO ERÚCICO (C_{22:1})	53
3.5 EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	54
3.6 DETERMINAÇÃO DOS VLCFA	54
3.7 DETERMINAÇÃO DA QUIMILUMINESCÊNCIA	56
3.8 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBA-RS)	56
3.9 POTENCIAL ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP)	57
3.10 REATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TAR)	58
3.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS: CATALASE, GLUTATIONA PEROXIDASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE.	59
3.11.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)	59
3.11.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX)	59
3.11.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	60
3.12 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	60
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
3.14 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	61
<u>4. RESULTADOS</u>	<u>62</u>
<u>5. DISCUSSÃO</u>	<u>78</u>
<u>6. CONCLUSÕES</u>	<u>87</u>
<u>7. PERSPECTIVAS</u>	<u>90</u>
<u>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>92</u>
<u>ANEXO 1</u>	<u>105</u>
<u>ANEXO 2</u>	<u>107</u>

Lista de Figuras

Figura 1 Ativação e subsequente beta-oxidação peroxissomal dos VLCFA (adaptado de Wanders et al., 1990).	6
Figura 2 Fórmula molecular ($C_{69}H_{128}O_6$) e estrutural de GTE (ChemIDplus, 2003)...	23
Figura 3 Fórmula molecular ($C_{57}H_{104}O_6$) e estrutural de GTO (ChemIDPlus, 2003)...	24
Figura 4 Elongamento das gorduras saturadas e monoinsaturadas (Borel, J. K Kennedy Krieger Institute).	25
Figura 5 Redução sequencial de oxigênio molecular. Nos estágios intermediários, são formados ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$).	31
Figura 6 Produção de radical hidroxila pela reação de Fenton.	32
Figura 7 TBA-RS em plasma de pacientes X-ALD antes [OL(-)] e depois [OL(+)] do tratamento com óleo de Lorenzo e controles.	67
Figura 8 TAR em plasma de pacientes X-ALD antes [OL(-)] e depois [OL(+)] do tratamento com óleo de Lorenzo e controles.	68
Figura 9 Efeito da mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ em plasma humano adicionados dos ácidos $C_{26:0}/C_{24:0}$ sobre a quimiluminescência.	71
Figura 10 Efeito da mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ em plasma humano adicionados dos ácidos $C_{26:0}/C_{24:0}$ sobre TBA-RS.	71
Figura 11 Efeito da mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ em plasma humano adicionados dos ácidos $C_{26:0}/C_{24:0}$ sobre TAR.	72
Figura 12 Efeito da mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ em córtex cerebral de rato adicionados dos ácidos $C_{26:0}/C_{24:0}$ sobre a quimiluminescência.	74
Figura 13 Efeito da mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ em córtex cerebral de rato adicionados dos ácidos $C_{26:0}/C_{24:0}$ sobre TBA-RS.	75
Figura 14 Efeito da mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ em córtex cerebral de rato adicionados dos ácidos $C_{26:0}/C_{24:0}$ sobre TAR.	76

Lista de Tabelas

Tabela 1 Fenótipos clínicos em X-ALD.....	11
Tabela 2 Valores referenciais de VLCFA para o plasma em $\mu\text{mol/L}$	17
Tabela 3 Informação nutricional do OL.	26
Tabela 4 Perfil de ácidos graxos presentes em 100g de OL.	27
Tabela 5 Alimentos permitidos e não permitidos em uma dieta restrita de VLCFA.....	27
Tabela 6 Principais efeitos adversos encontrados em pacientes X-ALD tratados com OL.	28
Tabela 7 Estudos realizados sobre o efeito do óleo de Lorenzo sobre a X-ALD.	29
Tabela 8 Parâmetros de lipoperoxidação (quimiluminescência e espécies reativas do ácido tiobarbitúrico - TBARS) em plasma de pacientes X-ALD.	63
Tabela 9 Potencial Antioxidante Total (TRAP) e Reatividade Antioxidante Total (TAR) em plasma de pacientes X-ALD.	64
Tabela 10 Atividade das enzimas antioxidantes em eritrócitos de pacientes X-ALD.	65
Tabela 11 Atividade das enzimas antioxidantes em fibroblastos de pacientes X-ALD.	66
Tabela 12 TBA-RS e TAR em plasma de pacientes X-ALDantes [OL(-)] e depois [OL(+)] do tratamento com óleo de Lorenzo.....	67
Tabela 13 As atividades das enzimas antioxidantes em eritrócitos de pacientes X-ALD antes [OL(-)] e depois [OL(+)] do tratamento com óleo de Lorenzo.	69
Tabela 14 Efeito da mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ em eritrócitos humanos adicionados dos ácidos $C_{26:0}/C_{24:0}$ sobre atividade das enzimas antioxidantes	73
Tabela 15 Efeito da mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ em córtex cerebral de rato adicionados dos ácidos $C_{26:0}/C_{24:0}$ sobre atividade das enzimas antioxidantes	77

Lista de Abreviaturas

3-OH-HMG-CoA	3-hidróxi-3-metil-glutaril coenzima A
aALD	adrenoleucodistrofia – forma cerebral adulta
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
ALD	adrenoleucodistrofia
ALDP	proteína relacionada à Adrenoleucodistrofia
AMN	adrenomieloneuropatia
C _{16:0}	ácido palmítico
C _{18:0}	ácido esteárico
C _{18:1}	ácido oleico
C _{22:0}	ácido docosanóico ou behênico
C _{22:1}	ácido erúcico
C _{24:0}	ácido tetracosanóico ou lignocérico
C _{24:1}	ácido nervóico
C _{26:0}	ácido hexacosanóico ou cerótico
C _{27:0}	ácido heptacosanóico
Ca ⁺²	íon cálcio
cALD	adrenoleucodistrofia – forma cerebral infantil
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
CAT	catalase
CO ₂	dióxido de carbono
CG	cromatografia gasosa
CG/MS	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
Cu ⁺	íon cuproso
CuZn-SOD	cobre-zinco superóxido dismutase
DNA	ácido desoxirribonucléico
EAN	espécies ativas de nitrogênio
EAO	espécies ativas de oxigênio
EIM	erros inatos do metabolismo
Fe ⁺²	íon ferroso

Fe ⁺³	íon férrico
GR	glutathiona redutase
GSH	glutathiona (forma reduzida)
GPx	glutathiona peroxidase
GSSG	glutathiona (forma oxidada)
GTE	gliceroltrierucato
GTO	gliceroltrioleato
H ⁺	íon hidrogênio
H ₂ O	água
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HO•	radical hidroxila
IA	insuficiência adrenal
MDA	malondialdeído
Mn-SOD	manganês superóxido dismutase
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídio (forma oxidada)
NADH ₂	nicotinamida adenina dinucleotídio (forma reduzida)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (forma reduzida)
NK	“ <i>natural killers</i> ” – “linfócitos assassinos”
NO•	óxido nítrico
NO ₂	dióxido nítrico
O ₂	oxigênio molecular
O ₂ • ⁻	ânion superóxido
OH ⁻	ânion hidroxila
OL	óleo de Lorenzo
ONOO•	peroxinitrito
ONS	óxido nítrico sintetase
RNM	ressonância nuclear magnética
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
TAR	reatividade antioxidante total
TMO	transplante de medula óssea
Tnf-α	fator de necrose tumoral alfa
TRAP	potencial antioxidante total

VLCFA	ácidos graxos de cadeia muito longa
X-ALD	adrenoleucodistrofia ligada ao X

1. INTRODUÇÃO

1.1 Erros Inatos do Metabolismo

1.1.1 Histórico

Os primeiros estudos em termos bioquímicos relacionados a Erros Inatos do Metabolismo (EIM) surgiram em 1908, quando o inglês Archibal Garrod publicou na revista Lancet “A incidência de alcaptonúria, um estudo da individualidade química”. O autor observou que os indivíduos afetados por esta doença excretavam na urina quantidades aumentadas de ácido homogentísico e que esta peculiaridade era encontrada em diversos membros de uma mesma família. Além disso, os pais dos afetados tinham, geralmente, parentesco consanguíneo próximo (Waber, 1990).

Garrod concluiu que o acúmulo dessas substâncias era derivado de um bloqueio parcial ou total na suas rotas de oxidação devido à deficiência de uma enzima responsável por uma reação específica para cada caso. Ainda, como essas doenças geralmente ocorriam em irmãos, filhos de pais normais consanguíneos, tal informação permitiu que Garrod concluísse que havia uma conotação hereditária nessas anomalias. Assim, juntamente com Bateson, um geneticista inglês, Garrod sugeriu o caráter mendeliano recessivo, ou seja, um modelo de herança autossômica recessiva e que a alcaptonúria e outras anomalias metabólicas herdadas, eram raras e incomuns. Garrod

percebeu a relação direta entre genes e enzimas e reconheceu a importância da individualidade química (Waber, 1990; Scriver *et al.*, 2001).

Em 1945, Beadle correlacionou a síntese de uma proteína a um gene específico e também verificou que o processo metabólico se desdobra em etapas, cada uma delas contratada por uma enzima específica (Mueller e Young, 1995).

Desde os estudos de Garrod, muitos pesquisadores têm detectado novas doenças metabólicas hereditárias. Os erros inatos do metabolismo já foram descritos em todas as áreas do metabolismo humano normal (aminoácidos, ácidos orgânicos, lipídios, carboidratos, etc.) e sua identificação tem contribuído para um melhor conhecimento do metabolismo humano normal (Scriver *et al.*, 2001).

1.1.2 Conceito e classificação

Os EIM são defeitos hereditários, quase sempre devidos à deficiência de uma atividade enzimática. A ausência da atividade enzimática ou uma atividade enzimática deficiente leva a um bloqueio metabólico com acúmulo de substratos e seus derivados. Tal bloqueio, dependendo da via afetada, repercute clinicamente de maneira bastante variável no indivíduo, sendo geralmente de sintomatologia grave e muitas vezes letal (Scriver *et al.*, 2001).

Os EIM são individualmente raros, porém frequentes quando analisados em conjunto em pacientes pré-selecionados (Raine, 1974; Hall *et al.*, 1978). Estas doenças correspondem cerca de 10% de todas as doenças genéticas, isto é,

aproximadamente 500 distúrbios envolvendo defeitos na síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Gimenez-Sanchez *et al.*, 2001).

Os EIM podem ser classificados de diversas maneiras, como pela idade de apresentação ou pela área do metabolismo afetada. A classificação descrita por Saudubray e Charpentier (2001) estabelece três grandes grupos de EIM:

- I. Grupo 1: distúrbios na síntese ou degradação de macromoléculas complexas. Os sintomas são permanentes, progressivos, não-dependentes de eventos intercorrentes e não estão relacionados à ingestão alimentar. Fazem parte deste grupo as doenças lisossômicas de depósito (ex: doença de Gaucher, doença de Fabry, Mucopolissacaridoses etc.) e as desordens peroxissomais (ex: adrenoleucodistrofia ligada ao X (X-ALD), doença de Refsum, síndrome de Zellweger etc.).

- II. Grupo 2: erros inatos do metabolismo intermediário, que levam a intoxicação aguda (acidose metabólica, vômitos, letargia, desidratação) ou crônica (retardo mental, retardo no desenvolvimento psicomotor e luxação do cristalino) por acúmulo de componentes tóxicos e de metabólitos produzidos devido ao bloqueio de rotas metabólicas. Fazem parte deste grupo defeitos no metabolismo dos aminoácidos (ex: fenilcetonúria, doença do Xarope do Bordo, etc.), ácidos orgânicos (acidemia propiônica, acidemia metilmalônica, etc.), ciclo da uréia (citrulonemia, argininemia, etc.) e as intolerâncias aos açúcares (galactosemia, etc.). As características principais deste grupo são a existência de intervalos livres de sintomas e a relação com a ingestão alimentar.

III. Grupo 3: doenças com deficiência de energia, os sintomas são causados pelo menos parcialmente por deficiência na produção ou utilização de energia resultante de erros inatos do metabolismo intermediário no fígado, miocárdio, músculo ou cérebro. Este grupo inclui as doenças de depósito de glicogênio, defeitos de gliconeogênese, acidemias lácticas congênitas, defeitos de oxidação dos ácidos graxos e doenças mitocondriais de cadeia respiratória.

A identificação de um EIM permite muitas vezes a introdução de um tratamento eficaz. Quando isso não é possível, a ocorrência de novos afetados no mesmo grupo familiar pode ser evitada pela identificação de casais em risco, aos quais pode ser oferecido o aconselhamento genético e, em muitos casos, o diagnóstico pré-natal (Chalmers, 1974, Golpertz, 1974 e Warrs *et al.*, 1975).

1.2 Peroxissomas

O peroxissoma é uma suborganela presente em quase todas as células eucarióticas (com exceção de eritrócitos maduros) e presente em todos os tecidos, principalmente no fígado e nos rins (Gould *et al.*, 2001). É uma organela de 0,2 a 1 μm de diâmetro, envolvida por uma única membrana sem estrutura interna e sem DNA (Kovacs *et al.*, 2002; Olivier e Krisans, 2000). Sua primeira descrição morfológica ocorreu no início dos anos 50 por Rhodin (1954) como “corpos esféricos ou ovais” presentes no citoplasma do túbulo renal proximal de camundongo. De Duve e Baudhuin (1966) isolaram e caracterizaram os peroxissomos como organelas subcelulares através de técnicas de centrifugação densidade-gradiente. Esses investigadores verificaram a

presença de enzimas geradoras de peróxido de hidrogênio (glicolato oxidase, urato oxidase e D-aminoácido oxidase), assim como a catalase, uma enzima degradadora de peróxido de hidrogênio. Por tudo isso, os autores denominaram a organela de “Peroxissoma”.

Atualmente, sabe-se que esta organela catalisa um grande número de reações essenciais de diferentes rotas metabólicas e, portanto, desempenha um papel extremamente importante no metabolismo intermediário (Olivier e Krisans, 2000). Um dos mais importantes processos metabólicos em que o peroxissoma está envolvido é a β -oxidação dos ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA *do inglês* “*Very Long Chain Fatty Acids*”) (Wanders *et al.*, 2001). Os peroxissomas também estão envolvidos na biossíntese de fosfolipídios, de ácidos biliares, de colesterol e de intermediários de colesterol, na síntese de plasmalógenos, no metabolismo de aminoácidos e de purina, na oxidação de VLCFA, de cadeia ramificada, de ácidos dicarboxílicos e de ácidos graxos poliinsaturados, no catabolismo de fitanato, de pipecolato e de glioxilato (Kovacs *et al.*, 2002; Olivier e Krisans, 2000).

A β -oxidação dos ácidos graxos de cadeia muito longa em peroxissomas é definida como a oxidação de ácidos graxos com cadeia de 24 ou mais carbonos de comprimento (Wanders *et al.*, 2000). Assim como a β -oxidação mitocondrial, a β -oxidação peroxissomal ocorre através de sucessivos passos de desidrogenação, hidratação e clivagem tiolítica. (Figura 1)

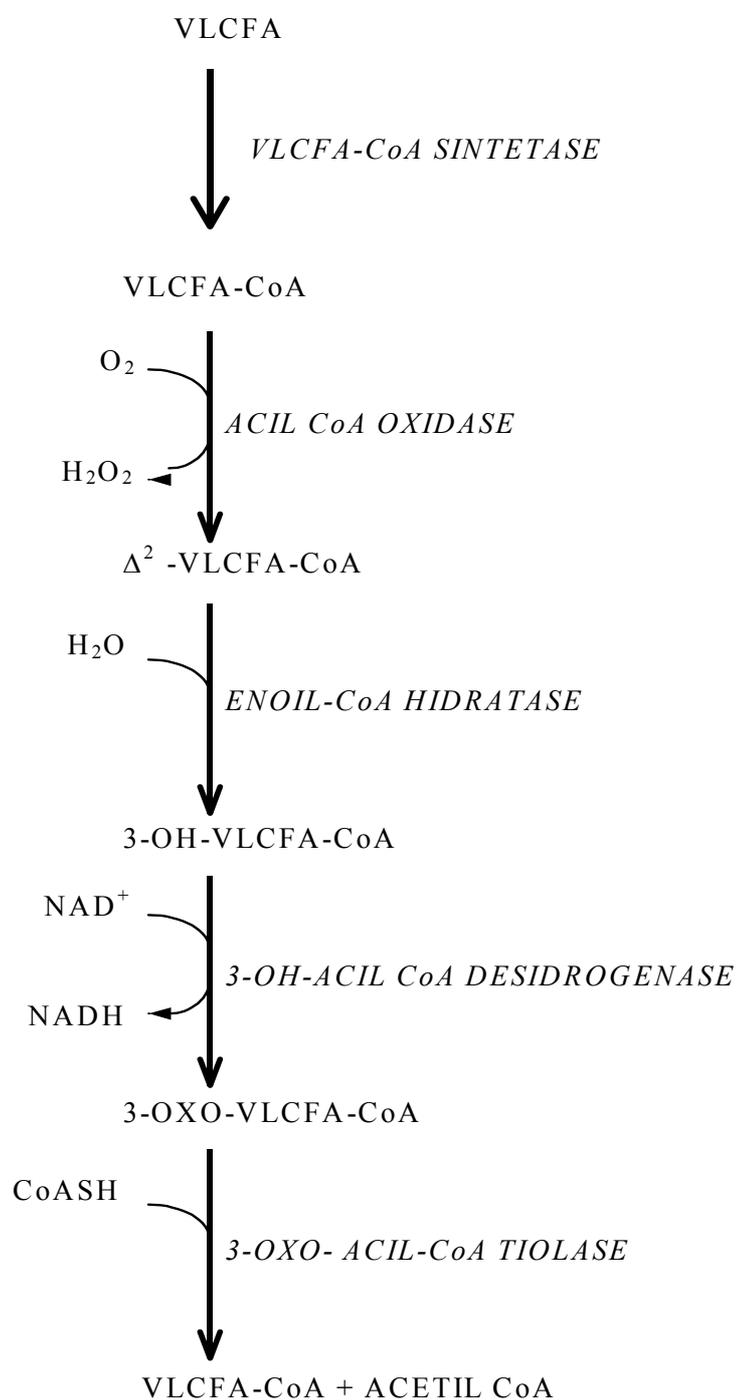


Figura 1 Ativação e subsequente beta-oxidação peroxissomal dos VLCFA (adaptado de Wanders et al., 1990).

1.3 Doenças Peroxissomais

Comprometimento neurológico severo (retardo psicomotor, hipotonia, convulsões, deficiência auditiva e comprometimento ocular) é a principal característica em 13 dos 15 distúrbios peroxissomais já descritos (Wanders *et al.*, 2001; Powers e Moser, 1998). No plasma dos indivíduos acometidos com estes distúrbios, os VLCFA, o ácido pipercolico, os ácidos biliares e os ácidos pristânicos e fitânico acumulam-se em graus variados (Ten Brink *et al.*, 1993). Sua incidência ultrapassa de 1: 25.000. As doenças peroxissomais estão subdivididas em 2 grandes grupos:

- a) Desordens da biogênese do peroxissoma: nestas doenças, a organela não é formada normalmente e várias funções peroxissomais estão deficientes. Assim, quando totalmente ausentes, essa disfunção afeta todas as vias metabólicas do peroxissomo. Essas doenças incluem a síndrome de Zellweger, a adrenoleucodistrofia neonatal, a forma infantil da doença de Refsum, a forma rizomélica da condrodissplasia punctata tipo I e a acidemia hiperpipercolica.

- b) Defeito de uma única enzima peroxissomal: nestas doenças, a estrutura peroxissomal está intacta e presente, ocorrendo um defeito em uma única proteína peroxissomal. Isso faz com que apenas uma via metabólica peroxissomal seja afetada. Esse grupo inclui pelo menos 10 desordens: X-ALD (defeito no transporte da ALDP), hiperoxalúria tipo I (deficiência de alanina:glioxalato aminotransferase), doença de Refsum (deficiência de fitanoil-

CoA hidrolase), forma rizomélica da condrodysplasia punctata tipo II e III (deficiências das dihidroxiacetona fosfato aciltransferase e alquil dihidroxiacetona fosfato sintase), desordens da β -oxidação como a deficiência da acil-CoA oxidase, deficiência da enzima bifuncional peroxissomal e a deficiência da tiolase peroxissomal (acil-CoA oxidase, proteína bifuncional e tiolase) e acatalasemia (deficiência da catalase). (Powers e Moser, 1998)

1.4 X-ALD

A X-ALD é um distúrbio do metabolismo peroxissomal que ocorre em aproximadamente 1 em cada 25.000 homens. Essa doença compromete principalmente a substância branca e os axônios do SNC, o córtex adrenal e os testículos. Está associada ao acúmulo de VLCFA, que são quase sempre saturados, sem ramificações, incluindo principalmente os de cadeia de 26 carbonos (ácido hexacosanóico, C_{26:0}) e de 24 carbonos (ácido tetracosanóico, C_{24:0}). Os VLCFA acumulam-se em fluidos biológicos e tecidos na X-ALD devido a um defeito na degradação dessas substâncias, que normalmente ocorre nos peroxissomos. Esse distúrbio é devido a uma mutação no gene ABCD1 (gene que codifica as proteínas transportadoras ABC – *do inglês* “ATP binding cassette”) e resulta em defeito na β oxidação peroxissomal (Moser *et al.*, 2001). Senir e col (1998) demonstraram que, além dos níveis aumentados destes ácidos graxos, também foram observados níveis aumentados do ácido nervóico (C_{24:1}), o qual é um VLCFA monoinsaturado. Este acúmulo também ocorre em consequência do defeito no processo de β -oxidação deste composto.

A X-ALD é a doença peroxissomal mais comum. O defeito bioquímico nesta doença parece estar relacionado a um distúrbio no transporte da VLCFA-CoA sintetase na membrana peroxissomal (Fournier *et al.*, 1994). Mosser e col. (1993) verificaram que o gene responsável pela X-ALD codifica uma proteína homóloga a proteína de membrana peroxissomal pertencente à família dos transportadores ABC.

A seqüência do gene ALD apresenta alta identidade com os genes que codificam o grupo de proteínas transportadoras ABC (Mosser *et al.*, 1993; Aubourg *et al.*, 1993 b). Além de estarem associadas ao transporte através da membrana celular, os transportadores ABC também podem mediar o transporte de substâncias através das membranas intracelulares, como parece ser o caso do gene ALD, que atua na membrana dos peroxissomos (Contreras *et al.*, 1994).

O defeito primário da X-ALD envolve um único gene no cromossomo X que foi mapeado como Xq28 (Moser *et al.*, 1992; Moser, 1997). A banda do cromossomo Xq28 contém muitos genes causadores de distúrbios, incluindo os responsáveis pela hemofilia A, diabetes insipidus, paraplegia espástica ligada ao X, síndrome de MASA e distrofia muscular de Emery-Dreifuss (Seneca e Lissens, 1995). Em torno de 50% das mulheres heterozigotas apresentam uma forma amena da doença, provavelmente devida a desvio ao processo inativação do alelo da adrenoleucodistrofia. Genes modificadores, genes secundários e fatores imunológicos ou ambientais podem contribuir para a expressão clínica da doença. A identificação desses fatores secundários hipotéticos pode ser não apenas importante para a compreensão da função fisiológica da proteína ALDP e das rotas metabólicas, mas pode também fornecer um tratamento mais eficiente (Diagnostic Laboratory Methods in Peroxisomal Disorders, 1994).

1.4.1 Apresentação Clínica

A adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X pode se apresentar em uma ampla faixa etária e com diferentes manifestações dependendo da presença e do tipo de achados neurológicos. O fenótipo da X-ALD abrange desde uma doença infantil, bastante severa e de rápida progressão que pode levar a um estado vegetativo e morte em dois anos a partir do primeiro sintoma, até uma paraparesia lentamente progressiva com preservação do intelecto que se manifesta na idade adulta e é compatível com a vida normal, adrenomieloneuropatia (Moser *et al.*, 1992). Estes dois fenótipos são os mais freqüentes (Kemp *et al.*, 1996; Dubois-Dalcq *et al.*, 1999).

X-ALD é caracterizada por uma ampla variedade fenotípica (Stradomska e Tylki-Szymanska, 1996). Cabe salientar que os vários fenótipos podem ocorrer dentro de uma mesma família (Fournier *et al.*, 1994). Moser *et al* (2001) afirmaram haver 7 fenótipos clínicos para homens e 5 em mulheres heterozigotas. Os fenótipos estão listados na tabela 1 a seguir:

Tabela 1 Fenótipos clínicos em X-ALD.

Fenótipos masculinos	Frequência relativa estimada
Cerebral infantil (cALD)	31-35%
Cerebral juvenil	4-7%
Cerebral adulta	2-5%
Adrenomieloneuropatia (AMN)	40-46%
Doença de Addison isolado (AI)	Variável com a idade. Mais de 50% na infância.
Olivo-ponto-cerebelar	1-2%
Forma assintomática	Diminui com a idade. Comum < 4 anos. Muito raro > 40 anos.

Fenótipo em mulheres portadoras de X-ALD	Frequência relativa estimada
Forma assintomática	Diminui com a idade. Maioria das mulheres < 30 anos neurologicamente não envolvidas (sem sintomas neurológicos).
Mielopatia branda	Aumenta com o avançar da idade. Aproximadamente 50% > 40 anos.
Mieloneuropatia (moderada a severa)	Aumenta com o avançar da idade. Aproximadamente 15% > 40 anos.
Cerebral	Aproximadamente 2%
Insuficiência Adrenal	Aproximadamente 1%

Fonte: Moser *et al* (2001)

1.4.1.1 Cerebral infantil

A forma cerebral infantil da X-ALD (cALD) é a mais severa. A cALD é a mais comum e tem o fenótipo mais grave, com início de comprometimento neurológico normalmente entre 5 e 10 anos de idade, levando a um estado vegetativo e morte dentro de poucos anos. Dificuldade escolar e déficit de atenção são sintomas precoces comuns, seguidos de distúrbios visuais e auditivos e quadriplegia, enquanto as convulsões são normalmente uma manifestação mais tardia. A desmielinização progressiva do SNC está associada com uma resposta inflamatória no cérebro. Em 86% dos 167 pacientes com a forma infantil da X-ALD testados no Kennedy Krieger Institute (Baltimore, USA) até 1987, os sintomas neurológicos precederam sinais da

insuficiência adrenal, mas 85% dos pacientes com envolvimento neurológico mostraram resposta diminuída do cortisol ao estímulo com hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na época do diagnóstico neurológico (Moser *et al*, 1987; Moser *et al*, 1991a). Na história progressiva, são frequentemente registrados episódios de vômitos inexplicáveis, desidratação, fraqueza e hiperpigmentação, os quais foram atribuídos à insuficiência adrenal primária (Moser *et al*, 1991a; Dubois-Dalcq *et al.*, 1999). Na cALD, as mudanças precoces no comportamento incluem instabilidade emocional, comportamento retraído ou hiperativo e/ou insucesso escolar. A dificuldade em compreender a fala dentro de ambiente barulhento ou ao telefone é um sintoma comum. O dano visual é um sintoma precoce em aproximadamente 1/3 dos pacientes e inclui campo e acuidade visuais prejudicadas. Num estágio mais avançado da doença, a visão é totalmente perdida e há atrofia óptica. Uma vez que os sintomas neurológicos manifestam-se, a deterioração é rápida. Na série de 167 pacientes estudados no Kennedy Krieger Institute o intervalo médio entre o primeiro sintoma neurológico e o estado vegetativo foi de aproximadamente 2 anos (Moser *et al*, 1987). Após este período, em geral o paciente está acamado, incapaz de ver e falar e alimentando-se por sonda (Moser *et al*, 1991b; Moser, 1997).

1.4.1.2 Cerebral juvenil

A forma cerebral juvenil da X-ALD tem idade de início entre os 11 e 22 anos, sendo que os sintomas e a deterioração que ocorre nestes pacientes são semelhantes àqueles da forma cerebral infantil. Os sintomas mais frequentes incluem dificuldade escolar, distúrbios de comportamento, visão e audição diminuídas,

demência, convulsão, hipoatividade e coordenação pobre (Dubois-Dalcq *et al.*, 1999; Moser *et al.*, 2001).

1.4.1.3 Cerebral adulta

O termo adrenoleucodistrofia cerebral adulta designa pacientes com o defeito bioquímico da X-ALD e que desenvolvem sintomas cerebrais após os 21 anos de idade, mas que não apresentam envolvimento da medula espinhal. Esta forma adulta é relativamente rara (Moser *et al.*, 2001). Os afetados desenvolvem distúrbios no comportamento, demência ou outras deficiências neurológicas cerebrais. Esta condição pode ser diagnosticada erroneamente como esquizofrenia, esclerose múltipla, tumor cerebral ou doença de Alzheimer (Moser *et al.*, 1991b). A presença da insuficiência adrenal é um indício do diagnóstico. Os especialistas devem estar alertas para a possibilidade de X-ALD quando da ocorrência de distúrbios psicóticos em pacientes com a insuficiência adrenal, embora eles possam ocorrer na insuficiência adrenal devido a outras causas (Esiri *et al.*, 1984). Lesões na substância branca, demonstradas por tomografia computadorizada ou por ressonância magnética, são freqüentemente o primeiro sinal que conduz ao diagnóstico, que é estabelecido por ensaios bioquímicos. A X-ALD cerebral adulta também tem um prognóstico sombrio: o intervalo entre o primeiro sintoma neurológico e o estado aparentemente vegetativo ou morte é de 3 a 4 anos (Moser *et al.*, 2001). As formas cerebrais desenvolvidas na adolescência e na fase adulta são raras e se diferenciam da forma infantil apenas pela idade de início.

1.4.1.4 Adrenomieloneuropatia

A segunda forma mais comum de X-ALD é a adrenomieloneuropatia (AMN). Nesta forma clínica o início dos sintomas ocorre em média após os 21 anos de idade, envolvendo principalmente a medula espinhal e os nervos periféricos, levando a paraparesia progressiva e disfunção esfíncteriana. Aproximadamente 40% dos pacientes também apresentam algum grau de envolvimento cerebral e depressão (Moser *et al*, 1991a; Dubois-Dalcq *et al.*, 1999). Em contraste com as formas cerebrais da X-ALD, a AMN parece ser uma axonopatia que envolve mais severamente os aspectos distais dos axônios com a perda da mielina da medula espinhal. A incapacidade neurológica é lentamente progressiva, de modo que dentro de 5 a 15 anos após o início da doença os distúrbios do andar tornam-se graves e requerem o uso de bengala ou de cadeira de rodas (Moser *et al*, 2001). Nesta forma clínica a insuficiência adrenal pode preceder, coincidir ou seguir o início do comprometimento neurológico (Fournier *et al*, 1994).

1.4.1.5 Doença de Addison isolado

Alguns pacientes com o defeito bioquímico da X-ALD manifestam apenas sinais de insuficiência adrenocortical e são referidos como Doença de Addison isolado, apresentando insuficiência adrenal isolada (Aubourg *et al.*, 1991). A Doença de Addison isolado na X-ALD parece ser diretamente atribuída ao acúmulo dos VLCFA, enquanto a patogênese das lesões no sistema nervoso parece ser mais complexa. É estimado que quase 90% dos homens com a forma cALD ou com AMN tem graus variados de insuficiência adrenal. A insuficiência adrenal isolada pode ser um sinal precoce da forma cerebral infantil ou da AMN, podendo preceder a expressão clínica completa da X-ALD (Seneca e Lissens, 1995). É provável que adolescentes e adultos

com o fenótipo de Addison isolado eventualmente desenvolvam AMN. Entretanto, não existe nenhuma correlação entre a presença ou severidade do envolvimento adrenal e o tipo ou severidade do envolvimento neurológico (Moser *et al*, 1992). O intervalo entre o início da insuficiência adrenal e o dano neurológico é variável, mas pode ser tão longo quanto 32 anos (Moser *et al*, 2001). Embora livres de sintomas neurológicos evidentes, alguns pacientes apresentam anormalidades ao exame clínico-neurológico cuidadoso ou têm alterações do sistema nervoso central na avaliação por ressonância magnética (Moser *et al*, 1991a; Dubois-Dalcq *et al.*, 1999).

1.4.1.6 Olivo-ponto-cerebelar

Há 8 registros de pacientes X-ALD que apresentaram a atrofia olivo-ponto-cerebelar como manifestação clínica. Sete dos oito registros eram oriundos do Japão. Apenas um paciente apresentou essa manifestação clínica na infância (5 anos e 7 meses de idade), o restante, na idade adulta. A ataxia cerebelar foi um sintoma marcante, na maioria das vezes, combinado com envolvimento do trato corticoespinal. A doença é progressiva, tornando posteriormente evidentes anormalidades na substância branca cerebral (Moser *et al.*, 2001).

1.4.1.7 Forma assintomática

Os pacientes X-ALD que manifestam a forma assintomática são caracterizados por apresentarem a anormalidade genética e o acúmulo característico de VLCFA nos tecidos, sem envolvimento neurológico, nem adrenal. Alguns estudos mostram hipofunção adrenal ou sinais sutis de AMN (Moser *et al.*, 2001).

1.4.2 Diagnóstico

O diagnóstico da X-ALD depende da apresentação de níveis anormalmente elevados de VLCFA saturados em fluidos corporais como soro ou plasma e/ou em tecidos acessíveis como fibroblastos cultivados, leucócitos, eritrócitos, fígado e músculo. Pela facilidade de obtenção, inicialmente a análise de soro ou de plasma tem sido a mais utilizada na rotina. Uma grande variedade de métodos cromatográficos tem sido descritos para a determinação de VLCFA. Muitos laboratórios utilizam o procedimento original desenvolvido por Moser e Moser (1991), o qual envolve a preparação de um extrato de lipídios totais, o tratamento desse extrato com ácido clorídrico metanólico (produzindo metilésteres), a purificação dos metilésteres através de cromatografia de camada delgada (CCD) e a quantificação por cromatografia gasosa (Dacremont *et al.*, 1995). Para a correta interpretação do resultado das análises, é necessário a concentração do ácido hexacosanóico ($C_{26:0}$), bem como, verificar as razões $C_{26:0}/C_{22:0}$ (ácido docosanóico) e $C_{24:0}/C_{22:0}$. Apesar das concentrações de VLCFA em pacientes X-ALD serem menos acentuadas do que outras doenças peroxissomais, na maior parte das vezes (acima de 90%) todos os três parâmetros estão mais do que dois desvios padrões acima dos valores médios dos controles (tabela 2). Estudos recentes têm demonstrado que em uma pequena parcela destes pacientes apenas um ou dois destes três parâmetros podem ser considerados anormais. Nesta situação, nova amostra de plasma é analisada e, caso o diagnóstico não seja esclarecido, fibroblastos cultivados de pele são indicados para estudos especiais. Se a quantidade de VLCFA no plasma é anormal e o paciente está sob suspeita de sofrer uma forma variante ou de uma desordem peroxissomal diferente da X-ALD, procedem-se estudos adicionais em

plasma, eritrócitos, plaquetas e fibroblastos (Wanders *et al.*, 1992; Wanders *et al.*, 1993, Wanders *et al.*, 1994).

A tabela 2 apresenta os valores em $\mu\text{mol/L}$ dos VLCFA em plasma de pacientes com X-ALD, com heterozigose para X-ALD e de uma população normal.

Tabela 2 Valores referenciais de VLCFA para o plasma em $\mu\text{mol/L}$.

	C_{22:0}	C_{24:0}	C_{26:0}	Razão C_{24:0}/C_{22:0}	Razão C_{26:0}/C_{22:0}
Indivíduos normais					
(n=30)					
Média	79,8	53,8	1,16	0,72	0,02
Limite 5%-95%	40,7-118,9	31-76,5	0,78-1,54	0,6-0,84	0,01-0,03
Heterozigotos para X-ALD					
(n=30)					
Média	28,2	19,1	1,42	0,50	0,05
Limite 5%-95%	6,7-49,8	0-39,7	0,66-2,20	0,32-0,68	0,04-0,06
Pacientes X-ALD					
(n=30)					
Média	57,2	71,6	4,32	1,31	0,08
Limite 5%-95%	29,9-84,5	35,6-107,6	1,62-7,02	0,89-1,73	0,04-0,12

Fonte: Laboratório de análises de Metabólitos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

A detecção de heterozigotos é possível na X-ALD, através da análise dos VLCFA no soro ou fibroblastos ou pela análise de DNA. Segundo Moser e col. (2001) 80% dos heterozigotos obrigatórios apresentam níveis anormais de VLCFA plasmático. Tal percentagem é mais alta (95%) ao analisar os níveis de VLCFA em fibroblastos, o que indica que a detecção de heterozigotos pode ser mais sensível se este tecido é analisado (Wanders *et al.*, 1993).

Apenas as novas metodologias moleculares de diagnóstico são capazes de identificar a mutação responsável pela X-ALD (gene Xq28) no afetado, permitindo,

deste modo, a identificação precisa da mulher portadora (Migeon *et al.*, 1981; Auborg *et al.*, 1987). Mais de 150 diferentes mutações foram descritas até hoje, não sendo possível, entretanto identificar associações entre mutações específicas e fenótipos clínicos (Braun *et al.*, 1995; Dodd *et al.*, 1997).

1.4.3 Tratamento

Apesar das pesquisas e dos esforços em andamento, o tratamento para X-ALD é ainda considerado experimental, não havendo nenhuma terapia satisfatória. Várias opções de tratamentos (modificações na dieta, uso de drogas e transplante de medula óssea) têm sido utilizadas na tentativa de atingir os três principais objetivos de um tratamento bem sucedido: estabilizar a insuficiência adrenal, diminuir a concentração de VLCFA no plasma e diminuir a desmielinização no cérebro (Moser *et al.*, 2001).

A insuficiência adrenal, caso não tratada, pode ser letal devido às baixas concentrações plasmáticas de cortisol e de ACTH, que devem ser monitoradas em intervalos regulares. Quando esses níveis são considerados insuficientes, o paciente é submetido a um tratamento de reposição desses hormônios esteróides. Essa reposição hormonal normalmente se dá por administração via oral de glicocorticóide (acetato de cortisona) ou de mineralocorticóide (fludrocortisona). Esse tratamento auxilia na melhoria da insuficiência adrenal, oferecendo uma melhor qualidade de vida ao paciente, mas não altera a progressão da incapacidade neurológica (Moser *et al.*, 2001; Van Geel *et al.*, 1997).

Com a observação de que administração oral de $C_{26:0}$ marcado radiotivamente para um paciente X-ALD em estágio terminal, o ácido graxo atingia o cérebro, conclui-se que o $C_{26:0}$ acumulado no cérebro era originado, pelo menos em parte, da dieta (Kishimoto *et al.*, 1980). Assim, um tratamento que diminuía a ingestão oral diária de produtos ricos em VLCFA (principalmente, $C_{26:0}$) foi desenvolvido (Van Duyn *et al.*, 1984). Contudo, este tratamento falhou, não diminuindo adequadamente os níveis de $C_{26:0}$ no plasma (Brown *et al.*, 1982). Isto sugeriu que os VLCFAs acumulados em pacientes X-ALD são predominantemente originários da síntese endógena. Mais tarde, um excesso de biossíntese de VLCFA foi observado em fibroblastos de pele de pacientes X-ALD (Tsuji *et al.*, 1985).

Foi demonstrado que o ácido oleico ($C_{18:1}$), um ácido graxo monoinsaturado, inibia competitivamente o sistema de alongação dos VLCFA, interferindo deste modo na biossíntese de VLCFA (Rizzo *et al.*, 1986). Alguns efeitos positivos no tratamento da X-ALD foram observados quanto à dieta de restrição de gordura associada a administração de ácidos graxos monoinsaturados (ácido oleico) em combinação com glicerol – gliceroltrioleato (GTO). Esta terapêutica diminuiu os níveis de $C_{26:0}$ no plasma em torno de 50% em 4 meses, mas eles ainda eram duas vezes superiores aos normais (Moser *et al.* 1991a).

Rizzo e col. (1987) demonstraram que a administração de GTO juntamente com gliceroltrierucato (GTE) diminuiu acentuadamente os VLCFA no plasma. A mistura 4:1 de GTO e GTE, chamada de “Óleo de Lorenzo” (OL), normalizou os níveis de $C_{26:0}$ em quatro semanas de tratamento no plasma da maioria dos pacientes. Esta terapêutica tem sido usada atualmente, apesar dessa diminuição de

C_{26:0}, seus benefícios clínicos são limitados, pois não há regressão dos sintomas, principalmente neurológicos, já instalados (Moser *et al.*, 2001).

Outras terapias para X-ALD têm sido utilizadas e/ou estudadas: transplante de medula óssea, modulação da resposta inflamatória com agentes tais como β -interferon e plasmaferese, além da terapia gênica.

O transplante de medula óssea (TMO) é o método mais efetivo atualmente para a terapia de cALD, nos casos em que a forma cerebral for detectada em estágios iniciais da doença, sendo o único método que melhora a desmielinização cerebral (Moser *et al.*, 2001). O primeiro TMO ocorreu em 1984 em um menino de 12 anos de idade, já com comprometimento neurológico importante. Suas anormalidades cerebrais não melhoraram após o transplante e ele morreu 141 dias após a cirurgia (Moser *et al.*, 2001). Estudos subseqüentes afirmaram que TMO em pacientes com maior incapacidade neurológica não melhorava o estado neurológico e poderia até acelerar a deterioração. O primeiro TMO bem sucedido ocorreu em 1990 em um menino de 8 anos de idade com anormalidades leves na função psicométrica, na função motora, no estado neurológico e na imagem de ressonância magnética. O procedimento regrediu as manifestações neurológicas e restaurou suas funções cognitivas como normais, apesar dos leves aumentos nos níveis de VLCFA (Auborg *et al.*, 1990). Krivit e col. (1992), relataram que os resultados de TMO em pacientes com leve envolvimento neurológico eram bastante animadores.

Os mecanismos de ação desses efeitos benéficos do TMO ainda não estão completamente compreendidos. Acredita-se que os seguintes fatores estejam

envolvidos: a) o suprimento de enzimas normais ao cérebro através de células derivadas do TMO (microglia); b) imunossupressão associada com o transplante; c) a transferência de um gene modificador favorável. Devido a seus altos riscos e a necessidade de se ter um doador imunologicamente compatível, a indicação desse procedimento deve ser cuidadosamente analisada.

A resposta inflamatória, a qual pode ser mediada através das citocinas inflamatórias ou por mecanismos imunes, parece ter grande importância na patogênese das lesões desmielinizantes (Moser *et al.*, 2001). Assim, considerando a rápida progressão dessas lesões em X-ALD possivelmente associadas à resposta inflamatória no cérebro, a redução dessa resposta é terapeuticamente interessante. Até então, esforços em atingir esse objetivo não obtiveram sucesso, tendo sido testados com ciclofosfamida e interferon β -1a (Stumpf *et al.*, 1981; Korenke *et al.*, 1997).

Kemp e col. (1998) verificaram que o tratamento de células de pacientes X-ALD, assim como de camundongos “knock-out” para o gene ALD, com 4-fenilbutirato (4PBA) diminuiu os níveis teciduais de VLCFA. Também foi observado um aumento da expressão da proteína ALDP com proliferação de peroxissomos. Testes clínicos amplos com 4PBA em pacientes X-ALD estão em andamento (Stop ALD foundation, 2003).

Singh e col. (1998 a e b) verificaram que a lovastatina (um inibidor da HMG-CoA redutase) e o fenilacetato de sódio (inibidor do mevalonato pirofosfato descarboxilase) normalizaram os níveis de VLCFA em fibroblastos de pele de pacientes X-ALD.

O dano neurológico na X-ALD pode ser mediado por ativação de astrócitos e indução de citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral α - TNF α , interleucinas - IL1 β e IL6). O tratamento com LO e dieta não estão direcionados para os aspectos neuroinflamatórios da doença. Singh e col. (1998b) mostraram em modelos animais que a lovastatina e o fenilacetato de sódio inibem a liberação das citocinas pró-inflamatórias e a indução da óxido nítrico sintetase (ONS) envolvidas na patogênese do dano neurológico na X-ALD. A resposta clínica à terapia com lovastatina foi estudada por Pai e col. (2000), principalmente por ela inibir o processo neuroinflamatório característico da doença. No entanto, estudos *in vivo* demonstraram que o tratamento de ratos “knock-out” para X-ALD com lovastatina e com simvastatina (outro inibidor da HMG-CoA redutase) resultou em nenhuma mudança ou até em aumento dos níveis teciduais de VLCFA, respectivamente (Cartier *et al.*, 2000; Yamada *et al.*, 2000).

No futuro a terapia gênica, poderá ser o passo fundamental para a possibilidade de cura da X-ALD. Atualmente, estudos estão em andamento, porém não suficientemente eficientes para justificar testes clínicos (Unterranier *et al.*, 2000).

1.4.3.1 Óleo de Lorenzo

Óleo de Lorenzo é uma mistura na proporção de 4:1 de GTO e de GTE, utilizada na terapia da X-ALD em combinação com uma dieta restrita em gordura saturada.

O gliceroltrierucato (GTE), conhecido quimicamente como [1,2,3-Propanotriol tri(13-docosenoato)], é um glicerol esterificado com 3 moléculas de ácido erúico ($C_{22:1}$), o qual é um ácido monoinsaturado não ramificado com 22 carbonos na cadeia. Seu peso molecular é 1053,75. As fórmulas molecular e estrutural estão demonstradas na figura 2.

O ácido erúico não é uma gordura usual da dieta, exceto em algumas partes da Índia e da China. É um componente do óleo de Colza (Moser *et al.*, 2001), membro da família das mostardas.

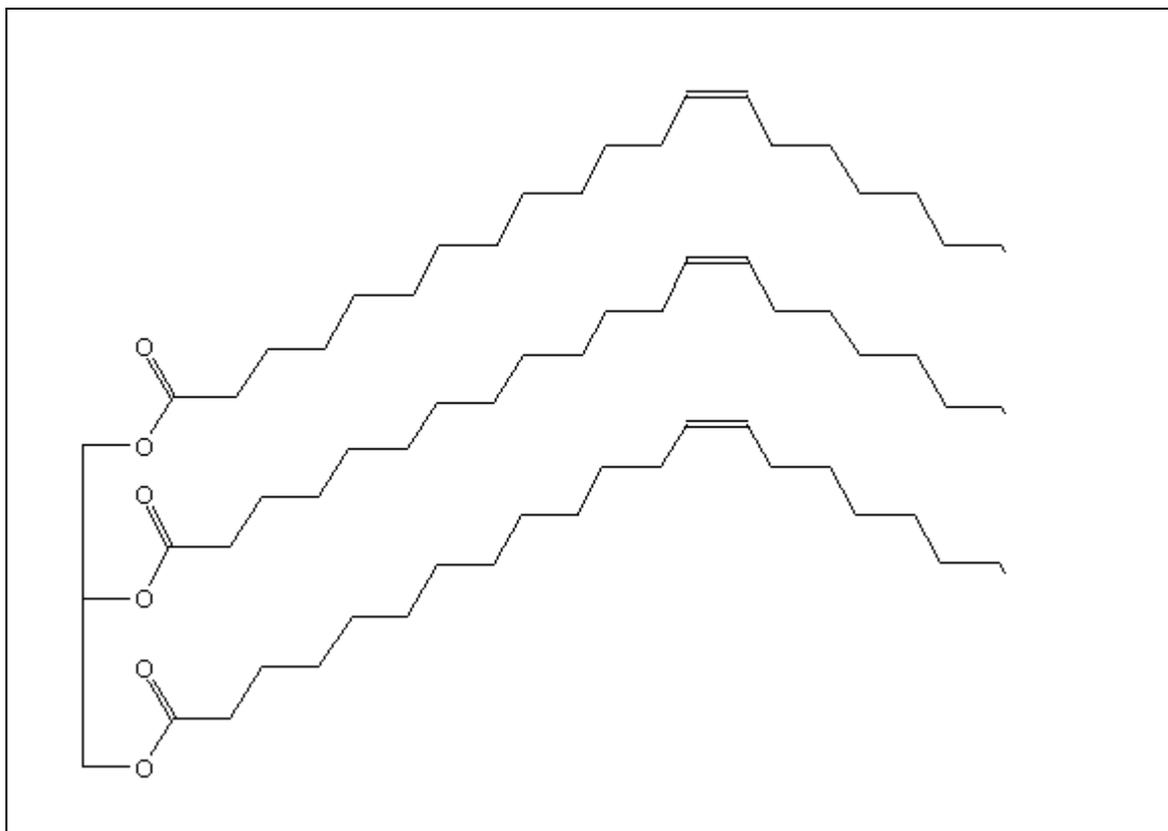


Figura 2 Fórmula molecular ($C_{69}H_{128}O_6$) e estrutural de GTE (ChemIDplus, 2003).

O gliceroltrioleato (GTO), quimicamente conhecido como [1,2,3-Propanotriol tri(9-octadecenoato)], é um óleo especial purificado contendo em torno de

90% de ácido oleico. Seu peso molecular é 885,43. As fórmulas molecular e estrutural estão demonstradas na figura 3.

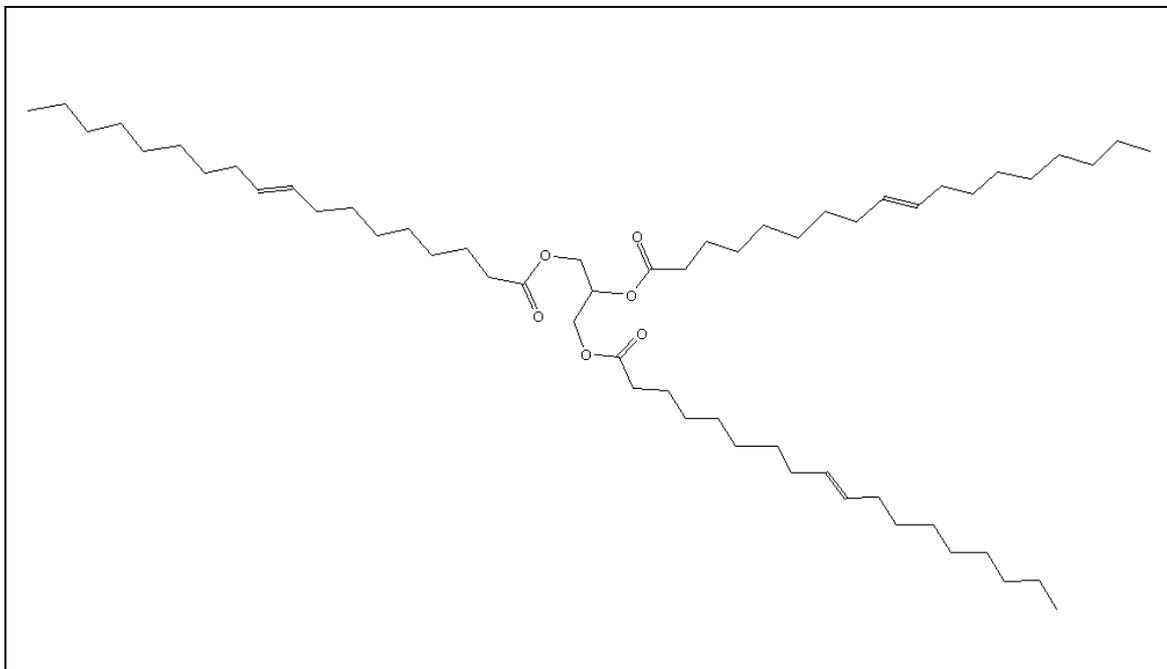
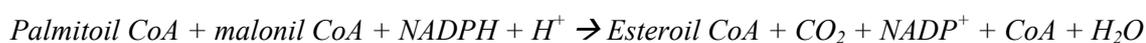


Figura 3 Fórmula molecular ($C_{57}H_{104}O_6$) e estrutural de GTO (ChemIDPlus, 2003).

O ácido oleico está presente em muitos alimentos como no óleo de milho (25%), no óleo de sementes de girassol (21%) ou no óleo de oliva (71%). Diferentemente dos outros óleos, o GTO tem apenas traços de VLCFA (Borel, 1992).

Os VLCFA presentes nos tecidos humanos são derivados tanto da dieta quanto da biossíntese endógena. A síntese de ácidos graxos com cadeia maior que 16 carbonos é executada por um sistema de alongação dos ácidos graxos. Tal sistema ocorre tanto na mitocôndria quanto nos microsossomos.

A estequiometria da reação de alongação no sistema microsossomal é:



Com esta reação, um ácido graxo de 16 carbonos - C₁₆ (palmítico) é alongado a C₁₈. A síntese dos VLCFA é realizada por repetidas adições de malonil CoA. Assim, duas unidades de carbono são adicionadas repetidamente até que a cadeia é completada. A ativação e subsequente β -oxidação peroxissomal dos VLCFA são processo complexos que envolvem a ação coordenada de múltiplas enzimas e de proteínas acil carreadoras (Figura 1) (Moser *et al.*, 2001).

Bourre e col. (1976) concluíram que uma única enzima é responsável pela elongação do C_{22:0} e dos monoinsaturados, entre eles o C_{22:1} (Figura 4).

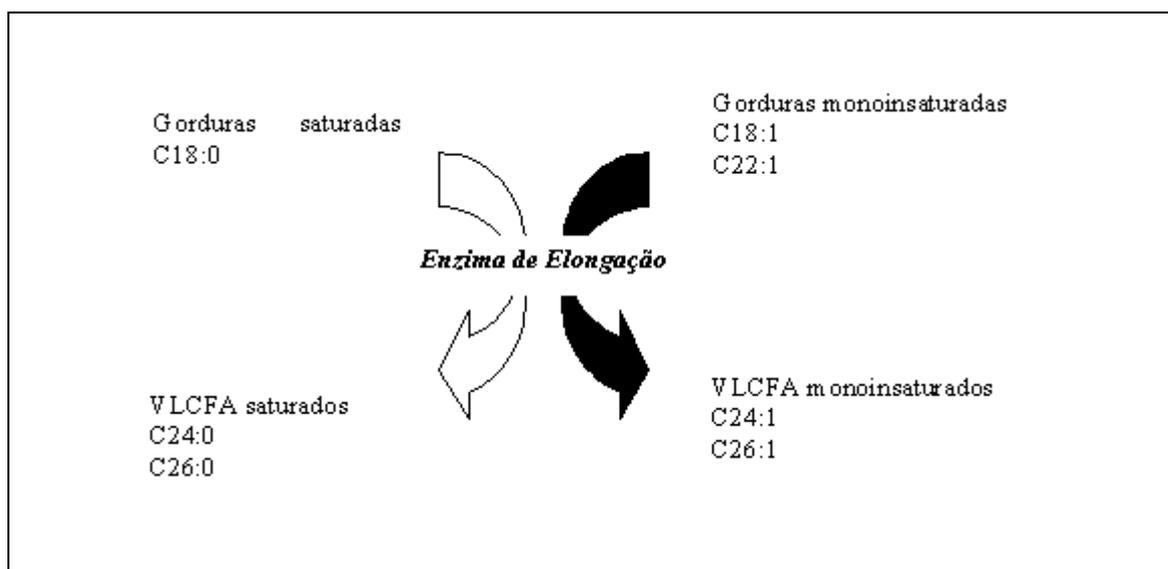


Figura 4 Elongamento das gorduras saturadas e monoinsaturadas (Borel, J., 1992 K Kennedy Krieger Institute).

Foi demonstrado que a administração de ácidos graxos monoinsaturados a pacientes diminui a síntese dos VLCFA saturados (Moser *et al.*, 2001). Bourre e colaboradores (1976) demonstraram que um mesmo sistema enzimático alonga ácidos graxos saturados e insaturados e que a redução da síntese de VLCFA saturados decorre da competição com ácidos graxos monoinsaturados por esse sistema de enzimas. O

resultado é a diminuição na quantidade de VLCFA saturados produzidos. A quantidade de VLCFA monoinsaturados aumenta, porém esses ácidos graxos são menos tóxicos para células do que os saturados e diferentemente dos saturados são metabolizados (Borel, 1992). Koike *et al* (1991) propuseram que esse efeito era devido à inibição da primeira etapa do sistema de alongação microsomal dos ácidos graxos.

Essas observações, juntamente com as de Rizzo e col (1989) de que a adição de GTE produzia uma diminuição marcante dos VLCFA no plasma, permitiram o desenvolvimento da mistura 4:1 de GTO-GTE. Essa mistura foi denominada “Óleo de Lorenzo” (OL) em homenagem a Lorenzo, menino que apresentava cALD e cujos pais foram os principais incentivadores da produção desse óleo.

A dosagem recomendada do OL é dependente da idade, do peso corporal e das condições do paciente (Scientific Hospital Supplies, 1994). Em geral, administra-se 2-3ml/kg/dia do óleo (Van Duyn *et al.*, 1984). Além disso, OL é livre de lactose, de glúten, de proteína, de frutose e de sacarose. As tabelas 3 e 4 mostram as informações nutricionais sobre óleo. O OL deve ser mantido em local refrigerado e ser descartado um mês depois de aberto (Scientific Hospital Supplies, 1994).

Tabela 3 Informação nutricional do OL.

Informação Nutricional	por 100 ml de OL
Energia (kcal)	806
Proteína	Não adicionado
Carboidrato	Não adicionado
Gordura (g)	89.5

Fonte: Scientific Hospital Supplies, 1994

Tabela 4 Perfil de ácidos graxos presentes em 100g de OL.

Perfil de Ácido Graxo (g)	por 100g de OL
C _{16:0}	0.6
C _{18:0}	2.0
C _{18:1}	73.9
C _{18:2}	3.1
C _{20:1}	0.2
C _{22:1}	18.2
C _{24:1}	0.3

Fonte: Scientific Hospital Supplies, 1994

Ao uso da mistura GTO-GTE, são recomendadas a associação de uma dieta restrita em VLCFA (tabela 5) e a suplementação com multivitaminas, com minerais e com uma fonte de ácidos graxos essenciais (Moser *et al.*, 2001). Essa restrição da ingesta de VLCFA almeja que apenas 10-15% das calorias totais sejam provenientes da ingestão de gordura (Van Geel *et al.*, 1999).

Tabela 5 Alimentos permitidos e não permitidos em uma dieta restrita de VLCFA.

Alimentos permitidos
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Laticínios não gordurosos (leite, queijos de baixa caloria e iogurte desnatados). ▪ Cortes magros de carnes bovina e suína. ▪ Aves sem pele. ▪ Peixes com baixa gordura.
Alimentos proibidos
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gorduras saturadas. ▪ Gorduras industrializadas (manteiga, cremes, todos os leites, sorvetes). ▪ Gorduras encontradas em carnes e em derivados de origem animal (banha). ▪ Óleos vegetais

Fonte: Borel, 1992.

O principal efeito adverso do uso do OL é a trombocitopenia, que pode ocorrer em até 40% dos pacientes tratados com óleo (Zinkham *et al.*, 1993). A quantidade total plaquetas parece estar inversamente relacionada aos níveis do ácido erúico nos lipídeos plaquetários. Além da trombocitopenia, há outros efeitos adversos listados na tabela 6. Por outro lado, o GTO apresenta pouco ou nenhum efeito adverso sobre as plaquetas. Caso a contagem das plaquetas esteja abaixo de 100 000, é

necessário que OL seja substituído pelo uso de apenas do GTO. Tal procedimento resulta em um aumento do número de plaquetas em 1 a 2 meses, porém a normalização nem sempre é completa. Há também o risco de deficiência de ácidos graxos essenciais por parte dos pacientes. Tal deficiência pode ser corrigida em parte através da suplementação com compostos como óleo de açafrão e ácidos graxos ω 3 na forma de cápsulas de óleo de peixe (Moser *et al.*, 2001). Além disso, pacientes tratados com OL podem ainda apresentar uma razão alta na concentração dos ácidos trienóico-tetranóico, o que pode estar associada à deficiência dos ácidos graxos essenciais (Moser *et al.*, 1992).

Tabela 6 Principais efeitos adversos encontrados em pacientes X-ALD tratados com OL.

Efeitos adversos
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Trombocitopenia ▪ Aumento das enzimas hepáticas ▪ Transtornos gástricos ▪ Gengivite ▪ Leve diminuição na concentração de hemoglobina e no número de leucócitos ▪ Linfocitopenia ▪ Diminuição da atividade de células NK

Fonte: Chaves-Carballo, 2003

O tratamento com OL juntamente com uma dieta que restringe o consumo de gorduras saturadas resulta em uma importante diminuição dos VLCFA acumulados, portanto uma considerável melhora bioquímica. Porém, essa terapia apresenta baixo benefício clínico em pacientes neurologicamente afetados. Assim, por não beneficiar significativamente a clínica de pacientes sintomáticos, seu uso não parece ser justificado nestes pacientes devido seus efeitos colaterais, como a trombocitopenia (Zinkham *et al.*, 1993).

Vários estudos foram realizados no intuito de verificar a validade do uso do OL no tratamento de X-ALD. Os resultados desses estudos estão apresentados de maneira sucinta na tabela 7. Foi verificado que o OL reduz os níveis de C_{26:0} no plasma, deixando-os próximos aos níveis normais. Entretanto, em pacientes com sintomas neurológicos, o uso desse tratamento não reduz ou prorroga a progressão da doença.

Tabela 7 Estudos realizados sobre o efeito do óleo de Lorenzo na X-ALD.

Estudos	Pacientes incluídos	Resultados e conclusões	Referências
<i>Dietary erucic acid therapy for x-linked adrenoleukodystrophy.</i>	12 pacientes X-ALD	C _{26:0} plasmático retornou a níveis normais em 4 semanas	Rizzo <i>et al.</i> , 1989
<i>Experience on therapy of adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy</i>	6 severamente afetados 9 neurologicamente afetados (leve) 5 pré-sintomáticos	C _{26:0} plasmático retornou a níveis normais em 4 semanas. Indivíduos pré-sintomáticos permaneceram livres de sintomas por após um ano de terapia. Os sintomáticos pioraram ou não apresentaram nenhuma melhora clínica	Uziel <i>et al.</i> , 1991
<i>A two-year trial of oleic acid and erucic acids ("Lorenzo's oil") as treatment for adrenomyeloneuropathy.</i>	14 AMN 5 heterozigotas sintomáticas 5 meninos (13 anos) com diagnóstico pré-clínico AMN	C _{26:0} plasmático retornou a níveis normais. Pré-sintomáticos continuaram livre de sintomas após um ano.	Aubourg <i>et al.</i> , 1993 a
<i>Adrenoleukodystrophy: natural history, treatment, and outcome.</i>	53 pacientes X-ALD assintomáticos	C _{26:0} plasmático retornou a níveis normais em 65%, sendo que 23% obtiveram redução intermediária. Os resultados parecem favoráveis e sugerem que o uso de OL pode reduzir a frequência e a severidade de um envolvimento neurológico posterior em pacientes X-ALD tratados antes dos sintomas neurológicos.	Moser, 1995
<i>Glyceroltrioleate/glyceroltrierucate therapy in 16 patients with x-chromosomal adrenoleukodystrophy/adrenomyeloneuropathy: effect on clinical, biochemical and neurophysiological parameters.</i>	6 cALD 3 AMN 2 Addison 5 assintomáticos	Todos apresentaram normalização dos níveis de C _{26:0} em 1-3 meses. Nenhum dos assintomáticos desenvolveram sintomas neurológicos. AMN e cALD apresentaram progressão da doença.	Korenke <i>et al.</i> , 1995
<i>Progression of abnormalities in adrenomyeloneuropathy and neurologically asymptomatic X-</i>	2 assintomáticos 3 D. Addison 13 AMN	Os níveis de C _{26:0} plasmáticos normalizaram em 85% dos pacientes. Incapacidades	Van Geel <i>et al.</i> , 1999

<i>linked adrenoleukodystrophy despite treatment with "Lorenzo's oil".</i>	3	heterozigotas sintomáticas.	estavam levemente aumentadas em 16 com sintomas neurológicos.	
<i>Neurophysiologic follow-up of long-term dietary treatment in adult-onset adrenoleukodystrophy.</i>	8	AMN	Os níveis de C _{26:0} plasmáticos normalizaram em todos os pacientes. Escala EDSS piorou em 6 e não se modificou em 2 pacientes.	Restuccia <i>et al.</i> , 1999.
<i>The clinical course of childhood and adolescent adrenoleukodystrophy before and after Lorenzo's oil.</i>	15	pacientes com cALD e forma juvenil tratados com óleo depois da progressão dos primeiros sintomas	Antes do tratamento, observase o curso natural de aparecimento de sintomas. Não há efeito evidente do óleo de Lorenzo quanto a progressão de sintomas.	Suzuki <i>et al.</i> , 2001
<i>Evaluation of the preventive effect of glyceryl trioleate-trierucate ("Lorenzo's Oil") therapy in X-linked adrenoleukodystrophy. Results of two concurrents studies.</i>	69	pacientes americanos e 36 europeus	Recomenda-se que a terapia com óleo de Lorenzo seja oferecida a pacientes neurologicamente assintomáticos que tenham menos de 6 anos de idade e uma RNM normal.	Moser <i>et al.</i> , 2002

1.5 Radicais Livres

1.5.1 Definição e generalidades

Os átomos contêm um núcleo e os seus elétrons movem-se ao redor desse núcleo, usualmente aos pares. Um radical livre é qualquer átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons não pareados. Esses elétrons não pareados alteram a reatividade química de um átomo ou molécula, fazendo-o mais reativo, ou seja, apresentando uma forte tendência a iniciar reações em cadeia pela retirada de um elétron da molécula vizinha para completar seu próprio orbital (Halliwell, 1994).

Os radicais livres podem ser produzidos pela perda de um elétron por um átomo não radical ou no caso do rompimento de uma ligação covalente, caso cada um dos átomos envolvidos fique com um elétron. Portanto, radical livre é qualquer espécie

capaz da existência independentemente de conter um ou mais elétrons não pareados (Halliwell e Gutteridge, 1990).

Várias são as fontes geradoras de radicais livres. Afinal, os sistemas biológicos são expostos a radicais livres que são formados endogenamente (subprodutos do metabolismo aeróbico) ou que são resultados de influências externas, como a radiação ionizante e a exposição à radiação eletromagnética (Southorn e Powis, 1988; Wulf, 2001).

O oxigênio molecular tem dois elétrons desemparelhados, cada um está localizado em um orbital diferente. Estes dois elétrons possuem *spins* paralelos que proporciona a molécula uma certa estabilidade. Além disso, faz com que o oxigênio molecular aceite reagir apenas com um elétron por vez, impedindo que atue como um radical livre (Halliwell e Gutteridge, 1984 e Boveris, 1998). Como consequência da respiração aeróbica normal, o oxigênio molecular é consumido pela mitocôndria, através de uma redução seqüencial a água (Figura 5). O oxigênio molecular é capaz de aceitar quatro elétrons, aceitando um elétron de cada vez. Assim, essa redução do oxigênio molecular gera espécies reativas de oxigênio como seus produtos inevitáveis (Ames *et al.*, 1993).

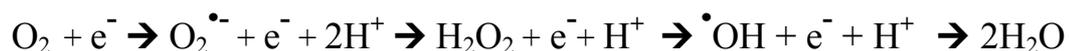


Figura 5 Redução seqüencial de oxigênio molecular. Nos estágios intermediários, são formados ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\bullet).

O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, os primeiros compostos a serem formados, são as espécies ativas consideradas menos danosas, pois não são tão reativas quanto o radical hidroxila. Na maioria das vezes, o produto final dessa reação é o peróxido de hidrogênio, porém, na presença de metais de transição como Fe(II) e Cu(I), ele é convertido a radical hidroxila. O radical hidroxila é extremamente lesivo, pois reage com quase todas substâncias orgânicas. Esta reação é chamada de reação de Fenton (Figura 6) (Halliwell e Gutteridge, 2001).



Figura 6 Produção de radical hidroxila pela reação de Fenton.

Essa não é a única forma de geração de radical hidroxila, ele também é formado pela reação de Haber-Weiss: o peróxido de hidrogênio é reduzido formando o radical hidroxila mediante a transferência de um elétron do íon superóxido na presença de íons de metais catalíticos. O radical hidroxila é formado principalmente pela reação de Fenton, pois a reação de Haber-Weiss é bastante lenta (Halliwell e Gutteridge, 2001).

A redução parcial de oxigênio ocorre nos sistemas biológicos, gerando as espécies ativas de oxigênio que são potencialmente lesivas a proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. O radical superóxido e outras EAO são formados em todos organismos aeróbios por reações enzimáticas e não enzimáticas, assim seus níveis aumentam tanto em processos fisiológicos quanto em patológicos, mas há mecanismos eficientes para sua detoxificação (Bergendi *et al.*, 1999).

Além das EAO, existem outros radicais livres que apresentam atividade fisiológica, bem como atividade tóxica, são as espécies ativas de nitrogênio. O óxido nítrico (NO^{\bullet}) é um radical livre gerado nos sistemas biológicos pela óxido nítrico sintetase (ONS). Devido aos seus efeitos na neurotransmissão, na vasodilatação e na resposta imune, NO^{\bullet} desempenha um papel importante considerando aspectos fisiológicos, patológicos e farmacológicos (Giulivi, *et al.*, 1998).

A toxicidade da NO^{\bullet} envolve reações de oxidação, mas o óxido nítrico por si só é um fraco oxidante. Contudo, o óxido nítrico pode ser convertido a um potente oxidante ao reagir com o radical superóxido produzindo peroxinitrito (ONOO^{\bullet}) e o seu conjugado ácido, o ácido peroxinitroso (ONOOH). O peroxinitrito é capaz de oxidar tióis, lipídios e resíduos de metionina no sítio ativo do inibidor $\alpha 1$ proteinase (Pryor *et al.*, 1994).

1.6 Defesas antioxidantes

A formação de radicais livres é um processo que pode decorrer de processos metabólicos normais com a autooxidação de formas reduzidas de carreadores de elétrons (como o NADPH), flavinas reduzidas, citocromo P-450, reações inflamatórias, síntese de óxido nítrico, etc. Do mesmo modo, fatores ambientais como irradiação (luz UV, raios X e γ) e poluentes na atmosfera (ozônio, N_2O_2 , NO_2 , fumaça de cigarro) podem levar a um aumento da atividade dos sistemas geradores de radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 2001; Ames *et al.*, 1993; Matés *et al.*, 1999).

Para evitar o dano celular por todo esse processo, os sistemas biológicos desenvolveram sistemas de defesa antioxidante, convertendo as espécies reativas em derivados inativos (Halliwell, 1994). Esses mecanismos de defesa incluem a prevenção da formação de radicais livres (antioxidantes preventivos), sequestro de radicais livres e processos de reparos (Travacio e Llesuy, 1996; Matés *et al.*, 1999).

Os antioxidantes podem ser definidos como ‘qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, significativamente retarda ou previne a oxidação desse substrato’ (Halliwell e Gutteridge, 2001). Os antioxidantes podem ser enzimáticos e não-enzimáticos.

As defesas antioxidantes compreendem:

- a) substâncias que impedem a geração de espécies reativas, bem como as removem (ex: enzimas antioxidantes);
- b) compostos que minimizam a viabilidade de formação de pró-oxidantes (agentes quelantes e proteínas – transferrina, cerublasmina);
- c) proteínas que protegem biomoléculas contra o dano por outros mecanismos, incluindo o dano oxidativo (ex: proteínas de choque térmico);
- d) agentes de baixo peso molecular que sequestram as EAO e EAN (ex: glutathione, α tocoferol, bilirrubina, e ácido úrico) (Halliwell e Gutteridge, 2001)

1.6.1 Enzimas antioxidantes

Os sistemas biológicos desenvolveram um sistema enzimático de defesa para proteger-se contra os efeitos danosos dos radicais livres nos processos oxidativos:

catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) (Halliwell, 1994; Matés *et al.*, 1999).

Catalase é uma hemoproteína presente em todas as células de mamíferos e está localizada, principalmente, nos peroxissomas. A catalase está presente nos eritrócitos e no fígado e em menor extensão no plasma, no coração, no pulmão e no cérebro, pois são órgãos que possuem um menor número de peroxissomas. Essa enzima controla os níveis de peróxido de hidrogênio, pois é responsável pela sua degradação: catalisa a transformação de duas moléculas de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Travacio e Llesuy, 1996; Halliwell e Gutteridge, 2001).

Superóxido dismutase é uma enzima presente em todos os organismos aeróbios, que catalisa a dismutação de dois radicais superóxidos, formando H_2O_2 e O_2 . Esta reação pode ocorrer de modo espontâneo em pH fisiológico, porém quando a SOD está presente a velocidade desta reação é 10^4 vezes maior (Halliwell e Gutteridge, 2001). Existem dois tipos principais:

- 1) CuZn-SOD (as que contêm cobre e zinco no sítio ativo) que são encontradas no citoplasma e nos fluídos celulares;
- 2) Mn-SOD (as que contêm manganês no sítio ativo): presentes na matriz mitocondrial (Travacio e Llesuy, 1996).

Glutathiona peroxidase é a enzima que catalisa a decomposição de hidroperóxidos, utilizando a glutathiona reduzida como co-substrato. A redução de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos se dá através da glutathiona reduzida (GSH) para formar glutathiona oxidada (GSSG) e o produto de redução dos hidroperóxidos (a água

ou álcoois) (Travacio e Llesuy, 1996). A glutathiona peroxidase é encontrada em todos os tecidos animais, apresentando alta atividade no fígado e nos eritrócitos, mas apresenta baixa atividade nos pulmões, no coração e menor ainda nos músculos. Essa enzima é considerada um dos principais sistemas de defesa antioxidante (Halliwell e Gutteridge, 2001; Matés *et al.*, 1999).

1.6.2 Defesas antioxidantes não enzimáticas

As defesas antioxidantes não enzimáticas compreendem as proteínas ligantes de metal (como a transferrina, a hemopexina, a ceruloplasmina e a ferritina), os metabólitos e co-fatores (ácido úrico, bilirrubina), os componentes provenientes da dieta (como os tocoferóis (vitamina E), o ácido ascórbico, os carotenóides, a vitamina A, os bioflavonóides). Além desses, estão incluídos a glutathiona, a melatonina, a haptoglobina e a albumina. O modo de atuação dos antioxidantes para proteger o organismo contra os radicais livres é bastante diverso, podendo abranger remoção do oxigênio presente no meio, seqüestro das EAO ou precursores, bem como a inibição da formação dessas espécies reativas (Halliwell, 1994). Outros mecanismos utilizados são o de quelação de íons metálicos por meio de proteínas transportadoras (ferritina e transferrina), o de reparo do DNA e o de degradação de proteínas lesadas (Halliwell e Gutteridge, 2001).

1.7 Estresse Oxidativo

Normalmente, são produzidas várias substâncias eletricamente instáveis e potencialmente reativas (os radicais livres) com moléculas biológicas capazes de causar

oxidação e dano irreversível à célula durante o metabolismo celular aeróbico. O organismo está normalmente em equilíbrio entre a produção e degradação de radicais livres, que existem em baixas concentrações em todos os tecidos biológicos (Wulf, 2001). Quando um desequilíbrio ocorre entre a capacidade antioxidante e as espécies reativas produzidas (pró-oxidantes), em favor destas, cria-se um estado que se denomina estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2001).

Perante o estresse oxidativo, o organismo pode reagir de duas formas: adaptando-se ou sofrendo injúria celular. Em um caso de estresse oxidativo brando, as células suportam e respondem a essa situação com um aumento na produção de defesas antioxidantes, tentando com essa adaptação restabelecer o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante. Entretanto, um estresse oxidativo severo pode causar injúria celular e quando muito intenso produz danos irreversíveis que leva a morte celular (Halliwell e Gutteridge, 2001).

O desequilíbrio pró-oxidante/antioxidante pode causar dano a todos os tipos de biomoléculas (DNA, proteínas e lipídios). Assim, o estresse oxidativo, entre outros fenômenos, pode (Halliwell e Gutteridge, 2001):

- a) alterar a permeabilidade seletiva da membrana celular, provocando alterações nas bombas iônicas;
- b) provocar mutações gênicas;
- c) favorecer a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade, permitindo que as mesmas acelerem os depósitos de colesterol nas paredes das artérias, favorecendo o processo artereosclerótico;

- d) formar resíduos químicos, como o malondialdeído, que atua como precursor de dois lipopigmentos (lipofucsina e material ceróide) relacionados com o processo de envelhecimento;
- e) danificar diferentes componentes da matriz extracelular (proteoglicanas, colágeno e elastina);
- f) colaborar para uma eventual desorganização do equilíbrio celular.

1.7.1 Dano celular causado por estresse oxidativo

As principais conseqüências secundárias ao estresse oxidativo em sistemas biológicos são:

- a) lipoperoxidação da membrana celular;
- b) oxidação de proteínas;
- c) lesão DNA/RNA celular.

A peroxidação de lipídios de membrana (lipoperoxidação) é um processo fisiológico contínuo que ocorre nas membranas celulares decorrente da ação dos radicais livres. Uma fonte importante para os radicais livres são os ácidos graxos insaturados encontrados na dupla camada de lipídeos das membranas celulares, que são vitais para o funcionamento da célula. Quando os radicais livres reagem com esses ácidos graxos insaturados, modificam os lipídeos, e a membrana perde suas propriedades, suas características estruturais, tornando-se menos firme e menos flexível, ocasionando alterações na permeabilidade celular. Isso favorece a entrada e

saída indiscriminada de metabólitos e detritos da célula, provocando sua ruptura e lise com necrose. Por outro lado, a lipoperoxidação também é um fator de renovação de membrana, além de ser essencial no processo de síntese de prostaglandinas e de leucotrienos, assim como na fagocitose e na pinocitose (Halliwell e Gutteridge, 2001).

As reações em cadeia são os mecanismos pelos quais caracteristicamente os radicais livres se reproduzem e se propagam. É um tipo de reação em que um radical livre reage com um composto não radical, resultando em outro radical livre, e assim sucessivamente. Essas reações são divididas em três partes (Halliwell e Gutteridge, 2001, Boveris, 1998):

- reações de iniciação (formação do radical livre): um radical livre é formado a partir de um composto estável não radical livre;
- reações de propagação (reação central): um radical livre reage com uma molécula estável, formando um outro radical livre;
- reações de terminação: dois radicais livres reagem entre si e formam um produto estável.

Os principais efeitos da lipoperoxidação sobre a membrana são a lesão na membrana, alteração da fluidez da membrana, o aumento da permeabilidade, alterando a seletividade e as trocas iônicas, acarretando o influxo excessivo de cálcio, o qual ativa as enzimas autolíticas causando proteólise e morte celular. Esses efeitos dependem de quão sensível o tecido (quantidade de material lipídico, nível de defesa antioxidante) está para a lipoperoxidação (Halliwell e Gutteridge, 2001).

A oxidação de proteínas, principalmente, decorre da ação dos radicais livres sobre os grupos tióis (grupo sulfidril e metionil), causando também agregação e fragmentação de aminoácidos, o que leva a desnaturação. Algumas das consequências da oxidação protéica são: redução ou inativação da atividade enzimática, dano a receptores, vias de transdução de sinais prejudicadas, transporte (Halliwell e Gutteridge, 2001).

A cisão do anel desoxirribose dos ácidos nucleicos pelos radicais livres, faz com que haja o rompimento da ligação desoxirribose-fosfato, com liberação de bases livres dos nucleotídeos. Isso promove inibição da síntese protéica e mutações, que são de grande importância na carcinogênese (Halliwell e Gutteridge, 2001).

1.7.2 Radicais livres e o sistema nervoso central

Os radicais livres parecem estar envolvidos em um grande número de enfermidades do ser humano. O cérebro tem níveis relativamente baixos de enzimas antioxidantes e um conteúdo lipídico relativamente alto com grandes quantidades de ácidos graxos insaturados e catecolaminas, os quais são substratos suscetíveis ao ataque das espécies reativas de oxigênio. Além disso, há outras razões para tamanha vulnerabilidade que o cérebro apresenta perante o estresse oxidativo, tais como (Halliwell e Gutteridge, 2001):

- Alto transporte de Ca^{++} através de membranas neuronais; qualquer alteração neste fluxo pode gerar estresse oxidativo.
- Presença de aminoácidos excitotóxicos, que podem gerar estresse oxidativo.
- Alto consumo de oxigênio por unidade de massa de tecido.

- Muitos neurotransmissores são moléculas autooxidáveis.
- Várias áreas do cérebro contêm altas concentrações de ferro (por exemplo a substância negra, o núcleo caudado, o putamen e o globo pálido).
- Ao contrário do plasma, o líquor não possui moléculas com significativa capacidade de ligação a ferro livre.
- As membranas lipídicas neuronais contêm alta quantidade de ácidos graxos de cadeia lateral poliinsaturada.
- O metabolismo cerebral normal gera peróxido de hidrogênio; um exemplo disso é a oxidação da dopamina pela monoaminaoxidase (MAO).
- O cérebro possui baixos níveis de defesas antioxidantes.
- Algumas células gliais (microglia), como os macrófagos, podem produzir $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 quando ativados.

Evidências têm se acumulado mostrando que o dano gerado pelos radicais livres é importante nas doenças neurodegenerativas, nas doenças crônico-inflamatórias, nas doenças vasculares e no câncer (Halliwell e Gutteridge, 1996). Várias doenças neurológicas nas quais parece haver envolvimento de radicais livres em sua fisiopatologia estão descritas: doença de Parkinson, doença de Alzheimer, isquemia, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, doenças inflamatórias, epilepsia, etc (Reznick e Packer, 1993; Przedborski *et al.*, 1996; Ben-Menachem *et al.*, 2000).

1.7.3 Estresse oxidativo e os erros inatos do metabolismo

Acredita-se também que o estresse oxidativo possa estar envolvido em diferentes erros inatos do metabolismo. Foi verificado que a geração de radicais livres

pode participar da disfunção neurológica de algumas acidemias orgânicas, como as acidemias propiônica e metilmalônica (Fontella *et al.*, 2000), bem como na acidemia glutárica (Kolker *et al.*, 2001). Além disso, a observação de que a administração de maleilacetoacetato e fumarilacetoacetato, dois metabólitos tóxicos formados na tirosinemia tipo I, podem depletar a glutatona, um importante antioxidante intracelular, sugere que os radicais livres estejam envolvidos nesta doença (Bird *et al.*, 1995).

A função primária da mitocôndria é gerar energia na forma de ATP. Isto é atingido pela fosforilação oxidativa que compreende o transporte de elétrons pelos quatro complexos da cadeia e pela ATP sintetase. Dano de um ou mais dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial pode resultar na depleção das reservas de energia celular e na morte celular. Por outro lado, o aumento da formação celular de espécies oxidantes pode levar ao dano mitocondrial, já que as proteínas componentes da cadeia respiratória mitocondrial são suscetíveis ao dano oxidativo. Desta forma poder-se-ia supor que o dano mitocondrial possa existir em alguns erros inatos do metabolismo onde ocorre o estresse oxidativo (Heales *et al.*, 1996; Richter *et al.*, 1995).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar vários parâmetros de estresse oxidativo na adrenoleucodistrofia ligada ao X.

2.2 Específicos

2.2.1 Avaliar parâmetros de estresse oxidativo em pacientes com adrenoleucodistrofia ligada ao X tratados e não tratados com LO:

2.2.1.1 Avaliar parâmetros de lipoperoxidação (quimiluminescência e espécies reativas do ácido tiobarbitúrico - TBARS) em plasma de pacientes com X-ALD;

2.2.1.2 Avaliar as defesas antioxidantes não-enzimáticas (medida do potencial antioxidante total - TRAP e medida da reatividade antioxidante total - TAR) em plasma de pacientes com X-ALD;

2.2.1.3 Avaliar as defesas antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) em eritrócitos e em fibroblastos de pacientes com X-ALD;

- 2.2.1.4 Verificar o efeito do tratamento com gliceroltrioleato/gliceroltrierucato (óleo de Lorenzo) sobre parâmetro de lipoperoxidação (espécies reativas do ácido tiobarbitúrico - TBARS) em plasma de pacientes com X-ALD;
- 2.2.1.5 Verificar o efeito do tratamento com gliceroltrioleato/gliceroltrierucato (óleo de Lorenzo) sobre as defesas antioxidantes não-enzimáticas (medida da reatividade antioxidante total -TAR) em plasma de pacientes com X-ALD;
- 2.2.1.6 Verificar o efeito do tratamento com gliceroltrioleato/gliceroltrierucato (óleo de Lorenzo) sobre as defesas antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) em eritrócitos de pacientes com X-ALD;
- 2.2.2** Avaliar o efeito *in vitro* da mistura ácido oleico (C_{18:1})/ácido erúcido (C_{22:1}) sobre diferentes parâmetros de estresse oxidativo em plasma e eritrócitos humanos e em córtex cerebral de ratos adicionados dos ácido hexacosanóico (C_{26:0}) e ácido tetracosanóico (C_{24:0}):
- 2.2.2.1 Verificar o efeito *in vitro* da mistura ácido oleico (C_{18:1})/ácido erúcido (C_{22:1}) em plasma humano adicionados dos ácidos hexacosanóico (C_{26:0}) e tetracosanóico (C_{24:0}) sobre parâmetros de lipoperoxidação (quimiluminescência e espécies reativas do ácido tiobarbitúrico - TBARS);
- 2.2.2.2 Verificar o efeito *in vitro* da mistura ácido oleico (C_{18:1})/ácido erúcido (C_{22:1}) em plasma humano adicionados dos ácidos hexacosanóico (C_{26:0}) e tetracosanóico (C_{24:0}) sobre as defesas antioxidantes não-enzimáticas (medida da reatividade antioxidante total -TAR);

- 2.2.2.3 Verificar o efeito *in vitro* da mistura ácido oleico (C_{18:1})/ácido erúcico (C_{22:1}) em eritrócitos humanos adicionados dos ácidos hexacosanóico (C_{26:0}) e tetracosanóico (C_{24:0}) sobre as defesas antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase);
- 2.2.2.4 Verificar o efeito *in vitro* da mistura ácido oleico (C_{18:1})/ácido erúcico (C_{22:1}) em córtex cerebral de ratos jovens adicionados dos ácidos hexacosanóico (C_{26:0}) e tetracosanóico (C_{24:0}) sobre parâmetros de lipoperoxidação (quimiluminescência e espécies reativas do ácido tiobarbitúrico - TBARS);
- 2.2.2.5 Verificar o efeito *in vitro* da mistura ácido oleico (C_{18:1})/ácido erúcico (C_{22:1}) em córtex cerebral de ratos jovens adicionados dos ácidos hexacosanóico (C_{26:0}) e tetracosanóico (C_{24:0}) sobre as defesas antioxidantes não-enzimáticas (medida da reatividade antioxidante total - TAR);
- 2.2.2.6 Verificar o efeito *in vitro* da mistura ácido oleico (C_{18:1})/ácido erúcico (C_{22:1}) em córtex cerebral de ratos jovens adicionados dos ácidos hexacosanóico (C_{26:0}) e tetracosanóico (C_{24:0}) sobre as defesas antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes, equipamentos e materiais

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram grau de pureza p.a e/ou cromatográfico.

3.1.1 Reagentes e outros materiais de consumo

- 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) - Merck
- 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) (ABAP) – Wako.
- Acetato de amônio – Merck.
- Ácido acético – Merck.
- Ácido clorídrico – Merck.
- Ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) – Merck.
- Ácido erúcico – Sigma.
- Ácido hexacosanóico – Sigma.
- Ácido oleico – Sigma.
- Ácido tetracosanóico – Sigma.
- Ácido tiobarbitúrico – Merck.
- Ácido tricloroacético – Merck.
- Albumina bovina – Sigma.

- Azida sódica – Sigma.
- Cloreto de cálcio – Merck.
- Cloreto de magnésio – Merck.
- Cloreto de potássio – Merck.
- Cloreto de sódio – Merck.
- Fosfato de sódio monobásico heptahidratado – Reagen.
- Fosfato de sódio dibásico monohidratado – Reagen.
- Fosfato de potássio – Reagen.
- Glicina – Merck.
- Glutaciona redutase – Sigma.
- Glutaciona reduzida – Sigma.
- Hidróxido de potássio – Merck.
- Hidróxido de sódio – Merck.
- Hidroperóxido de *tert*-butil - Sigma
- Luminol – Sigma.
- Metanol – Synth.
- NADPH – Sigma.
- Peróxido de hidrogênio – Nuclear.
- Pipetas Pasteur.
- Kit Ransod - Ransox.
- Reagente de Folin - Laborclin
- Sulfato de cobre – Merck.
- Sulfato de magnésio – Sigma.
- Sulfato de sódio – Sigma.
- Tartarato de sódio – Sigma.

- Trolox – Sigma.
- Tubos de eppendorf de 1,5 mL.
- Vials para cintilador.
- Vidraria: provetas, placas de petri, pipetas graduadas, béqueres, balão volumétricos.

3.1.2 Equipamentos

- Agitador magnético TE-081 (Tecnal).
- Agitador de tubos AP56 (Phoenix).
- Balanças Acculab modelo V-200, Kem modelo 430-21 e Satorius Basic (analítica).
- Banho-Maria modelo 1052 (Biomatic).
- Centrífuga refrigerada Sorvall RC 5B plus.
- Centrífuga Eppendorf 5402.
- Cintilador Wallac 1409 e Tricarb 2100.
- Cromatógrafo 3400 CX Star (Varian)
- Espectrofotômetro com controle de temperatura (Hitachi U-2001)
- Freezer -20°C e -80°C
- Geladeira (Brastemp)
- Homogeneizador elétrico Potter S (B. Braun Biotech International)
- Máquina de fazer gelo triturado (Everest)
- pHmetro TEC-2 (Tecnal).

3.2 Amostras

3.2.1 Pacientes e controles

Para a avaliação de diferentes parâmetros de estresse oxidativo em pacientes X-ALD, foram utilizados plasma, eritrócitos e fibroblastos de 19 pacientes X-ALD sintomáticos sem nenhum tratamento (13 casos de cALD e 6 de AMN) com idade entre 5 e 38 anos.

Para o estudo do efeito do tratamento da mistura gliceroltrioleato/gliceroltrierucato em pacientes X-ALD sobre o estresse oxidativo, foram utilizados plasma e eritrócitos de 6 pacientes X-ALD (3 casos de cALD e 3 da forma assintomática) com idade entre 6 e 11 anos. A coleta foi realizada antes e 30 dias após o início do tratamento com óleo de Lorenzo.

O diagnóstico de X-ALD nos pacientes portadores desta doença foi realizado no Laboratório de Análise de Metabólitos do Serviço de Genética Médica (SGM)/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) através da detecção de níveis aumentados de VLCFA nos plasmas analisados por cromatografia gasosa (CG). Estes pacientes seguiram o protocolo de tratamento para X-ALD estabelecido pelo corpo médico do SGM/HCPA. O período de tempo entre a coleta das amostras e a análise foi sempre inferior a duas semanas.

Os sintomas clínicos dos pacientes cALD incluíam leucodistrofia, dificuldade de aprendizado, convulsões e hiperatividade e dos pacientes AMN incluíam

leucodistrofia, fraqueza de membros, paraparesia, distúrbios esfinterianos e de comportamento.

Com a finalidade de verificar o efeito *in vitro* da mistura ácido oleico(C_{18:1})/ácido erúcico(C_{22:1}) sobre diferentes parâmetros de estresse oxidativo em tecidos adicionados dos ácidos hexacosanóico(C_{26:0}) e ácido tetracosanóico(C_{24:0}), foram utilizados plasma e eritrócitos humanos.

Plasma, eritrócitos e fibroblastos controles foram obtidos de indivíduos investigados por suspeita de erros inatos do metabolismo e cujos resultados foram normais e com idade semelhante a dos pacientes com X-ALD.

3.2.2 Animais

Com a finalidade de verificar o efeito *in vitro* da mistura ácido oleico(C_{18:1})/ácido erúcico(C_{22:1}) sobre diferentes parâmetros de estresse oxidativo em tecidos adicionados dos ácidos hexacosanóico(C_{26:0}) e ácido tetracosanóico(C_{24:0}), foram utilizados Córtex cerebral de ratos Wistar.

Foram utilizados Ratos Wistar de 30 dias de ambos os sexos, do Biotério do Departamento de Bioquímica do ICBS, UFRGS. Os animais tiveram livre acesso à água e à ração comercial (Supra ou Purina, São Leopoldo, RS). Os ratos foram mantidos a uma temperatura constante (20 +1°C) e em ciclo claro/escuro de \pm 12 horas.

3.2.3 Preparação dos tecidos

Plasmas e eritrócitos foram preparados a partir de sangue total heparinizado obtidos de indivíduos normais (controle) e de pacientes X-ALD por punção venosa. O sangue total foi centrifugado a 3000 rpm, e o plasma foi imediatamente removido por aspiração e congelado a -80°C até as análises.

Os eritrócitos foram lavados três vezes com solução salina (cloreto de sódio 0,153 mol/L). O lisado foi preparado pela adição de 100 μL de eritrócitos lavados em 1 mL de água destilada e congelados a -80°C até o momento das determinações. Para a determinação das atividades enzimáticas antioxidantes, os eritrócitos foram congelados e descongelados três vezes e centrifugados a 9200 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram diluídos a aproximadamente 0,5 mg/mL de proteína.

Após feita a biópsia de pele, o material foi colocada em um frasco de cultura de células de polietileno estéril tipo Falcon T25. A manipulação deve ser feita em capela de fluxo laminar, utilizando reagentes e materiais estéreis. Foram feitas as culturas primária e secundária em meio de cultura HAM-F10 suplementado com 20% de soro bovino fetal. Após aproximadamente 4 semanas, quando o crescimento celular foi atingido, os fibroblastos cultivados foram recolhidos e mantidos congelados em nitrogênio líquido até a determinação das atividades enzimáticas que foram realizadas em menos de 2 semanas (Coelho e Giugliani, 2000). Para a determinação de atividades enzimáticas antioxidantes, os extratos de fibroblastos foram ressuspensos com tampão fosfato de sódio 20mM contendo KCl 140mM e fluoreto de fenilmetasulfonil (PMSF) 0,1 M, pH 7,4, o *pellet* foi separado e o tampão foi adicionado em um volume dez vezes maior. As células foram congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas em água a

37 °C. Esse processo foi repetido duas vezes. A suspensão foi centrifugada a 3000 rpm por 10min e o sobrenadante foi usado para os testes.

Ratos Wistar de 30 dias de idade foram decapitados por guilhotina sem anestesia. A caixa craniana foi aberta, seu conteúdo retirado e mantido em uma placa de Petri invertida sobre gelo. O cerebelo, o bulbo olfatório e o tronco cerebral foram desprezados. O córtex foi então separado, pesado e homogeneizado em tampão fosfato de potássio 10mM pH 7,4 numa proporção de 1:10. Após homogeneização, foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos a 4°C. As amostras utilizadas para as medidas de quimiluminescência, de TAR e de enzimas antioxidantes foram utilizadas imediatamente após o preparo. As amostras preparadas para a medida de TBA-RS foram congeladas em freezer -80°C e descongeladas para o uso.

3.3 Complexação dos ácidos hexacosanóico (C_{26:0}) e tetracosanóico (C_{24:0}) com albumina

Como os ácidos hexacosanóico (C_{26:0}) e tetracosanóico (C_{24:0}) não são solúveis em água, utilizou-se a complexação com albumina no intuito de poder estudar os parâmetros de estresse oxidativo em diferentes tecido *in vitro* conforme descrito por Bioukar et al (1994).

O ácido hexacosanóico (38,1 µmol) foi misturado a 15 mL de água, onde foi adicionado 300 µL de KOH 2,2 mol/L. Essa mistura foi aquecida a 45-50°C e

mantida nesta temperatura por 6 horas e depois resfriada a 37°C. A albumina bovina sérica (8,5 µmol) foi adicionada a 40mL de água em outro frasco e aquecida a 37°C.

O sal, contendo C_{26:0}, foi, então, complexado pela adição de albumina bovina sérica até atingir uma solução de 4,5 moles de ácidos graxos por mole de albumina. Esta razão confere estabilidade ao complexo.

O mesmo processo foi realizado com o ácido tetracosanoico (381 µmol).

3.4 Preparação de soluções de ácido oleico (C_{18:1}) e de ácido erúcido (C_{22:1})

Soluções concentradas de ácido oleico (C_{18:1}) e de ácido erúcido (C_{22:1}) foram preparadas pela dissolução desses ácidos graxos em metanol, de modo que a concentração final do metanol no meio de incubação fosse menor que 3% (v/v), pois desta forma se impediria a interferência do metanol nos testes e nas características dos tecidos. As concentrações dos ácidos oleico (C_{18:1}) e erúcido (C_{22:1}) foram estimadas, considerando os níveis plasmáticos (em média de 3302µmol/L para C_{18:1} e de 103 µmol/L para C_{22:1}) de pacientes submetidos a um tratamento com restrição de gorduras saturadas na dieta e com o uso de óleo de Lorenzo em quantidades específicas para cada paciente de acordo com o peso corporal - 1,2mL/Kg/dia (van Geel *et al.*, 1997; Moser *et al.*, 1992).

3.5 Experimentos *in vitro*

Para mimetizar os pacientes X-ALD tratados com óleo de Lorenzo, diferentes tecidos humanos e animais, além de serem incubados com os VLCFA (ácidos hexacosanóico(C_{26:0}) e tetracosanóico(C_{24:0})), foram incubados com uma mistura de ácido oleico (C_{18:1})/ácido erúico (C_{22:1}). A um determinado volume de plasma e eritrócitos humanos e homogeneizado de córtex cerebral de ratos, foram adicionados os ácidos C_{26:0} e C_{24:0} complexados com albumina. Os níveis em plasma adicionados de C_{26:0} e C_{24:0} complexados com albumina medidos por CG foram 2,6 µM/L e 98 µM/L, respectivamente. Para avaliar o efeito *in vitro* da mistura ácido oleico (C_{18:1})/ácido erúico (C_{22:1}) sobre diferentes parâmetros de estresse oxidativo, esses tecidos foram incubados por 1 hora a 37°C com C_{18:1}/C_{22:1}. Estas amostras foram comparadas com amostras controle em cujo meio não foi adicionado nenhum ácido.

3.6 Determinação dos VLCFA

Os VLCFA foram dosados no plasma de pacientes para diagnóstico de X-ALD, utilizando o método de cromatografia gasosa capilar (Moser e Moser, 1991). A técnica de dosagem de VLCFA utiliza uma quantidade pequena da amostra (plasma) adicionada do padrão interno (ácido graxo heptacosanóico - C_{27:0}) para medidas do C_{22:0}, C_{24:0} e C_{26:0}. Nesse primeiro momento faz-se a extração do plasma com uma mistura 1:1 de clorofórmio:metanol seguida de agitação e

centrifugação. Removem-se as proteínas precipitadas e ao sobrenadante adiciona-se 2,5 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água bidestilada. Agita-se por meio de um vórtex e novamente leva-se à centrífuga. A camada superior é desprezada a fim de remover os lipídeos polares. Seca-se a fase inferior com nitrogênio (N₂), redissolve-se com 0.5 mL de clorofórmio:metanol 2:1 (v:v) e seca-se novamente com nitrogênio (N₂). A seguir, a cada extrato de lipídeo total seco adiciona-se 0,6 mL de ácido clorídrico (HCl) metanólico 1 N (400 µL de metanol com 200 µl de metanol/ácido clorídrico 3 N). Essa mistura fica 16 horas a 75°C para que ocorra a metilação dos ácidos graxos. Após este tempo, deixa-se resfriar a temperatura ambiente, seca-se com nitrogênio, lava-se com a mistura 2:1 de clorofórmio : metanol e seca-se novamente. O passo seguinte é a purificação dos ésteres metílicos através da cromatografia de camada delgada. A amostra é solubilizada e aplicada em uma placa de sílica gel pré-lavada. Depois da aplicação, a placa é posta em uma cuba contendo a mistura de solventes (tolueno:dietiléter, 97:3). Após a migração, a placa é revelada com iodo e os pontos correspondentes aos ésteres metílicos dos ácidos graxos são extraídos por raspagem. Essa raspagem é submetida a 3 extrações com hexano, sendo, então, a fase superior orgânica seca com nitrogênio. O resíduo é solubilizado com hexano para, finalmente, ser injetado no cromatógrafo a gás. Este é equipado com um detector de ionização de chama, com uma coluna capilar de sílica tipo HP-5 (0.20 mm de diâmetro interno; 0.33 µm de filme; 25 m de comprimento), sendo o hélio o gás de arraste utilizado. As áreas dos picos cromatográficos são utilizados para fins de quantificação pelo método da padronização interna.

3.7 Determinação da quimiluminescência

A medida da quimiluminescência nos diferentes tecidos foi realizada segundo a metodologia descrita por Gonzalez-Flecha e colaboradores (1991). Nos frascos de cintilação, foram adicionados 3,5 mL de tampão fosfato 20 mM pH 7,4 contendo cloreto de potássio 140 mM e colocados no cintilador líquido beta para medida da quimiluminescência basal. Após a medida basal, 0,5 mL de amostra foram adicionados, sendo a quimiluminescência medida durante 10 min. Todo o procedimento foi realizado à temperatura ambiente, em sala escura. A contagem basal foi descontada do valor total, e os resultados foram expressos em contagens por minuto (CPM) por mg de proteína. Os frascos utilizados para esta técnica foram lavados separadamente de outros materiais do laboratório, com solução detergente (extran 20%), exaustivamente enxaguados com água destilada, fervidos por 10 min e mantidos no escuro 12 horas antes do experimento.

3.8 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

A determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) foi baseada no método utilizado por Esterbauer e Chessemann (1990).

Em tubos de ensaio, foram pipetados 150 μ L de amostra e 300 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 10% e centrifugados em uma centrífuga clínica a 3000 rpm por 10 minutos. Trezentos μ L do sobrenadante foram transferidos a outro tubo e incubados com 300 μ L de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% contendo 7,1% de sulfato

de sódio. Os tubos foram colocados em banho fervente por 25 minutos e, após retirados, foram resfriados à temperatura ambiente por 5 minutos. A coloração rosa resultante das TBA-RS foi medida em um espectrofotômetro (Hitachi U-2100) a 535 nm. A curva de calibração foi desenvolvida usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano e cada ponto da curva foi submetida ao mesmo tratamento das amostras. A quantidade de TBA-RS foi calculada em nmol por mg de proteína e os resultados foram expressos em nmóis de TBA-RS /mg de proteína.

3.9 Potencial Antioxidante Total (TRAP)

A medida da capacidade antioxidante total (TRAP) do tecido foi realizada segundo o método de Lissi *et al.* (1995). Esta determinação é dada pela medida da intensidade de quimiluminescência do luminol induzida pelo 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) (ABAP) a temperatura ambiente. Para a preparação das soluções de uso (ABAP 10mM, luminol 4 mM e Trolox 80 μ M) foi utilizado tampão glicina 0,1 M, pH 8,6. A solução de ABAP foi utilizada como formadora de radicais livres, a de luminol como amplificadora do sinal de quimiluminescência e a de Trolox (vitamina E hidrossolúvel) como padrão antioxidante. Os tubos utilizados para o ensaio permaneciam vazios no escuro por pelo menos 30 minutos. Para a contagem basal (120 segundos), foram adicionados 4 mL de solução de ABAP 10 mM ao vial. A seguir, 10 μ L da solução de luminol foram acrescentados e a quimiluminescência foi lida por mais 120 segundos. Essa medida foi considerada o valor inicial. Foram colocados, então, 10 μ L da solução de Trolox 300 μ M ou 10 μ L de amostra, sendo, então, medida a quimiluminescência até atingir os níveis iniciais. A adição de Trolox ou amostra no

meio de incubação reduz a quimiluminescência. O tempo necessário para que a intensidade da quimiluminescência retorne ao valor inicial foi considerado o tempo de indução (TI). O tempo indução é diretamente proporcional à capacidade antioxidante do tecido, sendo o TI de cada amostra comparado com o tempo de indução do Trolox. Os resultados foram expressos em nmol de Trolox/mg de proteína.

3.10 Reatividade Antioxidante Total (TAR)

TAR, que representa a qualidade dos antioxidantes do tecido, foi determinada pela medida da intensidade da quimiluminescência do luminol induzida por ABAP conforme o método de Lissi *et al.*, 1992. Aos frascos de cintilação, foram adicionados 4 mL de ABAP 2 mM (em 0,1 M de tampão glicina pH 8,6) e 15 µL de luminol 4 mM. Os vials foram colocados no cintilador líquido beta para medida da quimiluminescência basal. Dez µL de Trolox 10 µM ou de amostra preparadas no mesmo tampão Glicina foram então adicionadas a cada vial, e a quimiluminescência foi medida durante 60 segundos. A adição do trolox ou da amostra diminui a quimiluminescência. A rápida redução da intensidade do luminol é considerada como a medida de TAR. Os resultados foram expressos como nmol de Trolox/mg de proteína.

3.11 Determinação da atividade das enzimas: catalase, glutaciona peroxidase e superóxido dismutase

3.11.1 Determinação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da catalase foi determinada de acordo com o método descrito por Aebi (1983), baseado na decomposição da H_2O_2 , acompanhada a 240 nm, à temperatura ambiente. A amostra foi colocada em tampão fosfato 10 mM pH 7,0 e a absorbância acompanhada a 240 nm antes e após a adição de H_2O_2 20 mM. Os resultados foram expressos em unidades de atividade para a catalase, (sendo uma unidade definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 μmol de H_2O_2 /min/mg de proteína), e calculados utilizando-se o coeficiente de absorção molar para a H_2O_2 (40 $\text{m}^{-1} \text{cm}^{-1}$ a 240 nm).

3.11.2 Determinação da atividade da glutaciona peroxidase (GPx)

GPx foi determinada pelo método descrito por Wendel (1981), utilizando hidroperóxido de *tert*-butil como substrato. A atividade foi determinada monitorando a oxidação do NADPH a 340 nm a 37° C em um meio contendo 2mM de glutaciona reduzida, 0,15 U/mL de glutaciona redutase, 0,4 mM de azida sódica, 0,5 mM de hidroperóxido de *tert*-butil e 0,1 mM de NADPH. A atividade da glutaciona peroxidase foi calculada pela velocidade da oxidação de NADPH. Assim uma unidade de GPx é definida como 1 μmol de NADPH consumido por minuto. Os resultados foram expressos como Unidade/ mg de proteína.

3.11.3 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada usando kit RANSOD (Ransox, Antrim, Reino Unido). O método utilizado baseia-se na formação de vermelho de formazan a partir da reação do cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolium (I.N.T) e um radical superóxido (produzido no meio de incubação a partir do sistema de reação Xantina-Xantina oxidase) que é determinada a 505 nm à temperatura ambiente. A inibição do cromógeno produzido é proporcional a atividade da SOD presente na amostra. Uma unidade de atividade de SOD é definida como a quantidade necessária para reduzir a velocidade da reação em 50% e os resultados foram expressos como U de SOD/ mg de proteína.

3.12 Determinação de proteínas

O conteúdo protéico em todas as amostras empregadas foi determinado pelo método de Lowry *et al* (1951), usando albumina bovina sérica como padrão.

3.13 Análise estatística

Os dados são expressos como média \pm desvio padrão e foram analisados através da análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan, quando o F foi significativo. Em alguns experimentos, o teste *t* de “Student” não pareado foi utilizado. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Toda a análise

estatística foi feita através do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) em um computador PC compatível.

3.14 Considerações éticas

Todos os pacientes convidados a participar do trabalho assinaram um termo de consentimento pós-informação (Anexo 1).

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo em pacientes com adrenoleucodistrofia ligada ao X tratados e não tratados com OL.

4.1.1 Parâmetros de lipoperoxidação (quimiluminescência e espécies reativas do ácido tiobarbitúrico - TBARS).

Nesses experimentos, quimiluminescência e TBA-RS foram determinados em plasma de pacientes X-ALD. A tabela 8 ilustra que a quimiluminescência mostrou-se significativamente aumentada em 264 % (de 104 para 272 cpm.mg⁻¹de proteína) [t(4)= 8.053, p < 0.05] nos plasmas de pacientes com fenótipo cALD, quando comparada aos níveis dos controles. Além disso, a medida de TBA-RS também se mostrou significativamente aumentada em 215 % (de 0.15 para 0.32 nmol.mg⁻¹de proteína) [t(12)=3.913, p < 0.01] no plasma desses pacientes (5 cALD e 2 AMN) (Tabela 8).

Tabela 8 Parâmetros de lipoperoxidação (quimiluminescência e espécies reativas do ácido tiobarbitúrico - TBARS) em plasma de pacientes X-ALD.

Ensaio	Controle		Pacientes X-ALD		Fenótipo
	Média \pm DP	Faixa	Média \pm DP	Faixa	
Quimiluminescência (n=3)	104 \pm 56.1	47.5-160	272* \pm 69.9	202-342	cALD
TBA-RS (n=7)	0.15 \pm 0.08	0.07-0.23	0.32** \pm 0.08	0.24-0.40	5 cALD 2 AMN

A quimiluminescência foi calculada como cpm por mg de proteína. Os valores representam a média \pm desvio padrão (média \pm DP) (n=3 por grupo). A diferença entre as médias foi calculada por teste *t* de Student não pareado (* $p < 0.05$, comparado aos controles).

A medida de TBA-RS foi calculada como nmol TBA-RS por mg de proteína. Os valores representam a média \pm desvio padrão (média \pm DP) (n=7 por grupo). A diferença entre as médias foi calculada por teste *t* de Student não pareado (** $p < 0.01$, comparado aos controles).

4.1.2 Defesas antioxidantes não-enzimáticas (medida do potencial antioxidante total - TRAP e medida da reatividade antioxidante total -TAR).

A determinação de TRAP, que é o indicativo das defesas não-enzimáticas de um tecido, não mostrou alterações significativas em plasma de pacientes com fenótipo cALD [$t(6) = 0.181$, $p > 0.05$] (Tabela 9). No entanto, a determinação de TAR, que é medida da capacidade de um tecido reagir frente a radicais livres, estava marcadamente reduzida nos pacientes (43%) [$t(14) = 2.515$; $p < 0.01$] (90.3 a 49.7 nmol de trolox.mg⁻¹de proteína). (Tabela 9).

Tabela 9 Potencial Antioxidante Total (TRAP) e Reatividade Antioxidante Total (TAR) em plasma de pacientes X-ALD.

Ensaio	Controle		Pacientes X-ALD		Fenótipo
	Média \pm DP	Faixa	Média \pm DP	Faixa	
TRAP (n=4)	1053 \pm 379.48	674-1433	992 \pm 384	608-1376	cALD
TAR (n=8)	90.3 \pm 38.3	51.9-129	49.7** \pm 24.8	24.8-74.5	4 cALD 4 AMN

A medida foi calculada em nmol de trolox por mg de proteína. Os valores representam a média \pm desvio padrão (média \pm DP) (n=4 por grupo). A diferença entre as médias foi calculada por teste *t* de Student não pareado. Não houve diferença significativa em relação ao controle.

A medida de TAR foi calculada como nmol de trolox por mg de proteína. Os valores representam a média \pm desvio padrão (média \pm DP) (n=8 por grupo). A diferença entre as médias foi calculada por teste *t* de Student não pareado (** $p < 0.01$, comparado aos controles).

4.1.3 Defesas antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase).

A atividade das enzimas antioxidantes (CAT, GPx e SOD) foi determinada em eritrócitos e fibroblastos de pacientes X-ALD. Nas tabelas 10 e 11 pode-se verificar que as atividades das enzimas antioxidantes estavam alteradas em ambos os tecidos de pacientes cALD. Um moderado, mas significativo aumento (13%) da atividade de GPx [$t(6) = 4.599$, $p < 0.05$] foi detectado em eritrócitos (Tabela 10). Também pode ser visto que as atividades da catalase e da superóxido dismutase foram muito elevadas (aumento de 1887 % e de 262 %, respectivamente) nos fibroblastos de dois pacientes de fenótipo cALD, quando comparado aos controles (Tabela 11).

Tabela 10 Atividade das enzimas antioxidantes em eritrócitos de pacientes X-ALD.

Enzimas	Controle		Pacientes X-ALD		Fenótipo
	Média \pm DP	Faixa	Média \pm DP	Faixa	
CAT (n=4)	3.13 \pm 0.33	2.80 – 3.46	2.57 \pm 0.57	2.00–3.14	cALD
GPx (n=4)	0.83 \pm 0.12	0.71 – 0.95	0.94* \pm 0.12	0.82–1.06	cALD
SOD (n=4)	1.03 \pm 0.42	0.61 – 1.45	1.11 \pm 0.41	0.70-1.52	cALD

As atividades das enzimas antioxidantes foram expressas: CAT - pmol/mg de proteína; GPx - mU/mg de proteína; SOD - U/mg de proteína. Uma unidade foi definida como 1 μ mol de NADPH consumido por min para GPx e 50% da inibição do cromógeno produzido para SOD. Os valores representam a média \pm desvio padrão (média \pm DP) (n=4 por grupo). A diferença entre as médias foi calculada por teste *t* de Student não pareado (* $p < 0.05$, comparado aos controles). Para CAT e SOD não houve diferença significativa em relação ao controle.

Tabela 11 Atividade das enzimas antioxidantes em fibroblastos de pacientes X-ALD.

Enzimas	Controle		Pacientes X-ALD		Fenótipo
	Valores	Faixa	Valores	Faixa	
CAT (n=2)	0.053	0.05-0.11	1.45	1.45-1.73	cALD
	0.113		1.73		
SOD (n=2)	0.40	0.40-0.58	1.70	1.70-1.85	cALD
	0.58		1.85		

As atividades das enzimas antioxidantes foram expressas: CAT - pmol/mg de proteína; SOD - U/mg de proteína. Uma unidade foi definida como 50% da inibição do cromógeno produzido para SOD.

4.1.4 Efeito do tratamento gliceroltrioleato/gliceroltrierucato (óleo de Lorenzo) sobre a lipoperoxidação (espécies reativas do ácido tiobarbitúrico - TBARS).

A determinação de TBA-RS realizada no plasma de 5 pacientes X-ALD (3 cALD e 2 Assintomáticos), antes e após o tratamento com óleo de Lorenzo mostra que esse parâmetro está significativamente aumentado [$F(2,14)=11.272$, $p < 0.05$] nesses pacientes e que durante o tratamento com OL não houve mudanças significativas no TBA-RS quando comparado com os controles (Tabela 12 e a Figura 7).

Tabela 12 TBA-RS e TAR em plasma de pacientes X-ALDantes [OL(-)] e depois [OL(+)] do tratamento com óleo de Lorenzo.

Pacientes	TBARS			TAR		
	Controle	X-ALD		Controle	X-ALD	
		OL(-)	OL(+)		OL(-)	OL(+)
1	-	-	-	3.84	2.04	2.21
2	0.12	1.32	0.67	3.09	4.51	2.84
3	0.25	0.58	0.40	2.39	2.28	4.41
4	0.17	1.20	1.26	1.51	1.40	0.77
5	0.13	0.84	0.37	-	-	-
6	0.11	0.86	0.90	-	-	-

A medida de TBA-RS foi calculada como nmol TBA-RS por mg de proteína.

A medida de TAR foi calculada como nmol de trolox por mg de proteína.

Os pacientes 1, 2 e 3 apresentam o fenótipo clínico assintomático e os pacientes 4, 5 e 6 apresentam o fenótipo clínico cALD.

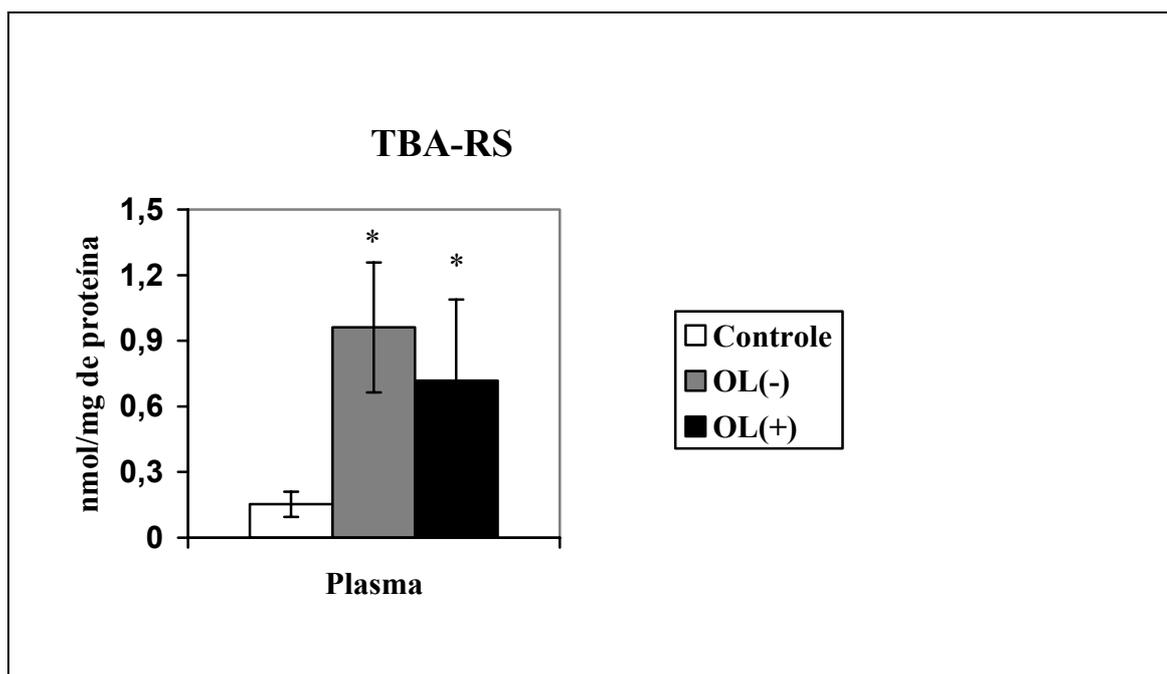


Figura 7 TBA-RS em plasma de pacientes X-ALD antes [OL(-)] e depois [OL(+)] do tratamento com óleo de Lorenzo e controles. A medida de TBA-RS foi calculada como nmol TBA-RS por mg de proteína. Os valores representam a média \pm desvio padrão (média \pm DP) (n=5 por grupo). A diferença entre as médias foi calculada pela ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan (* $p < 0.05$, comparado aos controles).

4.1.5 Efeito do tratamento gliceroltrioleato/gliceroltrierucato (óleo de Lorenzo) sobre as defesas antioxidantes não-enzimáticas (medida da reatividade antioxidante total - TAR).

A determinação de TAR, realizada em plasma de pacientes X-ALD (1 cALD e 3 assintomáticos) antes e após o tratamento com OL, não apresentou alterações significativas [F(2,11)= 0.018, $p > 0.05$] (Figura 8 e tabela 12).

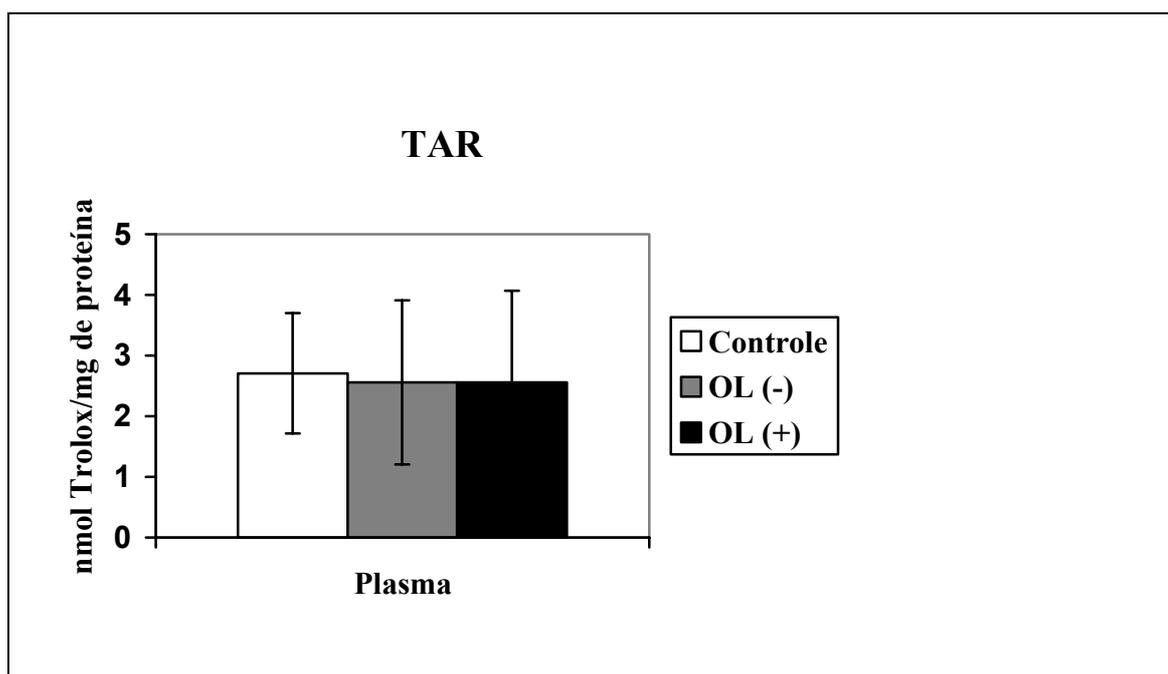


Figura 8 TAR em plasma de pacientes X-ALD antes [OL(-)] e depois [OL(+)] do tratamento com óleo de Lorenzo e controles. A medida de TAR foi calculada como nmol de trolox por mg de proteína. Os valores representam a média \pm desvio padrão (média \pm DP) (n=4 por grupo). A diferença entre as médias foi calculada pela ANOVA de uma via. Não houve diferença significativa em relação ao controle.

4.1.6 Efeito do tratamento gliceroltrioleato/gliceroltrierucato (óleo de Lorenzo) sobre as defesas antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase).

A medida da atividade das enzimas antioxidante CAT, GPx e SOD em eritrócitos de pacientes X-ALD (3 assintomáticos) antes e após do tratamento com LO foi realizada. A tabela 13 ilustra que as atividades dessas enzimas (CAT=[F(2,8)= 1,270, $p > 0.05$], GPx=[F(2,8)= 0,734, $p > 0.05$] e SOD= [F(2,8)= 3,271, $p > 0.05$]) não foram alterados antes, ou após o tratamento com OL.

Tabela 13 As atividades das enzimas antioxidantes em eritrócitos de pacientes X-ALD antes [OL(-)] e depois [OL(+)] do tratamento com óleo de Lorenzo.

Pacientes	CAT		SOD		GPX				
	Controle	X-ALD		Controle	X-ALD				
		OL(-)	OL(+)		OL(-)	OL(+)			
1	5.39	4.18	4.86	1.08	0.76	0.57	0.43	0.25	0.22
2	3.52	6.21	6.17	1.80	1.47	0.80	0.39	0.55	0.23
3	4.49	5.57	5.70	1.25	0.58	0.53	0.27	0.08	0.20
Média	4.46	5.32	5.58	1.38	0.94	0.63	0.36	0.29	0.21
± DP	± 0.93	± 1.04	± 0.66	± 0.38	± 0.47	± 0.14	± 0.84	± 2.42	± 0.17

As atividades das enzimas antioxidantes foram expressas como: CAT - pmol/mg de proteína; GPx - mU/mg de proteína; SOD - U/mg de proteína. Uma unidade foi definida como 1µmol de NADPH consumido por min para GPx e 50% da inibição do cromógeno produzido para SOD. Os valores representam a média ± desvio padrão (média ± DP) (n=3 por grupo). A diferença entre as médias foi calculada pela ANOVA de uma via. Não houve diferença significativa em relação ao controle.

4.2 Avaliação do efeito *in vitro* da mistura ácido oleico (C_{18:1})/ácido erúcido (C_{22:1}) sobre diferentes parâmetros de estresse oxidativo em plasma e eritrócitos humanos, bem como em córtex cerebral de ratos adicionados dos ácido hexacosanóico (C_{26:0}) e ácido tetracosanóico (C_{24:0}):

4.2.1 Efeito *in vitro* da mistura ácido oleico (C_{18:1})/ácido erúcido (C_{22:1}) em plasma humano adicionados dos ácidos hexacosanóico (C_{26:0}) e tetracosanóico (C_{24:0}) sobre parâmetros de lipoperoxidação (quimiluminescência e espécies reativas do ácido tiobarbitúrico - TBARS).

As medidas de quimiluminescência e de TBA-RS em plasma humano adicionado de C_{26:0}C_{24:0} foram significativamente aumentadas em relação ao controle [F(2,11)= 22,906, p<0,01] e [F(2,14)= 7,040, p < 0.05], respectivamente. Além disso, a mistura C_{18:1}/C_{22:1} não reverteu este efeito (Figuras 9 e 10).

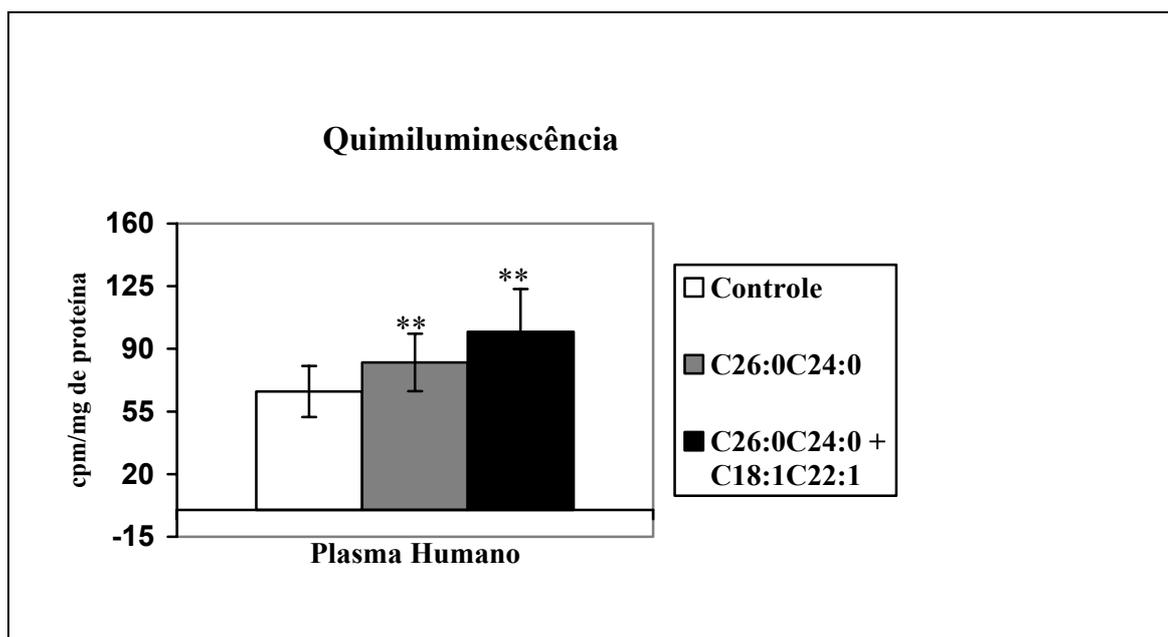


Figura 9 Efeito da mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ em plasma humano adicionados dos ácidos $C_{26:0}/C_{24:0}$ sobre a quimiluminescência. A quimiluminescência foi calculada como cpm por mg de proteína. Os valores representam a média \pm desvio padrão (média \pm DP) (n=4 por grupo). A diferença entre as médias foi calculada pela ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan (** p < 0.01, comparado aos controles).

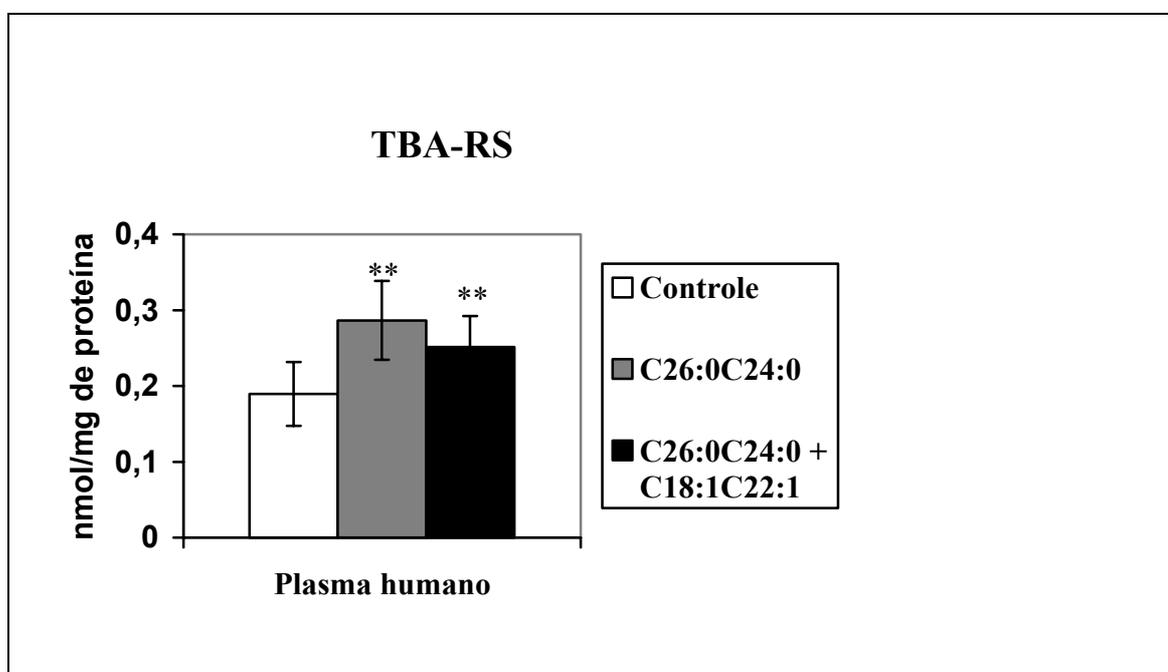


Figura 10 Efeito da mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ em plasma humano adicionados dos ácidos $C_{26:0}/C_{24:0}$ sobre TBA-RS. A medida de TBA-RS foi calculada como nmol TBA-RS por mg de proteína. Os valores representam a média \pm desvio padrão (média \pm DP) (n=6 por grupo). A diferença entre as médias foi calculada pela ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan (** p < 0.01, comparado aos controles).

4.2.2 Efeito *in vitro* da mistura ácido oleico (C_{18:1})/ácido erúcido (C_{22:1}) em plasma humano adicionados dos ácidos hexacosanóico (C_{26:0}) e tetracosanóico (C_{24:0}) sobre as defesas antioxidantes não-enzimáticas (medida da reatividade antioxidante total -TAR).

A medida da reatividade antioxidante total em plasma humano adicionados de C_{26:0}:C_{24:0} mostrou uma diminuição significativa quando comparados ao controle, porém a mistura dos ácidos oleico(C_{18:1})/erúcido(C_{22:1}) não reverteu esse efeito [F(2,11)= 8,507 p < 0.05] (Figura 11).

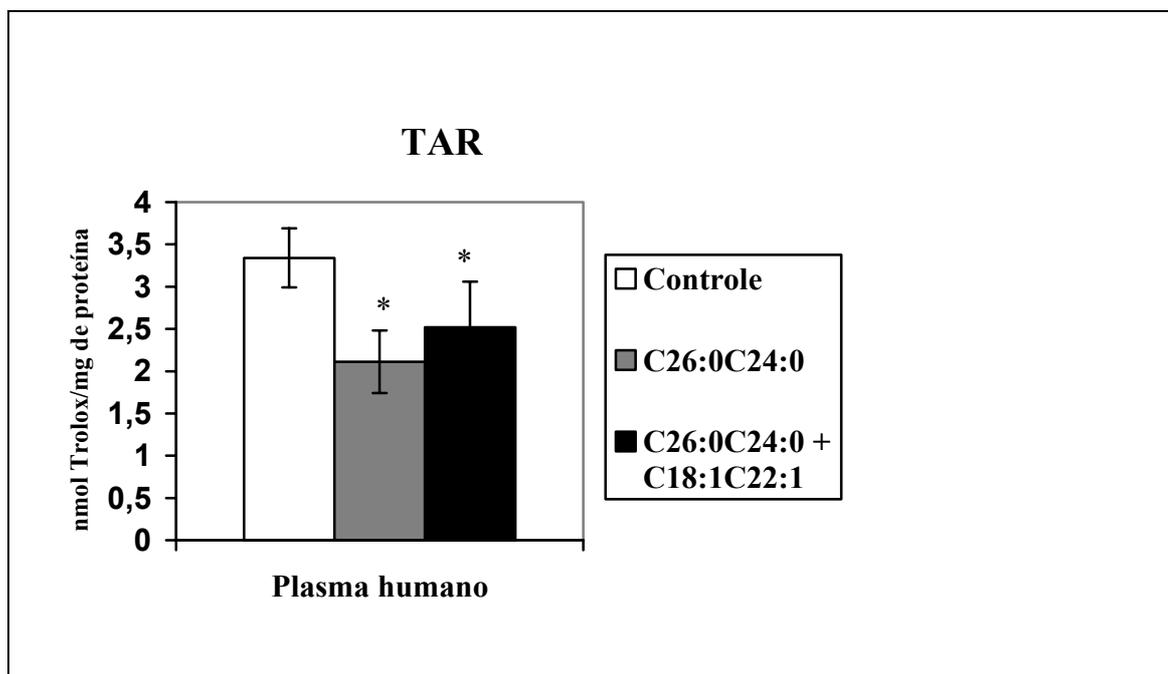


Figura 11 Efeito da mistura C_{18:1}/C_{22:1} em plasma humano adicionados dos ácidos C_{26:0}/C_{24:0} sobre TAR. A medida de TAR foi calculada como nmol de trolox por mg de proteína. Os valores representam a média \pm desvio padrão (média \pm DP) (n=4 por grupo). A diferença entre as médias foi calculada pela ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan (* p < 0.05, comparado aos controles).

4.2.3 Efeito *in vitro* da mistura ácido oleico (C_{18:1})/ácido erúico (C_{22:1}) em eritrócitos humanos adicionados dos ácidos hexacosanóico (C_{26:0}) e tetracosanóico (C_{24:0}) sobre as defesas antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase).

A medida da atividade das enzimas antioxidantes (CAT= [F(2,17)= 0,379, p > 0.05], GPx= [F(2,14)= 0,140, p > 0.05] e SOD= [F(2,20)= 0,267, p > 0.05]. em eritrócitos humanos adicionados de C_{26:0}C_{24:0} e incubados com a mistura C_{18:1}/C_{22:1} não foi significativamente diferente quando comparado ao grupo controle (Tabela 14).

Tabela 14 Efeito da mistura C_{18:1}/C_{22:1} em eritrócitos humanos adicionados dos ácidos C_{26:0}/C_{24:0} sobre atividade das enzimas antioxidantes

Enzimas Antioxidantes	Eritrócitos humanos		
	Controle	C _{26:0} C _{24:0}	
		C _{18:1} /C _{22:1} (-)	C _{18:1} /C _{22:1} (+)
CAT (n=6)	1.45 ± 0.16	1.45 ± 0.25	1.53 ± 0.12
SOD (n=7)	0.81 ± 0.14	0.93 ± 0.22	1.03 ± 0.19
GPx (n=6)	1.00 ± 0.19	1.11 ± 0.14	1.15 ± 0.13

As atividades das enzimas antioxidantes foram expressas: CAT - pmol/mg de proteína; GPx - mU/mg de proteína; SOD - U/mg de proteína. Uma unidade foi definida como 1µmol de NADPH consumido por min para GPx e 50% da inibição do cromógeno produzido para SOD. Os valores representam a média ± desvio padrão (média ± DP). A diferença entre as médias foi calculada pela ANOVA de uma via. Não houve diferença significativa em relação ao controle.

4.2.4 Efeito *in vitro* da mistura ácido oleico ($C_{18:1}$)/ácido erúcico ($C_{22:1}$) em córtex cerebral de rato jovens adicionados dos ácidos hexacosanóico ($C_{26:0}$) e tetracosanóico ($C_{24:0}$) sobre parâmetros de lipoperoxidação (quimiluminescência e espécies reativas do ácido tiobarbitúrico - TBARS).

As figuras 12 e 13 mostraram o efeito *in vitro* da mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ em córtex cerebral de rato jovens adicionados de $C_{26:0}/C_{24:0}$ sobre a determinação da quimiluminescência e de TBA-RS. Verifica-se que a adição dos VLCFA no tecido provocou um aumento significativo da quimiluminescência [$F(2,14)= 7,893$, $p < 0.05$] (figura 12) e dos níveis de TBA-RS [$F(2,14)= 6,670$, $p < 0.05$] (figura 13). Além disso, a mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ não alterou esse efeito.

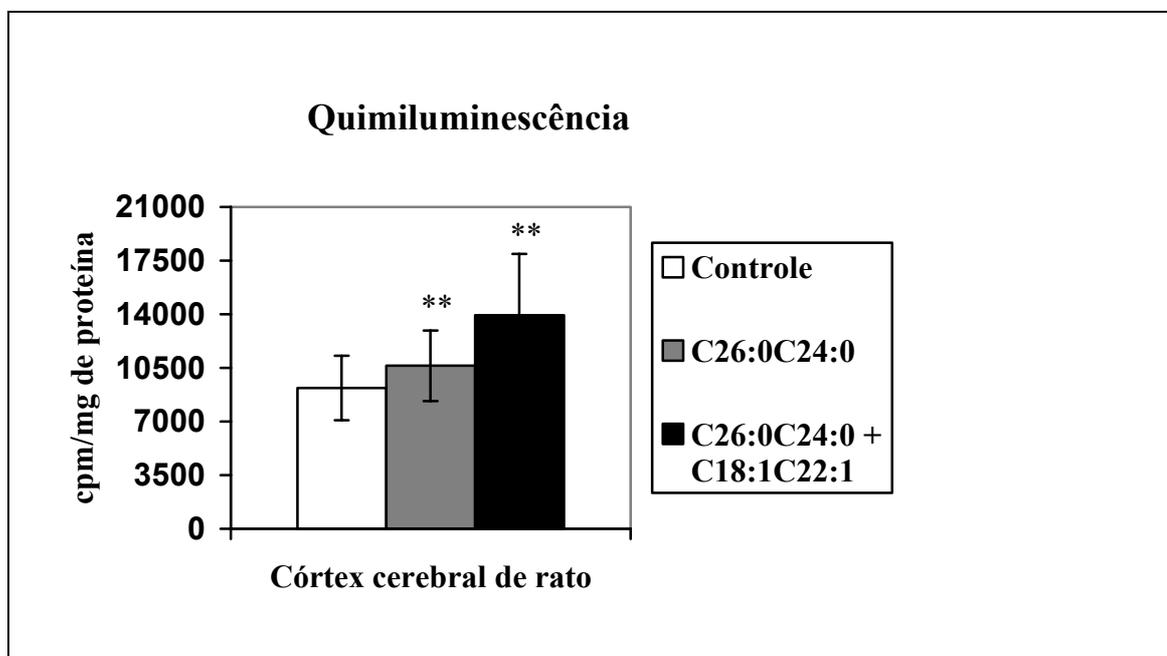


Figura 12 Efeito da mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ em córtex cerebral de rato adicionados dos ácidos $C_{26:0}/C_{24:0}$ sobre a quimiluminescência. A quimiluminescência foi calculada como cpm por mg de proteína. Os valores representam a média \pm desvio padrão (média \pm DP) ($n=5$ por grupo). A diferença entre as médias foi calculada pela ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan (** $p < 0.01$, comparado aos controles).

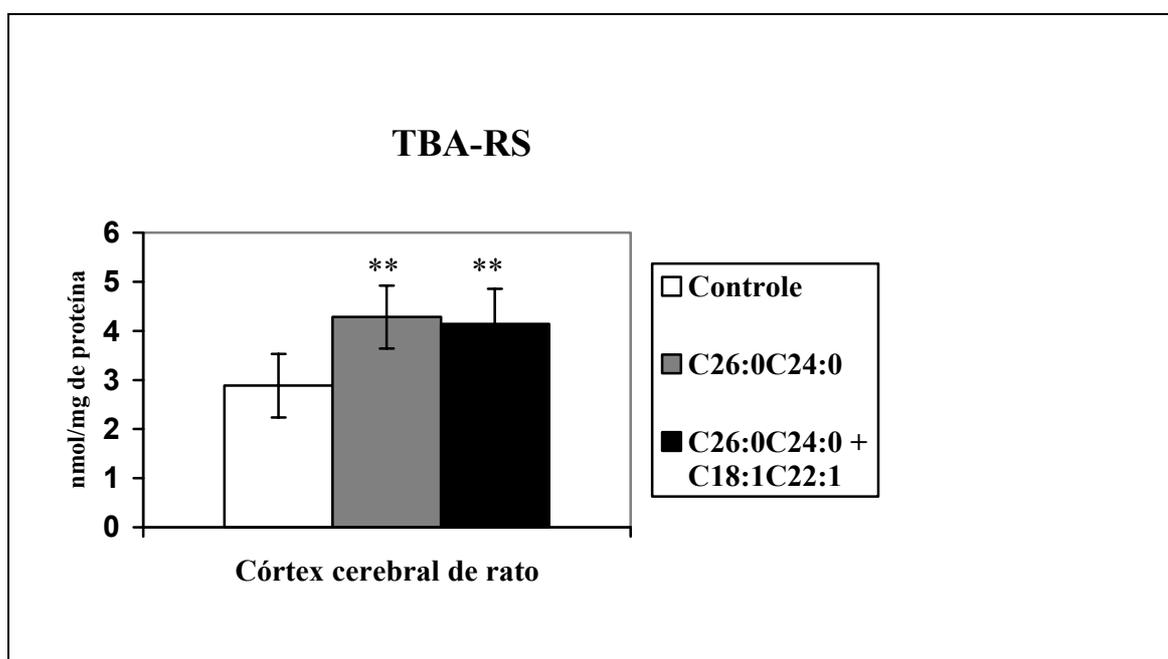


Figura 13 Efeito da mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ em córtex cerebral de rato adicionados dos ácidos $C_{26:0}/C_{24:0}$ sobre TBA-RS. A medida de TBA-RS foi calculada como nmol TBA-RS por mg de proteína. Os valores representam a média \pm desvio padrão (média \pm DP) (n=6 por grupo). A diferença entre as médias foi calculada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan (** $p < 0.01$, comparado aos controles).

4.2.5 Efeito *in vitro* da mistura ácido oleico (C_{18:1})/ácido erúico (C_{22:1}) em córtex cerebral de rato jovens adicionados dos ácidos hexacosanóico (C_{26:0}) e tetracosanóico (C_{24:0}) sobre as defesas antioxidantes não-enzimáticas (medida da reatividade antioxidante total -TAR):

A figura 14 ilustra a determinação do efeito *in vitro* da mistura C_{18:1}/C_{22:1} sobre a medida de TAR em córtex cerebral de rato jovens adicionados de C_{26:0}C_{24:0}. Verifica-se que a adição dos VLCFA e da mistura não alteraram significativamente a medida da reatividade antioxidante total neste tecido [F(2,11)= 0,076, p > 0.05] (Figura 14).

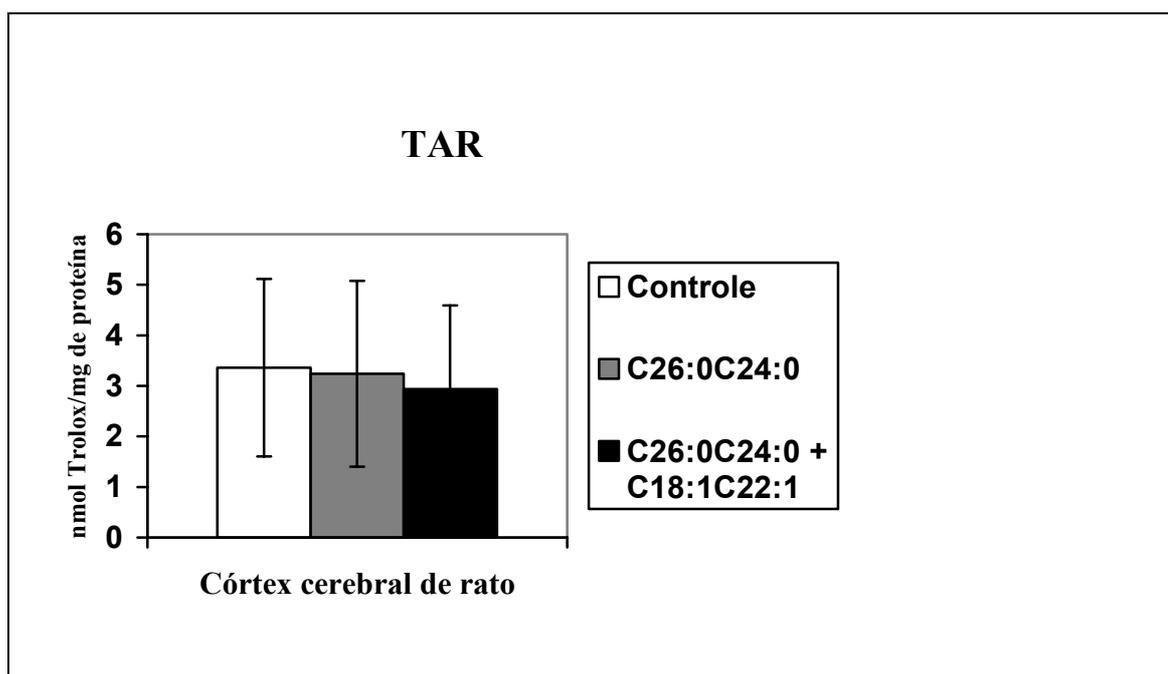


Figura 14 Efeito da mistura C_{18:1}/C_{22:1} em córtex cerebral de rato adicionados dos ácidos C_{26:0}/C_{24:0} sobre TAR. A medida de TAR foi calculada como nmol de trolox por mg de proteína. Os valores representam a média \pm desvio padrão (média \pm DP) (n=5 por grupo). A diferença entre as médias foi calculada pela ANOVA de uma via. Não houve diferença significativa em relação ao controle.

4.2.6 Efeito *in vitro* da mistura ácido oleico (C_{18:1})/ácido erúico (C_{22:1}) em córtex cerebral de rato jovens adicionados dos ácidos hexacosanóico(C_{26:0}) e tetracosanóico (C_{24:0}) sobre as defesas antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase).

A Tabela 15 mostra a medida da atividade das enzimas antioxidantes apresenta em córtex cerebral de rato jovens adicionados de C_{26:0}C_{24:0}, onde pode-se verificar que houve um aumento significativo da SOD [F(2,14)= 10,637, p < 0.05], e que o tratamento com a mistura C_{18:1}/C_{22:1} não modificou este efeito. As outras enzimas (CAT= [F(2,17)= 0,073, p > 0.05] e GPx= [F(2,14)= 0,140, p > 0.05]) não apresentaram alterações significativas.

Tabela 15 Efeito da mistura C_{18:1}/C_{22:1} em córtex cerebral de rato adicionados dos ácidos C_{26:0}/C_{24:0} sobre atividade das enzimas antioxidantes

Enzimas Antioxidantes	Córtex cerebral de rato		
	Controle	C _{26:0} C _{24:0}	
		C _{18:1} / C _{22:1} (-)	C _{18:1} / C _{22:1} (+)
CAT (n=6)	2.29 ± 0.93	2.20 ± 0.17	2.33 ± 0.39
SOD (n=5)	5.55 ± 2.41	14.37 ± 3.25*	13.47 ± 4.10 [#]
GPx (n=5)	2.54 ± 0.31	2.43 ± 0.35	2.48 ± 0.30

As atividades das enzimas antioxidantes foram expressas: CAT - pmol/mg de proteína; GPx - mU/mg de proteína; SOD - U/mg de proteína. Uma unidade foi definida como 1µmol de NADPH consumido por min para GPx e 50% da inibição do cromógeno produzido para SOD. Os valores representam a média ± desvio padrão (média ± DP). A diferença entre as médias foi calculada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan(* p < 0.05, comparado aos controles). Para CAT e SOD, não houve diferença significativa em relação ao controle.

5. DISCUSSÃO

A adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (X-ALD) é o tipo mais freqüente de doença peroxissomal. Caracteriza-se pela deficiência na β -oxidação dos ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA), resultando no acúmulo dos ácidos hexacosanóico (C_{26:0}) e tetracosanóico (C_{24:0}) em fluidos biológicos e em diversos tecidos. É uma doença primariamente neurodegenerativa que se caracteriza por uma progressiva desmielinização e por insuficiência adrenal. A freqüência relativa em recém nascidos do sexo masculino está estimada em 1:25.000 (Moser *et al.*, 2001).

O defeito bioquímico desta doença presumivelmente envolve um distúrbio no transporte da VLCFA-CoA sintetase na membrana peroxissomal. Na X-ALD, o defeito primário envolve um único gene no cromossomo X que foi localizado em Xq28. Este gene possui 21 Kb e 10 éxons codificando a proteína ALDP (do inglês “*adrenoleukodystrophy protein*”) de 745 aminoácidos que pertence à família dos transportadores ABC. A ALDP é uma proteína de membrana que se liga ao ATP e parece estar envolvida no transporte da VLCFA-CoA sintetase para o interior dos peroxissomas (Moser *et al.*, 2001; Dubois-Dalcq *et al.*, 1999).

A X-ALD é caracterizada por uma ampla variabilidade fenotípica, a qual poderia ser causada por genes modificadores autossômicos ou por fatores não genéticos. Existe uma notável diversidade dos sintomas neurológicos e endocrinológicos em pacientes com X-ALD, com uma correlação pouco clara entre mutações do gene ALD e os diferentes fenótipos neurológicos. Os fenótipos clínicos da X-ALD são: forma cerebral infantil, forma cerebral juvenil, forma cerebral adulta, adrenomieloneuropatia (AMN), insuficiência adrenal isolada sem sintomas neurológicos (AI), forma olivo-ponto-cerebelar e indivíduos neurologicamente assintomáticos. Estes vários fenótipos podem ocorrer dentro de uma mesma família. Desde o primeiro caso relatado de X-ALD em 1910 até hoje, muito pouco é conhecido sobre o mecanismo envolvido no dano neurológico desta enfermidade (Moser *et al.*, 2001).

Neste contexto, o cérebro possui níveis relativamente baixos de enzimas antioxidantes e um conteúdo lipídico relativamente alto com grandes quantidades de ácidos graxos insaturados e catecolaminas, os quais são substratos suscetíveis ao ataque de espécies reativas (Halliwell e Gutteridge, 2001). Além disso, o envolvimento de radicais livres e do estresse oxidativo na fisiopatologia de várias doenças que comprometem o SNC vem sendo cada vez mais comprovadas. Neste aspecto, um dos pontos abordados e discutidos são as variáveis patológicas que fazem com que os neurônios não afetados diretamente pelo dano primário nestas doenças, sejam então afetados por uma cascata de eventos provocada pelo insulto primário. Um dos primeiros fenômenos observados nesta cascata é o processo de lipoperoxidação induzida por radicais livres (Carney *et al.*, 1992).

Portanto, no presente estudo, investigamos vários parâmetros de estresse oxidativo em plasma, em eritrócitos e fibroblastos cultivados de pacientes com X-ALD. Foi verificado um aumento significativo de quimiluminescência e TBA-RS no plasma de pacientes sintomáticos. Considerando que a luz emitida no ensaio de quimiluminescência usualmente aumenta a partir de lipídios peroxidados devido a um aumento na produção de espécies ativas de oxigênio ou de nitrogênio e que TBA-RS reflete a quantidade de malondialdeído formado, um produto final da peroxidação de ácidos graxos da membrana (Halliwell e Gutteridge, 2001), estes achados indicam que a lipoperoxidação está aumentada no plasma de pacientes X-ALD, que provavelmente ocorre devido a um aumento de geração de radicais livres.

Foi também demonstrado que a medida de TRAP não foi alterada no plasma de pacientes X-ALD sintomáticos, indicando que nenhuma alteração ocorreu no conteúdo de defesas antioxidantes não-enzimáticas. Considerando que os maiores contribuintes do valor de TRAP no plasma são o urato, as proteínas plasmáticas, o ácido ascórbico e a vitamina E, é provável que as concentrações dessas substâncias não estejam modificadas no plasma de pacientes X-ALD. Isto deve ser, contudo, testado em estudos futuros. Por outro lado, um decréscimo significativo dos níveis de TAR foi encontrado no plasma de pacientes sintomáticos afetados por X-ALD, refletindo uma deficiência na capacidade de rapidamente modular o aumento de espécies reativas. Deve ser salientado que o TAR corresponde a um índice da capacidade de um dado tecido em modular o dano associado a uma produção aumentada de radicais livres e reflete não apenas a quantidade de antioxidantes (dado pelo TRAP), mas também, e particularmente, sua qualidade (dada pela sua reatividade) (Lissi *et al.*, 1995). Considerando os resultados de aumento de lipoperoxidação, que indiretamente refletem

uma maior formação de espécies reativas, pode ser presumido que a medida de TAR seja um marcador mais sensível de produção de radicais livres que a medida de TRAP *in vivo*. Latini *et al.* (2002) verificaram que a medida de TRAP não foi alterada *in vitro* pelo ácido 3-hidróxi glutárico em córtex cerebral de rato, enquanto que a medida de TAR foi significativamente diminuída pela mesma dose desse metabólito, fato este que está de acordo com essa hipótese.

Neste trabalho, foi demonstrado um aumento da atividade de GPx em eritrócitos de pacientes sintomáticos com X-ALD, quando comparado com os controles. O aumento significativo dessa atividade enzimática pode ter sido uma resposta compensatória ao alto nível de espécies reativas em pacientes com X-ALD. Foi verificada, ainda, uma tendência ao aumento da CAT e SOD em fibroblastos de pacientes X-ALD. Entretanto, isto não foi analisado estatisticamente uma vez que só foi possível avaliar fibroblastos de dois pacientes. O aumento das atividades da GPx sugere que peróxido de hidrogênio é formado em excesso, enquanto o aumento da SOD sugeriria que superóxido é formado em excesso. Os peroxissomas contêm muitas enzimas celulares que geram H_2O_2 , como glicolato oxidase, urato oxidase e flavoproteínas desidrogenase envolvidas na β -oxidação de ácidos graxos, uma via metabólica que opera na mitocôndria e nos peroxissomas de tecidos animais (Halliwell e Gutteridge, 2001). Nos peroxissomas, as flavoproteínas reagem com O_2 para dar origem a H_2O_2 .

Por outro lado, levando em conta os resultados aqui apresentados que mostram um aumento dos níveis de quimiluminescência e de TBA-RS e uma diminuição de TAR no plasma, e considerando que um desequilíbrio entre as defesas

antioxidantes e as espécies reativas formadas nos tecidos é indicativo de estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2001), é proposto que a geração de radicais livres esteja envolvida na fisiopatologia do dano tecidual encontrado na X-ALD. Os resultados alterados das atividades enzimáticas antioxidantes nos eritrócitos e nos fibroblastos fortemente corroboram com essa suposição.

Deve ser destacado que na maioria dos testes foram utilizados exclusivamente tecidos (plasma, eritrócitos e fibroblastos) de pacientes com a forma cerebral infantil (cALD). Assim, as conclusões obtidas a partir desses resultados podem ser direcionadas para este fenótipo. Entretanto, especificamente nas medidas de TBA-RS e de TAR foram usadas amostras de pacientes com os fenótipos clínicos cALD e AMN. Neste caso, embora os valores individuais não apareçam nas tabelas, não houve diferença visual entre os valores obtidos para estes parâmetros nesses dois fenótipos, sugerindo que o estresse oxidativo também ocorre no fenótipo AMN. Contudo, mais experimentos devem ser conduzidos futuramente para confirmar esta hipótese.

O cérebro tem baixos níveis de defesas antioxidantes comparado a outros tecidos (Halliwell e Gutteridge, 2001), um fato que faz este tecido ser mais vulnerável ao aumento de espécies reativas. Evidências têm mostrado que o estresse oxidativo está implicado na fisiopatologia de várias doenças neurodegenerativas, como doença de Parkinson, doença de Alzheimer e esclerose múltipla, assim como na epilepsia, convulsões e desmielinização (Resnick e Parcker, 1993; Halliwell e Gutteridge, 2001; Méndez-Álvarez *et al.*, 2001; Karelson *et al.*, 2001). Portanto, se os mesmos resultados encontrados em plasma humano em nosso estudo também ocorressem no cérebro, e, considerando que as defesas antioxidantes estão reduzidas no cérebro, poder-se-ia

presumir que o estresse oxidativo pode comprometer o cérebro na X-ALD, de modo semelhante ao que ocorre em outras desordens neurodegenerativas.

O mecanismo pelo qual ocorre na X-ALD uma severa desmielinização dos oligodendrócitos ainda é bastante discutível e muito pouco efetivamente é conhecido a respeito do mecanismo que gera esse tipo de lesão. O tratamento preconizado para X-ALD (dieta restrita de VLCFA + óleo de Lorenzo - OL) resulta numa diminuição tecidual importante dos ácidos graxos de cadeia muito longa acumulados (melhora bioquímica). Entretanto, ainda é questionada a eficácia desse tratamento já que o mesmo apresenta pouco benefício clínico aos pacientes afetados que já apresentam sintomas neurológicos (van Geel *et al.*, 1997; Moser *et al.*, 2001; Restuccia *et al.*, 1999). A rápida progressão do dano neurológico da X-ALD parece estar relacionada à ativação de astrócitos e à indução de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, sabe-se que o óleo de Lorenzo (gliceroltrioleato/gliceroltrierucato) não atua sobre o processo neuroinflamatório presente nestes pacientes.

Neste estudo também foi avaliado o efeito do tratamento com OL sobre diferentes parâmetros de estresse oxidativo em plasma e em eritrócitos de pacientes com X-ALD sintomáticos e assintomáticos tratados e não tratados com OL. Considerando que não é possível estudar o estresse oxidativo em córtex cerebral de pacientes X-ALD, foi também feita a avaliação do efeito *in vitro* da mistura dos ácidos oleico (C_{18:1})/erúcico (C_{22:1}) sobre diversos parâmetros de estresse oxidativo em plasma e em eritrócitos humanos normais e em córtex cerebral de ratos jovens adicionados dos ácidos hexacosanóico (C_{26:0}) e tetracosanóico (C_{24:0}).

Foi observado novamente um aumento significativo de TBA-RS no plasma de pacientes X-ALD não tratados com OL, que reflete a quantidade de malondialdeído formado. Verificamos também que o tratamento com OL não reverte esse aumento. Para a determinação de TBA-RS foram utilizadas amostras de três pacientes com fenótipo cALD e três com fenótipo assintomático. Os valores individuais estão ilustrados na tabela 12. Não houve diferença visual entre a média da medida de TBA ao comparar esses dois fenótipos, sugerindo que o estresse oxidativo também ocorre na forma assintomática. No entanto, estudos mais aprofundados tornam-se necessários para melhor entender esse aspecto.

Foi observado também que a determinação de TAR no plasma de pacientes X-ALD tratados e não tratados com OL não apresentou alterações significativas em comparação aos controles, indicando que não houve alteração na capacidade de modular o dano associado ao aumento da produção de radicais livres. Cabe salientar que, para a medida de TAR, três dos quatro pacientes estudados apresentavam a forma assintomática, diferentemente da medida de TBA-RS onde a metade dos pacientes era sintomática. É importante investigar os parâmetros de estresse oxidativo em um número maior de pacientes assintomáticos para fins de melhor entender o estresse oxidativo neste fenótipo na X-ALD.

A medida da atividade das enzimas antioxidantes CAT, GPx e SOD, que foi realizada em eritrócitos de pacientes X-ALD de fenótipo assintomático, não se mostrou alterada, antes ou após o tratamento com OL. Cabe salientar que só foram analisados eritrócitos de três pacientes. Ainda assim, estes resultados parecem corroborar com os resultados da determinação de TAR em pacientes assintomáticos.

Os experimentos *in vitro* mostraram um aumento significativo da quimiluminescência e de TBA-RS em plasma humano normal e em córtex cerebral de ratos adicionados de ácidos $C_{26:0}C_{24:0}$, porém o tratamento com a mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ não reverteu essa situação, tal como os resultados encontrados em pacientes X-ALD não tratados e tratados com OL. Novamente, estes resultados indicam que a lipoperoxidação pode estar envolvida de alguma maneira na X-ALD. A medida de TAR mostrou uma diminuição significativa em plasma humano adicionados de $C_{26:0}C_{24:0}$ quando comparada aos controles. Já a adição da mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ não reverteu esse efeito. Quando medida em córtex cerebral de ratos jovens adicionados de $C_{26:0}C_{24:0}$ o TAR não demonstrou alterações significativas, assim como após adição da mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$. As atividades das enzimas antioxidantes CAT e GPx não foram alteradas em eritrócitos humanos normais e em córtex cerebral de ratos jovens adicionados de $C_{26:0}C_{24:0}$ e, novamente, a mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ não mostrou nenhum efeito. Apenas em córtex cerebral de ratos foi verificado um aumento significativo da SOD devido a adição de $C_{26:0}C_{24:0}$, porém a presença da mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ não modificou esse efeito. Este aumento pode sugerir que o radical superóxido seja formado em excesso na X-ALD, podendo ser uma resposta aos níveis elevados dessa espécie reativa.

Por fim, os resultados apresentados neste estudo devem ser cautelosamente considerados e confirmados com um maior número de pacientes com diferentes fenótipos clínicos e com outras técnicas de determinação de estresse oxidativo, já que foram usadas amostras de apenas poucos pacientes, tanto tratados como não tratados com OL. Neste contexto, amostras de líquido cefalorraquidiano poderiam ser úteis para avaliar se o cérebro é também um alvo das espécies reativas na

X-ALD. Se os presentes resultados forem confirmados, poderíamos concluir que o estresse oxidativo contribui, pelo menos em parte para a pronunciada disfunção neurológica encontrada na X-ALD e que o tratamento com OL não tem efeito sobre o estresse oxidativo. Além disso, foi proposto por vários autores que o dano neurológico que ocorre na X-ALD pode ser mediado pela ativação de astrócitos e pela indução de citocinas pró-inflamatórias (McGuinness *et al.*, 1993; Powers *et al.*, 1992). Como os radicais livres também estão envolvidos na resposta inflamatória e em várias doenças neurodegenerativas, os resultados aqui apresentados podem estar refletindo o mesmo fenômeno. Finalmente, considerando os resultados encontrados quanto ao efeito do tratamento com OL sobre estresse oxidativo na X-ALD e já que nenhuma terapia para X-ALD tem sido totalmente eficaz e bem sucedida, pode-se propor que a administração de antioxidantes deva ser considerada como um adjuvante ou até mesmo uma terapia em potencial para pacientes afetados pela X-ALD.

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

- a) Os parâmetros de lipoperoxidação, quimiluminescência e TBA-RS, estão significativamente aumentados em plasma de pacientes sintomáticos com X-ALD.
- b) A medida do potencial antioxidante total (TRAP) não apresentou alterações significativas em plasma de pacientes sintomáticos com X-ALD. Entretanto, a medida da reatividade antioxidante total (TAR) no plasma desses pacientes mostrou uma diminuição significativa.
- c) Foi verificado um aumento significativo da atividade de GPx em eritrócitos de pacientes sintomáticos com X-ALD, quando comparado com os controles. Observou-se, ainda, uma tendência de aumento da CAT e SOD em fibroblastos de pacientes com X-ALD.
- d) O tratamento com OL não reverteu o aumento de TBA-RS no plasma de pacientes sintomáticos e assintomáticos com X-ALD.

- e) A determinação de TAR no plasma de pacientes X-ALD sintomáticos e assintomáticos tratados e não tratados com OL não apresentou alterações significativas em comparação aos controles.
- f) As defesas antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) em eritrócitos de pacientes com X-ALD (assintomáticos) não se mostraram alteradas, antes ou após o tratamento com OL.
- g) Os testes *in vitro* mostraram um aumento significativo da quimiluminescência e de TBA-RS em plasma humano normal adicionado de ácidos $C_{26:0}C_{24:0}$, porém o tratamento com a mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ não reverteu essa situação.
- h) A medida de TAR mostrou uma diminuição significativa em plasma humano adicionados de $C_{26:0}C_{24:0}$ quando comparada aos controles. Já a adição da mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ não reverteu esse efeito.
- i) A atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx não foram alteradas em eritrócitos humanos normais adicionados de $C_{26:0}C_{24:0}$ e, novamente, a mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ não reverteu este efeito.
- j) Os experimentos *in vitro* mostraram um aumento significativo da quimiluminescência e de TBA-RS em córtex cerebral de ratos adicionados de ácidos $C_{26:0}C_{24:0}$, porém a presença da mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ ao meio de incubação não reverteu esse efeito.

- k) A medida de TAR em córtex cerebral de ratos jovens adicionados de $C_{26:0}C_{24:0}$ não se alterou.
- l) A atividade das enzimas antioxidantes CAT e GPx não foi alterada em preparações de córtex cerebral de ratos jovens adicionados de $C_{26:0}C_{24:0}$ ou da mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$. Apenas a atividade da SOD apresentou um aumento significativo devido a adição de $C_{26:0}C_{24:0}$, porém a presença da mistura $C_{18:1}/C_{22:1}$ não modificou esse aumento.
- m) Embora, a confirmação dos resultados se faça necessária com um maior número de pacientes em cada fenótipo clínico, bem como com outras técnicas de determinação de estresse oxidativo, podemos concluir que o estresse oxidativo contribui pelo menos em parte na fisiopatologia de X-ALD e que o tratamento com OL parece não ter efeito sobre o estresse oxidativo nesta doença.

7. PERSPECTIVAS

Pretendemos dar continuidade a este trabalho, investigando outros parâmetros de estresse oxidativo em pacientes com diferentes fenótipos X-ALD, correlacionando os achados de avaliação de estresse oxidativo com os níveis plasmáticos de ácidos graxos de cadeia muito longa. Além disso, pretendemos ver se os parâmetros de estresse oxidativo podem ser alterados por outros tratamentos na X-ALD.

Desta forma as perspectivas são:

- a) Confirmar os resultados deste estudo com um maior número de pacientes com X-ALD com vários fenótipos clínicos (sintomáticos –cALD e AMN; assintomáticos);
- b) Utilizar outras técnicas de avaliação de estresse oxidativo;
- c) Correlacionar os dados de avaliação de estresse oxidativo com os níveis de VLCFA destes pacientes;

- d) Verificar o efeito *in vivo* e *in vitro* de outros tratamentos (lovastatina, 4-fenilbutirato, antioxidantes) na X-ALD sobre vários parâmetros de estresse oxidativo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. In: BERGMAYER, H.U.; BERGMAYER, J.; GRABL, M. (eds). *Methods of enzymatic analysis*. 3rd. Ed.p.273-296, 1983.

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90:7915-7922.

AUBOURG, P.; SACK, G. H.; MEYERS, D. A .; LEASE, J. J. AND MOSER, H. W. (1987). Linkage of adrenoleukodystrophy to a polymorphic DNA probe. **Ann. Neural**, 21: 349-351.

AUBOURG, P.; BLANCHE, S.; JAMBAQUE, I.; ROCCHICILI, F.; KALIFA, G.; NAUD-SAUDREAU, C.; ROLLAND, M. O .; DEBRE, M.; CHAUSSAIN, J. L.; GRISTELLI, C.; FISCHER, A .; BOUGNERES, P. F. (1990) Reversal of early neurologic and neuroradiologic manifestations of X-linked adrenoleukodystrophy by bone marrow transplantation **N.Engl.J.Med.** 322: 1860-1866.

AUBOURG, P.; CHAU, S.; SAIN, J-L. (1991). Adrenoleukodystrophy presenting as Addison's disease in children and adults. **Trends Endocrinol. Metab.** 2:49-52.

AUBOURG, P.; ADAMSBAUM,C.; LAVALLARD-ROUSSEAU M.C.; ROCCHICCIOLI, F.; CARTIER, N.; JAMBAQUE, I.; JAKOBEZAK, C.; LEMAITRE, A.; BOUREAU, F. WOLF, C.; BOUGNERES, P.F. (1993a). A two-year trial of oleic acid and erucic acids ("Lorenzo's oil") as treatment for adrenomyeloneuropathy. **N. Engl. J. Med.** 329: 745-752.

AUBOURG, P.; MOSER, J.; DOUAR, A . M.; SARDE, C. O .; LOPEZ, J. L.; MEEL, J. L. (1993b). Adrenoleukodystrophy gene: unexpected homology to a protein involved in peroxisome biogenesis. **Biochimie.** 75:293-302.

- BEM–MENACHEM E.; KYLLERMAN, R.; MARKLEIND, S. (2000). Superoxide dismutase and glutathione peroxidase function in progressive myoclonus epilepsies. **Epilepsy Research** 40:29–33.
- BERGENDI, L., BENES, L., DURACKOVÁ, Z., FERENCIK, M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sci.** 65: 1865-1874.
- BIOUKAR, E. B.; STRAEHLI, F.; HENG NG, K.; ROLLAND, M.O.; HASHIMOTO, T.; CARREAU, J.P.; DESCHATRETTE, J. (1994). Resistance to erucic acid as a selectable marker for peroxisomal activity: isolation of revertants of an infantile Refsum Disease cell line **J. Inher. Metab. Dis.** 17: 41-59.
- BIRD, S; MILLER, N.J.; COLLINS, J.E.; RICE-EVANS, A. (1995). Plasma antioxidant capacity in two cases of tyrosinaemia type 1: one case treated with NTBC **J.Inher.Metab.Dis.** 18:123-126.
- BOREL, J. (1992) Glycerol trioleate (GTO) and Glycerol Trierucate (GTE) Therapy for Adrenoleukodystrophy (ALD) and Adrenomyeloneuropathy (AMN). **Kennedy Krieger Institute**, Jun.
- BOURRE, J. M.; DAUDU, O.; BAUMANN, N. (1976) Nervonic acid biosynthesis by erucyl-CoA elongation in normal and quaking mouse brain microsomes. Elongation of other unsaturated fatty acyl-CoAs (mono and polyunsaturated). **Biochim. Biophys. Acta** 424: 1.
- BOVERIS, A. (1998) Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. **Medicina (Buenos Aires)** 58: 350-356.
- BRAUN, A.; AMBACH, H.; KAMMERE, S.; ROLINSKI, B.; STOCKLER, S.; RABE, W.; GARTNER, J.; ZIERZ, S. and ROSCHER, A. A. (1995). Mutations in the gene for X- linked adrenoleukodystrophy in patients with different clinical phenotypes. **Am. J. Hum Genet.** 56: 854-861.
- BROWN III, F. R.; VAN DUYN, M. A.; MOSER, A. B. *et al.* (1982). Adrenoleukodystrophy: Effects of dietary restriction of very long chain fatty acids and of administration of carnitine and clofibrate on clinical status and plasma fatty acids. **Johns Hopkins Med. J.** 151: 164-172.

- CARNEY, J. M.; TATSUNO, R. A.; FLOYD, R. A. The role of oxygen radicals in ischemic brain damage: free radicals production, protein oxidation and tissue dysfunction. In KREIGLSTEIN, H.; OBERPICHLER-SCHWENK, H. *Pharmacology of cerebral ischemia*: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, p. 321-331, 1992.
- CARTIER N, GUIDOUX S, ROCCHICCIOLI F, AUBOURG P. (2000). Simvastatin does not normalize very long chain fatty acids in adrenoleukodystrophy mice. **FEBS Lett.** Aug 4;478(3):205-208.
- CHALMERS, R. A . A study of the acidic metabolites present in the urine of normal and mentally-subnormal human subjects and of patients with some metabolic diseases, together with some observations of other physiological fluids. *Ph.D. thesis, Council for National Academic Awards, USA, 1974.*
- CHAVES-CARBALLO, E. (2003). Dietas médicas en el tratamiento de las enfermedades neuropediátricas. **Rev. Neurol.** 37(3): 267-274.
- CHEMIDPLUS. Chemical search input page. A searchable database of more than 360 000 chemical substance records. Disponível em <http://chem.sis.nlm.nih.gov>. Acesso em: outubro de 2003.
- COELHO, J.A; GIUGLIANI, R. (2000). Fibroblasts of skin fragments as a tool for the investigation of genetic diseases: technical recommendations **Genet Molec Biol**, 23(2):269-271.
- CONTRERAS, M.; MOSSER, J.; MEEL, J. L.; AUBOURG, P.; SINGH, I. (1994). The protein coded by the X-linked adrenoleukodystrophy gene is a peroxisomal integral membrane protein. **FEBS Letter.** 344: 211-215.
- DACREMONT, G.; COCQUYT, G.; VINCENT, G. (1995). Measurement of very long chain fatty acids, phytanic and pristanic acid in plasma and cultured fibroblasts by gas chromatography. **J. Inher. Metab. Dis.** 18 : 76-83.
- DE DUVE, C.; BAUDHUIN, P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles) **Physiol. Rev.** 46:323-357.
- DIAGNOSTIC LABORATORY METHODS IN PEROXISSOMAL DISORDERS, Gent. Willens, P.J. DNA diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy. Antwerp: department of medical genetics, 1994.

- DODD, A; ROWLAND, S.A; HAWKES, S.L.J.; KENNEDY, M.A; LOWE, D.R. (1997). Mutations in the adrenoleucodystrophy gene. **Hum. Mutat.** 9:500-511.
- DUBOIS-DALCQ, M.; FEIGENBAUM, V.; AUBOURG, P. (1999). The neurobiology of X-linked adrenoleukodystrophy, a demyelinating peroxisomal disorder. **TINS** vol. 22 (1): 4-13.
- ESIRI, M. M.; HYMAN, N. M.; HORTON, W. L.; LIUNDENBAUM, R. H. (1984). Adrenoleukodystrophy: Clinical, pathological and biochemical findings in two brothers with the onset of cerebral disease in adult life. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.** 10: 429.
- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, **Methods Enzymol.** 186:407-421.
- FONTELLA, F. V.; PULROLNIK, V.; GASSEN, E.; WANNMACHER, C. M. D.; KLEIN, A.B.; WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, C. S. (2000). Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. **Neurochemistry**, 11:541–544.
- FOURNIER, B.; SMEITINK, J. A.M. DORLAND, L.; GERGER, R.; SAUDUBRAY, J.M.; POLLTHE, B.T. (1994). Peroxisomal Disorders: A Review. **J. Inher. Metab. Dis.** 17: 470-486.
- GIMENEZ-SANCHEZ, G. CHILDS, B.; VALLE D. The effect of mendelian disease on human health. In: SCRIVER CR, BEAUDET AL, SLY WS, VALLE D. (Eds.) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed. New York: McGraw-Hill, Inc.; 2001.
- GIULIVI, C.; PODEROSO, J.J.; BOVERIS, A. (1998). Production of nitric oxide by mitochondria. **J.Biol.Chem** 273(18): 11038-11043.
- GOLPERTZ, D. (1974). Inborn Errors of Organic Acid Metabolism. **Clin. Endocrinol. Metab.** 3: 107.

- GONZALEZ-FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A (1991). Hydroperoxide initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle **Free Rad.Biol.Med.** 10:93-100.
- GOULD, S. J.; RAYMOND, G. V.; VALLE, D. The peroxisome biogenesis disorders. In: SCRIVER CR, BEAUDET AL, SLY WS, VALLE D. (Eds.) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed. New York: McGraw-Hill, Inc.; 2001.
- HALL, J. G.; POWERS, E. K.; MCILVAINE, R. T.; EAN, V. H. (1978) The frequency and financial burden of genetic disease in a pediatric hospital **Am.J. Med. Genet.** 1:417.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem. J.** 219:1-14.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Meth. Enzymol.** 186: 1-63.
- HALLIWELL, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence? **The Lancet** 344: 721–724.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. (1996). Oxygen radicals and nervous system, **Trends Neurosci.** 8: 22-26.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J.M.C (Eds.), *Free radicals in Biology and Medicine*, 3rd Edition, Oxford University Press, Oxford, 2001.
- HEALES, S.J.R.; BOLAÑOS, J.P.; BRAND, M.P.; CLARK, J.B.; LAND, J.M. (1996). Mitochondrial damage: An important feature in a number of inborn errors of metabolism? **J.Inher.Metab.Dis.** 19:140-142.
- KARELSON, E.; BOGDANOVIC, N.; GARLIND, A.; WINBLAD, B.; ZILMER, K.; KULLISAAR, T.; VIHALEMM, T.; KAIRANE, C.; ZILMER, M. (2001) The cerebrocortical areas in normal brain aging and in the Alzheimer's Disease: noticeable difference in the lipid peroxidation level and in antioxidant defense. **Neurochem. Res.** 26: 353-361.

- KEMP, S.; MOOYER, P.A.W.; BOLHUIS, P. A. (1996). ALDP expression in fibroblasts of patients with X-linked adrenoleukodystrophy **J. Inherit. Metab. Dis.** 19: 667-674.
- KEMP, S.; WLI, H.M.; LU, J.F.; BRAITERMANN, L.; MCGUINNES, M.C.; MOSER, A.B.; WATKINS, P.A.; SMITH, K.D. (1998). Gene redundancy and pharmacological gene therapy implication for X-linked adrenoleukodystrophy. **Nat. Med.** 4(11): 1261-1268.
- KISHIMOTO, Y.; MOSER, H.W.; KAWAMURA, N.; PLATT, M.; PALLANTE, S.L.; FENSELAU, C. (1980). Evidence that abnormal very long chain fatty acids of brain cholesterol esters are of exogenous origin. **Biochem. Biophys. Res. Commun** 96:69-76.
- KOIKE, R.; TSUJI, S.; OHNO, T.; SUZUKI, Y.; ORRI, T.; MIYATAKE, T. (1991). Physiological significance of fatty acid elongation system in adrenoleukodystrophy. **J. Neurol. Sci.** 103: 188-196.
- KOLKER, S.; AHLEMEYER, B.; KRIEGLSTEIN, J.; HOFFMANN, G.F. (2001) Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neurotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons **Pediatr. Research** Jul;50(1):76-82.
- KORENKE, G. C.; HUNNEMAN, D. H.; KOHLER, J.; STÖCKLER, LANDMARK K; HANEFELD, F. (1995). Glyceroltrioleate/glyceroltrierucate therapy in 16 patients with X-chromosomal adrenoleukodystrophy/adrenomyeloneuropathy: effect on clinical, biochemical and neurophysiological parameters. **Eur. J. Pediatr.** 154: 64-70.
- KORENKE, G.C.; ROTH, C.; KRASEMANN, E.; HÜFRER, M.; HUNNEMAN, D.H.; HANEFELD, F. (1997). Variability of endocrinal dysfunction in 55 patients with X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, laboratory and genetics findings. **Eur. J. Endocrinol.** Jul 137:1 40-7.
- KOVACS, W. J.; OLIVIER, L.M; KRISANS S.K. (2002). Central role of peroxisomes in isoprenoid biosynthesis, **Progress in Lipid Research** 41: 369–391.

- KRIVIT, W.; SHAPIRO, E.; LOCKMAN, L.; TORRES, F.; STILLMAN, A.; MOSER, A.; MOSER, H.W. Recommendation for treatment of childhood cerebral form of adrenoleukodystrophy. In: HOBBS, J.R.; RICHES, P.G. (Eds.) *Correction of certain genetic diseases by transplantation*. London. CONGENT Trust, pp. 38-39, 1992.
- LATINI, A.; ROSA, R.B.; SCUSSIATO, K.; LLESUY, S.; BELLÓ-KLEIN, A.; WAJNER, M. (2002). 3-Hydroxyglutaric acid induces stress and decreases the antioxidant defences in cerebral cortex of young rats. **Brain Res.** 956: 367-373.
- LISSI, E.; PASCUAL, C.; CASTILLO, M.D. (1992). Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis **Free Rad. Res. Comms.** 17: 299-311.
- LISSI, E.; SALIM-HANNA, M.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M.D. (1995). Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements, **Free Rad. Biol. Med.** 18; 153-158.
- LOWRY, OH.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, AI.; RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent **J.Biol.Chem.** 193: 265-275.
- MATÉS, J.M.; PEREZ-GÓMEZ, C.; CASTRO, I.N. (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry** 32(8): 5595-603.
- MCGUINNESS, M.C; WESSELINGH, S.L.; GRIFFIN, D.E.; POWERS, J.M.; MOSER, H.W.; SMITH, K.D. (1993). Cytokines and inflammatory demyelinating lesions in adrenoleukodystrophy and multiple sclerosis. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 52: 331a.
- MÉNDEZ-ÁLVAREZ, E.; SOTO-OTERO, R.; HERMIDA-AEIJEIRAS, A.; LÓPEZ-REAL, A.M.; LABANDEIRA-GARCÍA, J.L. (2001). Effects of aluminium and zinc on the oxidative stress caused by 6-hydroxydopamine autoxidation: relevance for the pathogenesis of Parkinson's disease. **Biochim. Biophys. Acta.** 1586: 155-168.
- MIGEON, B.R.; MOSER, A.B.; AXELMAN, J.; SILLENCE, D.; NORUM, R.A. (1981). Adrenoleukodystrophy evidence for X linkage, inactivation and selection favoring the mutant allele in heterozygous cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 78: 5066-5070.

- MOSER, H.W.; NAIDU, S.; KUMAR, A.J.; ROSENBAUM, A.E. (1987). The adrenoleukodystrophies. **CRC Crit. Rev. Neurobiol.** 3: 29.
- MOSER, H. W.; MOSER, A. B. Measurement of saturated very long chain fatty acid in plasma. In: Hommes, F. A., (Ed.) *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics*. New York: Wiley 1991.
- MOSER, H.W.; BERGIN, A.; NAIDU S.; LADENSON, P W (1991a). Adrenoleukodystrophy. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.** 20(2): 297-318.
- MOSER, H.W.; MOSER A.B.; NAIDU, S.; BERGIN,A. (1991b). Clinical aspects of adrenoleukodystrophy and adrenomieloneuropathy. **Dev. Neurosci.** 13: 254.
- MOSER, H. W.; MOSER A.B; SMITH, K.D.; BERGIN, A.; BOREL, J.; SHANKROFF, J.; STINE, O.C.; MERETTE, C.; OTT, J.; KRIVIT, W.; SHAPIRO, E. (1992). Adrenoleukodystrophy: phenotypic variability and implications for therapy. **J. Inherit. Metab. Dis.** 15: 645-664.
- MOSER, H.W. (1995). Adrenoleukodystrophy: natural history, treatment, and outcome. **J. Inherit. Metab. Dis.** 18: 435-447.
- MOSER, H.W. (1997). Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. **Brain** 120: 1485-1508.
- MOSER, H W; SMITH, K D; WATKINS, P.A.; POWERS, J.; MOSER A B. X-linked adrenoleukodystrophy. In: SCRIVER CR, BEAUDET AL, SLY WS, VALLE D. (Eds.) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed. New York: McGraw-Hill, Inc.; 2001.
- MOSER, H.W.; RAYMOND, G.V.; KÖHLER, W.; SOKOLOWSKI, P.; MOSER, A.B; KORENKE, G.C.; GREENE, A.; LOES, D.J.; HUNNEMANN, D.F.; JONES, R.O.; LU, S.E.; UZIEL,G.; ROELS, F. (2002). Evaluation of the preventive effect of glyceryl trioleate-trierucate ("Lorenzo's Oil") therapy in X-linked adrenoleukodystrophy. Results of two concurrents studies, **United Leukodystrophy Foundation News** 19: 3-4.
- MOSSER, J.; DOUAR, A.M.; SARDE, C. O.; KIOSCHIS, P.; FEIL, R.; MOSER H.W.; POUTSKA, A.M.; MANDEL, J.M.; AUBORG, P. (1993). Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. **Nature** 361: 726-730.

- MUELLER, R R.; YOUNG, I.D. Biochemical genetics. In: *Emery's elements of medical genetics*, 9th ed. NY, Churchill, Livingstone, pp 127-141, 1995.
- OLIVIER, L.M; KRISANS, S.K (2000). Peroxisomal protein targeting and identification of peroxisomal targeting signals in cholesterol biosynthetic enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta** 1529: 89-102.
- PAI, G. S.; KHAN, M.; BARBOSA, E.; KEY. L. L.; CRAVER J. R.; CURE, J. K.; BETROS, R.; SINGH I. (2000). Lovastatin Therapy for X-Linked Adrenoleukodystrophy: Clinical and Biochemical Observations on 12 Patients. **Molecular Genetics and Metabolism**. 69: 312–322.
- POWERS, J.M.; LIU, Y.; MOSER, A.; MOSER, H. The inflammatory myelinopathy of adrenoleukodystrophy: cells, effector molecules, and pathogenetic implications. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 51: 630-643, 1992.
- POWERS, J.M.; MOSER, H.W. (1998). Peroxisomal disorders: genotype, phenotype, major neuropathologic lesions and pathogenesis. **Brain Pathology** 8: 101-120.
- PRYOR, W.A.; JIN, X.; SQUADRITO, G.L. (1994). One- and two-electron oxidations of methionine by peroxynitrite. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91: 11173-11177.
- PRZEDBORSKI, S.; DONALDSON, D. BS.; JAKOWEC M.; KISH, S. J.; GUTTMAN, M.; ROSOKLIJA, , G.; HAYS A P. (1996). Brain Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase Activities in Amyotrophic Lateral Sclerosis **Annals of Neurology** 39: 158–165.
- RAINE, D.N. (1974). Separation of three isoenzymes of N-acetyl-beta-D-hexosaminidase from human tissue by cellulose acetate membrane electrophoresis. **J. Clin. Pathol.** Suppl. 8:156.
- RESTUCCIA D, LAZZARO V DI, VALERIANI M, OLIVIERO A, PERA D LE, BARBA C, CPPA M, BERTINI E, CAPUA M DI & TONALI P. (1999). Neurophysiologic follow-up of long-term dietary treatment in adult-onset adrenoleukodystrophy. **Neurology**, 52 (March): 810-815.

- REZNICK, A Z.; PACKER L. Free Radicals and Antioxidants in Muscular and Neurological Diseases and Disorders. In: G. Pilo, E. Albano, M. U. Dianzani (eds) *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*, Birkhäuser Verlag Basic / Switzerland, 1993.
- RICHTER, C.; GOGVADZE, V.; LAFFRANCHI, R.; SCHLAPBACH, R.; SCHWEIZER, M.; SUTER, M.; WALTER, P.; YAFFEE, M. (1995). Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases **Bioch. Biophys. Acta** 1271: 67-74.
- RIZZO, W.B.; WATKINS, P.A.; PHILLIPS, M.W.; CRANIN, D.; CAMPBELL, B.; AVIGAN, J. (1986). Adrenoleukodystrophy: dietary oleic acid lowers fiboblast saturated C22-C26 fatty acids. **Neurology** 36: 357.
- RIZZO, W.B.; PHILLIPS, M.W.; DAMMANN, A.L.; LESHNER, R.Y.; JENNINGS, S.V.K. (1987). Adrenoleukodystrophy. Dietary oleic acid lowers hexacosanoate levels. **Ann. Neurol.** 21: 232.
- RIZZO, W.B.; LESHNER, R.Y.; ODONE, A. et al. (1989). Dietary erucic acid therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. **Neurology** 39(11): 14150-1422.
- RHODIN, J. Correlation of ultrastructural organization and fuction in normal and experimentally changed tubule cells of the mouse kidney. Doctoral Thesis, Karolinska Institutet, Stockholm, Atkitbolaget, Godvil, 1954.
- SAUDUBRAY, J.M.; CHARPENTIER, C. Clinical phenotypes: diagnosis/algorithms. In: SCRIVER CR, BEAUDET AL, SLY WS, VALLE D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed. New York: McGraw-Hill, Inc.; 2001.
- SCIENTIFIC HOSPITAL SUPLPLIES INTERNATIONAL LIMITED. Speirs Brakell Limited, August 1994, England.
- SCRIVER CR, BEAUDET AL, SLY WS, VALLE D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed. New York: McGraw-Hill, Inc.; 2001.
- SENECA, S.; LISSENS, W. (1995). DNA diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy. **J. Inherit. Metab. Dis.** 18: 34-44.

- SENIR, R.; KAHN, M.; CHAHAL, A.; SINGH, I. (1998). Localization of nervonic acid beta-oxidation in human and rodent peroxisomes. Impaired oxidation in Zellweger syndrome and X-linked adrenoleukodystrophy. **J. Lipid. Res.** 39(11): 2161-2171.
- SINGH, I.; KHAN, M.; KEY, L.; PAI, S. (1998a). Lovastatin for X-linked adrenoleukodystrophy. **N. Eng. J. Med.** 339(10): 702-703.
- SINGH, I.; PAHAD, K.; KHAN, M. (1998b). Lovastatin and sodium phenylacetate normalize the levels of very long chain fatty acids in skin fibroblasts of X-adrenoleukodystrophy. **FEBS Letters** 426: 342-346.
- SOUTHORN, P.A.; POWIS, G. (1988). Free radicals in medicine I. Chemical nature and biological reactions. **Mayo Clin. Proc.** 63: 381-389.
- STOP ALD FOUNDATION. Current therapies. Disponível em: www.stopald.org. Acesso em: janeiro de 2003.
- STRADOMSKA, T.J.; TYLKI-SZYMANSKA, A. (1996). Examination of very long chain fatty acids in diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy. **Pediatr. Pol., Poland**, 3: 197-201.
- STUMPF, D.A.; HAYWARD, A.; HAAS, R. SCHAUMBURG, H.H. (1981). Adrenoleukodystrophy. Failure of immunosuppression to prevent neurological progression. **Arch. Neurol.** 38: 48.
- SUZUKI Y, IMAMURA A, SHIMOZAWA N, KONDO N. (2001). The clinical course of childhood and adolescent adrenoleukodystrophy before and after Lorenzo's oil. **Brain Dev.** Mar,23(1): 30-33.
- TEN BRINK, H.J.; VAN DEN HEUVEL, C.M.M.; POLL-THE, B.T.; WANDERS, R.J.A.; JAKOBS,C. (1993). Peroxisomal disorders. **J. Inher. Metab. Dis.** 16: 587-590.
- TRAVACIO, M.; LLEUSUY, S. (1996). Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress conditions. **Free Radical Research in Latin America** 48(1/2): 9-13.

- TSUJI, S.; SANO-KAWAMURA, T.; ARIGA, T.; MIYTAKE, T. (1985). Metabolization of (17, 18-3H2) hexacosanoic acid and (15, 16-3H2) lignoceric acid in cultured skin fibroblasts from patients with adrenoleukodystrophy (ALD) and adrenomyeloneuropathy (AMN). **J. Neurol. Sci.** 71: 359-367.
- UNTERRAINER, G.; MOLZER, B.; FORSS-PETTER, S.; BERGER, J. (2000). Co-expression of mutated and normal adrenoleukodystrophy protein reduces protein function: implications for gene therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. **Hum. Molec. Genet.** 9: 2609-2616.
- UZIEL G, BERTINI E, BARDELLI P, RIMOLDI M, GAMBETTI M. (1991). Experience on therapy of adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. **Dev Neurosci.**13(4-5): 274-279.
- VAN DUYN, M.A.; MOSER, A.B.; BROWN III, F.R.; SACKTOR, N.; LIU, A.; MOSER, H.W. (1984). The design of a diet restricted in saturated very long chain fatty acids: therapeutic application in adrenoleukodystrophy. **Am. J. Clin. Nutr.** 40: 227-284.
- VAN GEEL, B.M.; ASSIES, J.; WANDERS, R.J.; BARTH, P.G. (1997). X-linked adrenoleukodystrophy: clinical presentation, diagnosis, and therapy. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry** 63(1): 4-14.
- VAN GEEL, B M; ASSIES, J; HAVERKORT, E B; KOELMAN, J H T M; VERBEETEN, B JR; WANDERS, R J A; BARTH, P G. (1999). Progression of abnormalities in adrenomyeloneuropathy and neurologically asymptomatic X-linked adrenoleukodystrophy despite treatment with "Lorenzo's oil" **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry** 67(3): 290-299.
- WABER, L. (1990). Inborn errors of metabolism. **Ped. Ann.** 19(2): 105-118.
- WANDERS, R J A; ROERMUND C. W T; SCHUTGENS R B H; BARTH P G; HEYMANS H.S.A.; VAN DEN BOSCH, H.; TAGER J M. (1990). The inborn errors of peroxisomal β -oxidation. **J. Inher. Metab. Dis.** 13: 04-36.
- WANDERS, R J A.; ROERMUND C W T.; VAN LAGEWEG, W.; JAKOBS, B S.; SCHUTGENS, R B H; NIJENHUIS A A.; TAGER J M. (1992). X-linked adrenoleukodystrophy: Biochemical diagnosis and enzyme defect. **J. Inher. Metab. Dis.** 15: 634-644.

- WANDERS R J A, SCHUTGENS R B H, BARTH P G, TAGER J M; VAN DEN BOSCH H. (1993). Postnatal diagnosis of peroxisomal disorders: A biochemical approach. **Biochemie** 75: 269-279.
- WANDERS, R. J. A.; SCHUTGENS, R. B. H.; BARTH, P. G.; TAGER J M. (1994). Clinical and biochemical characteristics of peroxisomal disorders: an update. **Eur. J. Pediatr.** 153 (suppl 1) S44-S48.
- WANDERS, R. J. A.; SCHUTGENS, R. B. H.; BARTH, P. G. (1995). Peroxisomal Disorders: A Review. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 54 (5): 726-739.
- WANDERS, R.J.A.; VAN GRUNSVEN E.G; JASSEN, G.A. (2000). Lipid metabolism in peroxisomes: enzymology, functions and dysfunctions of the fatty acid α - and β -oxidation system in humans. **Biochemical Society Transactions** 28(2): 141-148.
- WANDERS, R.J.A.; VREKEN, P.; FERDINANDUSSE, S.; JASSEN, G.A.; WATERHAM, R; VAN ROERMUND, C.W.T.; VAN GRUNSVEN E.G. (2001). Peroxisomal fatty acid α - and β -oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. **Biochemical Society Transactions** 29(2): 250-267.
- WARRS, R. W.; CHALMERS, R.A.; LAWSON, A.M. (1975). Abnormal organic acidurias in mentally retarded patients. **Lancet** 1: 368.
- WENDEL, A. (1981). Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.** 77: 325-332.
- WULF, D. (2001). Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.** 82: 47-95.
- YAMADA T, SHINNOH N, TANIWAKI T, OHYAGI Y, ASAHARA H, HORIUCHI, KIRA J. (2000). Lovastatin does not correct the accumulation of very long-chain fatty acids in tissues of adrenoleukodystrophy protein-deficient mice. **J Inherit Metab Dis.** Sep;23(6): 607-614.
- ZINKHAM, W.H.; KICKLER, T.; BOREL, J.; MOSER, H.W. (1993). Lorenzo's oil and thrombocytopenia in patients with adrenoleukodystrophy. **N. Engl. J. Med.** 328: 1126.

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – **PACIENTES COM ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AO X**

O presente projeto de pesquisa tem por objetivo verificar os efeitos sobre o estresse oxidativo na adrenoleucodistrofia ligada ao X em pacientes tratados e não tratados com a mistura gliceroltrioleato/gliceroltrierucato (óleo de Lorenzo).

Os dados necessários para a realização do projeto serão obtidos através de entrevistas realizadas com os pacientes bem como da análise de ácidos graxos e dos parâmetros de avaliação de estresse oxidativo em plasma e eritrócitos pela coleta de sangue periférico e fibroblastos de pele. Estes dados serão coletados nos dias de consultas rotineiras dos pacientes, não sendo necessárias comparecimento dos pacientes em consultas extras.

Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue para o estudo são semelhantes aos envolvidos na coleta de sangue para exames de laboratoriais de rotina. Uma possível reação de dor decorrente da coleta de fibroblastos pode ser prevenida pelo uso de analgésicos por via oral, sendo a posterior cicatrização um processo rápido. Este procedimento será feito em condições assépticas sob anestesia local. O material coletado será utilizado única e exclusivamente para fins do projeto de pesquisa, sendo garantido o sigilo das informações obtidas e que o indivíduo, ou familiares, no caso de menores de idade, terá acesso as mesmas.

Pelo presente Consentimento, declaro que fui informado, de forma clara e detalhada, sobre o presente Projeto de Pesquisa. Os pesquisadores e responsável pelo projeto são as Farmacêutico-bioquímicas Marion Deon e Carmen Regla Vargas.

Fui igualmente informado da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca da pesquisa; da liberdade de não participar do estudo, da segurança da preservação da privacidade.

Data:

Indivíduo:

Responsável Legal:

Pesquisador:

Anexo 2

Os resultados obtidos neste trabalho foram objeto de publicação e apresentação em congressos, a seguir descritos:

- a) Aceito para publicação em *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* – *in press*:

Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy.

(C.R. VARGAS, M. WAJNER, L.R. SIRTORI, L.GOULART, M. CHIOCHETTA, D. COELHO, A. LATINI, S. LLESUY, A. BELLÓ-KLEIN, R GIUGLIANI, M. DEON, C.F. MELLO).

- b) Apresentado em congressos internacionais:

- *IX International Congress on Inborn Errors of Metabolism – ICIEM 2003 – Brisbane, Australia* (apresentação oral).
Resumo publicado: **J. Inherit. Met. Dis.** 26(2003) suppl.2: 366-P pp.183.
- *IV Congresso latinoamericano de errores innatos del metabolismo y pesquisa neonatal – 2003 – Cataratas del Iguazú – Argentina.*
Resumo publicado nos anais do congresso.

- c) Premiado como destaque no *XV Salão de Iniciação Científica da UFRGS 2003*.

- d) Apresentado em 4 congressos nacionais.