

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

***PROCESSOS OXIDATIVOS, INFLAMATÓRIOS E ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO  
HEXACOSANÓICO NA ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AO  
CROMOSSOMO X E O EFEITO DE ANTIOXIDANTES***

DESIRÉE PADILHA MARCHETTI

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmen Regla Vargas

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Simon Coitinho

Porto Alegre, 2019.

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

***PROCESSOS OXIDATIVOS, INFLAMATÓRIOS E ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO  
HEXACOSANÓICO NA ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AO  
CROMOSSOMO X E O EFEITO DE ANTIOXIDANTES***

DESIRÉE PADILHA MARCHETTI

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmen Regla Vargas

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Simon Coitinho

Tese a ser 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 doutor em Bioquímica.

Porto Alegre, 2019.

### CIP - Catalogação na Publicação

Marchetti, Desirèe Padilha  
PROCESSOS OXIDATIVOS, INFLAMATÓRIOS E ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO HEXACOSANÓICO NA  
ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AO CROMOSSOMO X E O EFEITO  
DE ANTIOXIDANTES / Desirèe Padilha Marchetti. --  
2019.

171 f.

Orientadora: Carmen Regla Vargas.

Coorientadora: Adriana Simon Coitinho.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X. 2.  
ácido hexacosanóico. 3. inflamação. 4. estresse  
oxidativo. I. Vargas, Carmen Regla, orient. II.  
Coitinho, Adriana Simon, coorient. III. Título.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação,  
abraçar a vida e viver com paixão,  
perder com classe  
e vencer com ousadia,  
porque o mundo pertence a quem se atreve  
e a vida é muito para ser insignificante.”

(Charles Chaplin)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha orientadora Carmen Regla Vargas, por ter me recebido de braços abertos no seu grupo de pesquisa, desde 2013, quando iniciei no mestrado, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela confiança que depositou em mim, por me auxiliar sempre.

À minha co-orientadora Adriana Coitinho, por todos os ensinamentos compartilhados, pela parceria e paciência.

Gostaria de agradecer aos meus queridos colegas do Laboratório de Análises de Metabólitos, pela ajuda, força e risadas, mas principalmente pela amizade que construímos ao longo destes anos.

À minha colega de doutorado e grande amiga Bruna Donida, que tenho o prazer de chamar de irmã, pois os amigos verdadeiros são os irmãos que escolhemos. Obrigada por ser minha dupla, por toda a ajuda, força, parceria, pela amizade que construímos ao longo destes 12 anos, por estar sempre presente, em todos os momentos, seja de perto, seja de longe.

À minha família, por todo amor e carinho, pela força, incentivo, por acreditarem e investirem sempre em mim, em especial minha mãe Cinara e meu pai Anibal. Gostaria de agradecer também a minha irmã Fernanda e meu cunhado Ricardo, que mesmo estando a muitos quilômetros de distância, sempre estiveram por perto.

Ao meu marido (e pai do nosso filho) Maurício, pelo incentivo e força, pelo excesso de paciência, pelo companheirismo, por me apoiar em decisões

difíceis, por estar ao meu lado sempre, mas principalmente, por todo amor e carinho.

Ao laboratório de Genética Toxicológica da UFCSPA, pelo conhecimento compartilhado, pela colaboração e pelo empréstimo de material.

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

À CAPES, pela bolsa concedida.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	7
RESUMO.....	10
ABSTRACT .....	13
1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1 Erros Inatos do Metabolismo.....	16
1.2 Doenças Peroxissomais.....	16
1.3 Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X .....	18
1.3.1 Tratamento da X-ALD.....	25
1.4 Radicais livres e Estresse Oxidativo .....	28
1.5 Estresse Oxidativo na X-ALD e estudos com antioxidantes.....	32
1.6 Inflamação na X-ALD .....	37
2. OBJETIVOS .....	41
2.1 Objetivo geral.....	41
2.2 Objetivos específicos .....	41
3. RESULTADOS .....	43
3.1 Capítulo I- Artigo 1: Inflammatory profile in X-linked adrenoleukodystrophy patients: Understanding disease progression .....	44
3.2 Capítulo II- Artigo 2: Oxidative imbalance, nitrative stress and inflammation in C6 glial cells exposed to hexacosanoic acid: protective effect of N-acetyl-L-cysteine, Trolox and Rosuvastatin .....	56
3.2 Capítulo III- Artigo 3: The protective effect of n-acetyl-L-cysteine and rosuvastatin against oxidative stress in fibroblasts from asymptomatic X-ALD patients: a preliminary study.....	69
3.2 Capítulo IV- Artigo 4: Increased levels of hexacosanoic acid in brain from Wistar rats: a behavioral study .....	95
4. DISCUSSÃO GERAL .....	116
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	135

6. PERSPECTIVAS .....	137
6. REFERÊNCIAS .....	138
7. ANEXOS .....	155
7.1 Lista de tabelas .....	155
7.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: pacientes homens com Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X .....	156
7.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: pacientes mulheres (mães) com Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X .....	160
7.4 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: indivíduos controle (crianças) .....	164
7.5 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: indivíduos controle (adultos) .....	167
7.6 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre .....	170



## LISTA DE ABREVIATURAS

- AASA – semialdeído aminoadípico
- ABC – do inglês *ATP-binding cassette*
- ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico
- AL – Ácido lipoico
- ALDP – Proteína transmembrana peroxissomal
- AMN – Adrenomieloneuropatia
- APC – célula apresentadora de antígeno
- ATP – Adenosina trifosfato
- BHE – Barreira Hematoencefálica
- C18:1 – Ácido oléico
- C22:0 – Ácido docosanóico
- C24:0 – Ácido tetracosacóico
- C26:0 – Ácido hexacosanóico
- cALD – Forma cerebral infantil da adrenoleucodistrofia
- CAT – Catalase
- CEL – Carboxietil - lisina
- CML – Carboximetil - lisina
- CuZn-SOD – Superóxido Dismutase Cobre e Zinco
- DCF – diclorofluoresceína
- DBP – Doença da Biogênese do Peroxissomo
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- EC-SOD – Superóxido Dismutase Extracelular
- EIM – Erros Inatos do Metabolismo

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

GM-CSF – do inglês *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

GPx – Glutathione Peroxidase

GSA – semialdeído glutâmico

GSH – Glutathione Reduzida

GSSG – Glutathione Oxidada

GTE – Glicerol trierucato

GTO – Glicerol trioleato

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio

HO-1 – Heme oxigenase-1

HTZ – Heterozigotas

IFN – interferon

IL – Interleucina

LPS – lipopolissacarídeo de *E. coli*

LDL – lipoproteína de baixa densidade

MDA – Malondialdeído

MDAL – Malondialdeído - lisina

Mn-SOD – Superóxido Dismutase Manganês

NAC – N-acetil-L-cisteína

NO<sup>•</sup> – Óxido nítrico

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – Ânion superóxido

OH<sup>•</sup> – Radical hidroxila

OL – Óleo de Lorenzo

ONOO<sup>•</sup> – Peroxinitrito

PBMC – do inglês *peripheral blood mononuclear cells*

PDGF – do inglês *platelet-derived growth factor*

PHA – fitohemoaglutinina

RL – Radical livre

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RSV – Rosuvastatina

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido Dismutase

TBA-RS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TGF – fator de crescimento tumoral

TMO – Transplante de medula óssea

TNF $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral alfa

TRO – Trolox

VLCFA – do inglês *very long chain fatty acids*

X-ALD – Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X

## RESUMO

Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (X-ALD) é um erro inato do metabolismo dos peroxissomos, com incidência de 1:21.000 para homens hemizigotos e 1:14.000 para mulheres heterozigotas. A doença se caracteriza pelo acúmulo de ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA – do inglês *very long chain fatty acids*), principalmente os ácidos hexacosanóico (C26:0) e tetracosanóico (C24:0) em fluidos e tecidos corporais, podendo causar insuficiência adrenal e grave desmielinização. É causada por mutações no gene ABCD1, o qual codifica uma proteína responsável por transportar VLCFA do citosol para dentro do peroxissomo para serem oxidados. Apesar dos mecanismos relacionados ao dano tecidual ainda não estarem bem elucidados, estudos vêm mostrando que o acúmulo de metabólitos tóxicos, a inflamação e o estresse oxidativo podem estar relacionados com a fisiopatologia da X-ALD. O tratamento para X-ALD é ainda considerado experimental, não havendo nenhuma terapia satisfatória. Alguns estudos vêm investigando as propriedades antioxidantes e antiinflamatórias de n-acetil-L-cisteína (NAC), rosuvastatina (RSV) e trolox (TRO – análogo hidrossolúvel da vitamina E) em doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Considerando o exposto, os objetivos deste trabalho foram: avaliar o perfil inflamatório em pacientes com diferentes fenótipos para X-ALD, verificar o efeito *in vitro* de diferentes antioxidantes sobre parâmetros de estresse oxidativo e inflamação em células gliais enriquecidas com C26:0 (modelo *in vitro* da X-ALD) e em fibroblastos de pacientes heterozigotas e hemizigotos assintomáticos e, por fim, verificar as alterações comportamentais de ratos Wistar selvagens submetidos à injeção de C26:0. No que concerne aos resultados referentes à avaliação da inflamação

em pacientes X-ALD, que estão representados no artigo 1 publicado, podemos inferir que o aumento de citocinas plasmáticas em pacientes assintomáticos poderia ser considerada um biomarcador precoce de progressão da doença e dano neurológico, uma vez que pacientes assintomáticos apresentaram níveis elevados das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8 e TNF- $\alpha$  e altos índices de anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, como uma tentativa de contrabalancear o status inflamatório. Além disso, pacientes com fenótipo Adrenomieloneuropatia (AMN) apresentaram altos índices de TNF- $\alpha$  e IL-2 (pró-inflamatórias), bem como IL-5 e IL-4 (anti-inflamatórias). É possível supor que a inflamação na X-ALD possa estar relacionada à concentração plasmática de VLCFA, visto que verificamos uma positiva correlação entre níveis de C26:0 e citocinas pró-inflamatórias em pacientes assintomáticos e AMN, assim como uma correlação negativa entre citocinas anti-inflamatórias e a razão C24:0/C22:0 (ácido docosanóico) em pacientes AMN. Em relação aos resultados referentes à cultura de células gliais (apresentados no artigo 2 publicado), podemos sugerir que o C26:0, por si só, tem a capacidade de alterar o status redox, de causar dano oxidativo ao DNA, estresse nitrativo e inflamação em células gliais. Ainda, verificamos que os três compostos NAC, TRO e RSV tiveram a capacidade de atenuar alguns danos causados pelo C26:0 nas células. O artigo 3 mostra que fibroblastos de pacientes assintomáticos, tanto hemizigotos quanto heterozigotas, quando tratados com NAC e RSV, liberaram menores níveis de DCF em comparação aos fibroblastos não tratados. Ainda, a NAC mostrou-se capaz de aumentar as atividades das enzimas superóxido dismutase e catalase nos fibroblastos dos pacientes, entretanto NAC e RSV não foram capazes de alterar o estresse

nitrativo nos fibroblastos. Os resultados referentes ao artigo 4 mostram evidências que o C26:0, ao ser administrado em ratos Wistar, pode causar alterações comportamentais, como prejuízo locomotor, diminuição da capacidade exploratória e redução de respostas de orientação-investigação. Considerando nossos resultados, deduzimos que o C26:0, principal metabólito acumulado na doença, está relacionado com os danos encontrados na X-ALD, e que futuros estudos abordando sua toxicidade e efeitos possam ser de suma importância para o desenvolvimento de um tratamento capaz de reduzir os níveis plasmáticos e teciduais nos pacientes afetados. Ainda, concluímos que o estudo de antioxidantes são de grande relevância em um tratamento adjuvante para X-ALD, visto que ainda não há nenhuma terapia satisfatória para este grave erro inato do metabolismo.

## ABSTRACT

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is an Inborn Error of Peroxisome Metabolism, with an incidence of 1: 21,000 for hemizygotes men and 1: 14,000 for heterozygotes women. This disease is characterized by accumulation of very long chain fatty acids (VLCFA), mainly hexacosanoic (C26:0) and tetracosanoic acids (C24:0) in body fluids and tissues, which may cause adrenal insufficiency and severe demyelination. It is caused by mutations in the ABCD1 gene, which encodes a protein responsible for transporting VLCFA from the cytosol into the peroxisome to be oxidized. Although mechanisms related to tissue damage have not yet been well elucidated, studies have shown that the accumulation of toxic metabolites, inflammation and oxidative stress may be related to the pathophysiology of X-ALD. Treatment for X-ALD is still considered experimental and there is no satisfactory therapy. Some studies have investigated the antioxidant and anti-inflammatory properties of n-acetyl-L-cysteine (NAC), rosuvastatin (RSV) and trolox (TRO - water-soluble analog of vitamin E) in diseases related to oxidative stress. Considering the above, the aims of this work were: to evaluate the inflammatory profile in patients with different phenotypes for X-ALD, to verify the *in vitro* effect of different antioxidants on parameters of oxidative stress and inflammation in glial cells enriched with C26:0 (*in vitro* model for X-ALD) and in fibroblasts from asymptomatic heterozygote and hemizygote patients and, finally, to verify the behavioral changes of wild Wistar rats submitted to C26:0 injection. Concerning the results regarding the evaluation of inflammation in X-ALD patients, which are represented in article 1, we can infer that the increase of plasmatic

cytokines in asymptomatic patients could be considered an early biomarker of disease progression and neurological damage, since asymptomatic patients had elevated levels of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8 and TNF- $\alpha$  and high levels of anti-inflammatory IL-4 and IL-10 as an attempt to counterbalance the inflammatory status. In addition, patients with Adrenomyeloneuropathy (AMN) phenotype had high levels of TNF- $\alpha$  and IL-2 (pro-inflammatory), as well as IL-5 and IL-4 (anti-inflammatory). It is possible to suppose that the inflammation in X-ALD may be related to the plasmatic concentration of VLCFA, since we found a positive correlation between levels of C26:0 and pro-inflammatory cytokines in asymptomatic patients and AMN, as well as a negative correlation between anti-inflammatory cytokines and C24:0/C22:0 ratio (docosanoic acid) in AMN patients. Regarding glial cell culture results (presented in article 2), we may suggest that C26:0, by itself, has the ability to alter redox status, cause oxidative DNA damage, nitrate stress, and inflammation in glial cells. Furthermore, we verified that the three compounds NAC, TRO and RSV had the ability to attenuate some damage caused by C26:0 in the cells. Article 3 shows that fibroblasts from asymptomatic patients, both hemizygotes and heterozygotes, when treated with NAC and RSV, released lower levels of DCF compared to untreated fibroblasts. In addition, NAC was able to increase the SOD and CAT enzymes activity in patients fibroblasts, however NAC and RSV were not able to alter nitrate stress in fibroblasts. The results from article 4 show evidence that C26:0, when administered in wild Wistar rats, can cause behavioral changes, such as locomotor impairment, decreased exploratory capacity and reduction of orienting-investigatory responses. Considering our results, we deduce that



C26:0, the main metabolite accumulated in the disease, is related to the damages found in X-ALD, and that future studies addressing its toxicity and effects may be of great importance for the development of a treatment capable of reduce plasmatic and tissue levels in affected patients. Further, we conclude that a study with antioxidants are relevant in an adjuvant treatment for X-ALD, since there is still no satisfactory therapy for this severe inborn error of metabolism.

# 1. INTRODUÇÃO

## **1.1 Erros Inatos do Metabolismo**

Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são distúrbios hereditários caracterizados pela síntese alterada de uma proteína, geralmente uma enzima, com atividade parcial ou totalmente reduzida. Essa alteração resulta no bloqueio de uma rota metabólica com acúmulo de seus substratos e derivados deles, e também diminuição da síntese dos produtos. Individualmente são doenças raras, mas em seu conjunto atingem pelo menos um para cada mil nascimentos (Scriver et al., 2001). Os EIM podem ser classificados de diversas maneiras. Saudubray e Charpentier (2001) estabeleceram três grandes grupos:

- 1) Distúrbios de síntese ou degradação de moléculas complexas: como por exemplo, as doenças de depósito lisossômico e as doenças peroxissomais.
- 2) Doenças com déficit de energia: como as doenças de depósito de glicogênio, defeitos da gliconeogênese, defeitos na oxidação de ácidos graxos e defeitos mitocondriais ou de cadeia respiratória.
- 3) Erros inatos do metabolismo intermediário: onde se incluem as aminoacidopatias, acidemias orgânicas, defeitos do ciclo da ureia e intolerâncias aos açúcares.

## **1.2 Doenças Peroxissomais**

Peroxisomos são organelas com diâmetro de 0,2 a 1  $\mu\text{M}$ , delimitadas por uma membrana única, sem estrutura interna e sem DNA (Oliver e Krisans, 2000). Estão presentes em quase todas as células eucarióticas (com exceção de eritrócitos maduros) e estão envolvidas em uma variedade de processos

metabólicos, incluindo a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, especialmente ácidos graxos de cadeia muito longa (*do inglês Very Long Chain Fatty Acid - VLCFA*), a síntese de fosfolípidios e ácidos biliares em mamíferos. Para que estas rotas metabólicas ocorram, é necessário o transporte de metabólitos para fora ou para dentro do peroxissomo. Diversas famílias de transportadores já foram descritas, como a família ABC (*do inglês ATP-binding cassette*) (Wanders et al., 2006; Islinger et al., 2010) que está envolvida em uma variedade de processos fisiológicos. A disfunção destes transportadores são causas de muitas doenças, incluindo fibrose cística, com alteração no gene ABCD7, e adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (disfunção no gene ABCD1) (Wanders et al., 2006; Islinger et al., 2010; Morita e Imanaka, 2012).

O grupo das doenças peroxissomais representa um número crescente de doenças geneticamente herdadas, em que há uma ou mais funções peroxissomais prejudicadas. São divididas em dois grandes subgrupos (Powers e Moser, 1998; Wanders et al., 2012):

- 1) Defeitos na biogênese do peroxissomo (DBP): neste grupo há má-formação do peroxissomo e, quando estas organelas estão ausentes, todas as vias metabólicas são comprometidas. As doenças que se incluem neste grupo são: síndrome de Zellweger, adrenoleucodistrofia neonatal, forma infantil da doença de Refsum, acidemia hiperpipecólica e forma rizomélica da condrodissplasia punctata tipo I.
- 2) Defeito de uma única enzima peroxissomal: neste caso, a estrutura do peroxissomo está intacta, ocorrendo comprometimento de apenas uma via metabólica, relacionada à proteína deficiente. Dentro deste

grupo, pelo menos dez doenças já foram descritas: adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (defeito no transporte da proteína ALDP), hiperoxalúria tipo I (deficiência de alanina:glioxalato transferase), doença de Refsum (deficiência de fitanoil-CoA hidrolase), forma rizomélica da condrodissplasia punctata tipos II e III (deficiência da diidroxiacetona fosfato aciltransferase e alquil diidroxiacetona fosfato sintase, respectivamente), doenças da  $\beta$ -oxidação (como a deficiência da acil-CoA oxidase, proteína bifuncional e tiolase) e acatalasemia (deficiência de catalase).

### ***1.3 Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X***

Em 1910, Habberfeld e Spieler descreveram o primeiro caso de adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (X-ALD) em um menino, que com seis anos de idade passou a apresentar distúrbios visuais, apatia e incapacidade para caminhar. O paciente perdeu a capacidade de falar aos sete anos de idade, apresentou paraparesia e perda de consciência e foi a óbito oito meses depois do aparecimento dos primeiros sintomas (Moser et al., 2001 e 2005).

A X-ALD é um EIM dos peroxissomos, com incidência de 1:21.000 para homens hemizigotos e 1:14.000 para mulheres heterozigotas (Bezman et al., 2001). A doença se caracteriza pelo acúmulo de VLCFA, principalmente os ácidos hexacosanóico (C26:0) e tetracosanóico (C24:0) em fluidos e tecidos corporais, incluindo a substância branca cerebral, a medula espinhal, as glândulas adrenais e os testículos (Moser et al., 1981 e 2005).

Este EIM é a doença peroxissomal mais frequente, causada por mutações no gene ABCD1, localizado no braço longo do cromossomo X, mapeado como Xq28. Atualmente, já foram identificadas mais de 643 mutações diferentes para este gene, o qual codifica a proteína transmembrana peroxissomal ALDP (pertencente à família ABC). A função desta proteína é transportar VLCFA do citosol para dentro do peroxissomo para serem oxidados (Kemp et al., 2001; Van Roermund et al., 2008).

Apesar da fisiopatologia ainda não estar completamente esclarecida, o dano neurológico na X-ALD parece ser mediado por ativação de astrócitos e indução de citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral  $\alpha$  - TNF $\alpha$ , interleucinas - IL1 $\beta$  e IL6). Estudos em vesículas fosfolipídicas artificiais sugerem que o acúmulo de VLCFA no Sistema Nervoso Central (SNC) pode levar à desestabilização progressiva das bainhas de mielina e subsequente desmielinização (Kemp e Wanders, 2010; McGuinness et al., 1997; Moser et al., 2001; Powers et al., 1992). A desmielinização cerebral interrompe espontaneamente em aproximadamente 10-15% dos pacientes que desenvolvem este processo e nestes casos não ocorre rompimento da Barreira Hematoencefálica (BHE). Entretanto, na maioria das vezes, a desmielinização cerebral inicial se torna rapidamente progressiva e inflamatória, com ruptura da BHE e invasão de células mononucleares, predominantemente macrófagos, com produtos de degradação de mielina em seu interior (Moser et al., 2001).

Nos testículos dos pacientes X-ALD, mais especificamente nas células intersticiais de Leidig, se observa acúmulo de VLCFA (Powers e Schaumburg, 1981). O acúmulo destes ácidos graxos também é tóxico ao córtex adrenal resultando em morte celular apoptótica. A elevação dos níveis plasmáticos do

hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) é a manifestação inicial da disfunção adrenal e a terapia de reposição hormonal melhora satisfatoriamente a insuficiência adrenal apresentada pelos pacientes (Petryk et al., 2012).

A X-ALD pode se manifestar em diferentes faixas etárias, e possui uma ampla variedade fenotípica (Tabelas 1 e 2). Não há correlação entre genótipo e fenótipo, podendo ocorrer vários fenótipos em uma mesma família, abrangendo formas bastante graves e de rápida progressão (que evoluem para morte em poucos anos) até paraparesias de progressão lenta que são compatíveis com a vida. A razão para o desenvolvimento de diferentes formas clínicas poderia ser ambiental, genética ou ambas. Uma das formas mais prevalentes é a cerebral infantil (cALD), sendo que esta forma grave pode ter início entre 2 e 10 anos, apresentando desmielinização progressiva, deficiência cognitiva e neurológica e óbito em 2 a 4 anos após o aparecimento dos primeiros sintomas. As outras formas clínicas mais frequentes são adrenomieloneuropatia (AMN) que tem início entre 21 a 29 anos e é de lenta progressão, a forma heterozigota (HTZ - em mulheres portadoras) e os indivíduos assintomáticos (Moser et al., 1992; Moser et al., 2001).

Aproximadamente 50% das heterozigotas (HTZ) acima de quarenta anos podem desenvolver anormalidades neurológicas leves, como prejuízo no sentido de vibração, hiperreflexia nas pernas, e 20% delas podem desenvolver uma síndrome semelhante ao fenótipo AMN (Engelen et al., 2014; Maier et al., 2002; Moser et al., 2001). Em contraste, a maioria das HTZ com idade inferior a trinta anos são assintomáticas, e o envolvimento adrenal e cerebral são raros (1%).

Um estudo recente com pacientes AMN reportou que a desmielinização nestes pacientes pode ser mais frequente do que se espera, visto que foram estudados 27 pacientes AMN e 63% desenvolveram desmielinização cerebral após o início da mielopatia (de Beer et al., 2014). Os sinais da adrenomieloneuropatia crônica não são específicos, visto que os pacientes relatam distúrbios lentamente progressivos de marcha, paraparesias espásticas e ataxia sensorial. Em homens com AMN, a mielopatia inicia-se geralmente na terceira década de vida, mas em alguns casos pode ser mais precoce (segunda década de vida) ou mais tardia (acima da quinta década de vida) (Kemp et al., 2016). No fenótipo cerebral, lesões na substância branca podem preceder os sintomas e são classificadas em uma escala de 0 (ressonância normal) a 34 (severo comprometimento). Os sintomas associam-se com o local de início das lesões. Os meninos com o fenótipo cALD e em idade escolar apresentam geralmente déficit cognitivo, alterações de comportamento e declínio do desempenho escolar. Entretanto, estes primeiros sintomas geralmente podem se confundir com outros distúrbios, como a hiperatividade, o que pode retardar o diagnóstico da X-ALD (Kemp et al., 2016).

A maioria dos indivíduos do sexo masculino assintomáticos possuem a anormalidade genética e o acúmulo de VLCFA nos tecidos, porém, não apresentam envolvimento neurológico e adrenal; a maioria deles pode progredir para outros fenótipos. Praticamente todos os pacientes com X-ALD que atingem a idade adulta desenvolvem AMN e os sintomas iniciais são limitados à medula espinhal e nervos periféricos (Moser et al., 2001).

De acordo com Moser e col. (2001), foram descritos 7 fenótipos masculinos e 4 femininos para X-ALD, que estão listados nas tabelas 1 e 2 a seguir:

**Tabela 1. Fenótipos clínicos masculinos em X-ALD.**

<b>Fenótipo</b>	<b>Descrição</b>	<b>Frequência relativa</b>
<b>Cerebral infantil (cALD)</b>	Idade inicial: 3-10 anos. Desmielinização progressiva associada à resposta inflamatória cerebral. Rápida e grave progressão, insuficiência adrenal, falecimento em 2-4 anos.	31-35%
<b>Cerebral juvenil</b>	Idade inicial: 11-20 anos. Semelhante a cALD. Insuficiência adrenal.	4-7%
<b>Cerebral adulta</b>	Sintomas cerebrais sem envolvimento de medula espinhal. Insuficiência adrenal.	2-3%
<b>Adrenomieloneuropatia (AMN)</b> <b>AMN puro</b> <b>AMN cerebral</b>	Idade inicial: 20-29 anos. Envolvimento da medula espinhal e nervos periféricos. Lenta progressão. Insuficiência adrenal. “AMN” com envolvimento inflamatório cerebral.	25-30% 10-12%
<b>Olivo-ponto cerebelar</b>	Envolvimento cerebelar (Ataxia cerebelar) (1 caso infantil; 7 adultos).	1-2%
<b>“Addison-only”</b>	Insuficiência adrenal primária. Sem evidência de anormalidade cerebral.	Variável com a idade. Mais de 50% na infância.
<b>Assintomático</b>	Sem evidência de anormalidade neurológica ou adrenal. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) normal.	Diminui com a idade. Comum < 4 anos. Muito raro > 40 anos.

Fonte: Moser et al., (2001).



**Tabela 2. Fenótipos clínicos em mulheres HTZ para X-ALD**

<b>Fenótipo</b>	<b>Descrição</b>	<b>Frequência relativa</b>
<b>Forma assintomática</b>	Sem evidência de anormalidade neurológica ou adrenal	Diminui com a idade. Maioria das mulheres < 30 anos sem envolvimento neurológico
<b>Mieloneuropatia</b> <b>Branda</b> <b>Moderada à severa</b>	AMN mais tardio e brando	Aumenta com o avançar da idade (> 40 anos) 50% 15%
<b>Cerebral</b>	Raramente visto na infância. Pouco mais comum na meia-idade.	2%
<b>Insuficiência Adrenal</b>	Rara	1%

Fonte: Moser et al. (2001).

Através da sintomatologia clínica do paciente e dos exames de neuroimagem, pode-se sugerir o diagnóstico de X-ALD. Bioquimicamente, se detectam níveis anormalmente elevados de VLCFA saturados em fluidos corporais, como soro ou plasma e/ou em tecidos acessíveis, como fibroblastos cultivados, leucócitos, eritrócitos, fígado ou músculo. Pela facilidade de obtenção, a análise de soro ou plasma tem sido a mais utilizada em laboratórios (Moser et al., 2001).

A avaliação de exames de ressonância magnética nuclear (RMN) pode determinar o comprometimento do SNC. Loes e col. (1994) desenvolveram um sistema de pontuação crescente para cada imagem de RMN. Este sistema considera a localização, a extensão dos danos cerebrais, o acometimento neuroanatômico e a presença de atrofia focais ou globais, sendo que zero significa ausência de lesões e trinta e quatro é o escore máximo de lesões e danos cerebrais (Loes et al., 2003).

Para correta interpretação dos resultados das análises bioquímicas, é necessário avaliar a concentração plasmática do ácido hexacosanóico (C26:0),

ácido hexacosanóico (C24:0), bem como verificar as razões C24:0/C22:0 (ácido tetracosanóico/ácido docosanóico) e C26:0/C22:0 (ácido hexacosanóico/ácido docosanóico) (Moser e Moser, 1991a). Apesar das concentrações de VLCFA em pacientes X-ALD serem menos acentuadas do que em outras doenças peroxissomais, na maioria das vezes (acima de 90%) todos os três parâmetros estão mais do que dois desvios padrões acima dos valores médios dos controles (Wanders et al., 1995).

Na determinação dos ácidos graxos, resultados falso-negativos podem ocorrer em 15-20% para HTZ. Segundo Moser et al. 2001, 80% das HTZ apresentam níveis anormais de VLCFA plasmático, ao analisar os níveis em fibroblastos a percentagem sobe para 95%, o que indica que a detecção de HTZ pode ser mais sensível se este tecido é analisado (Wanders et al., 1993). Entretanto, a identificação precisa da mulher portadora se dá através da análise da mutação do gene (Maier et al., 2002).

A tabela 3 apresenta os valores de concentrações em  $\mu\text{mol/L}$  dos VLCFA em plasma de pacientes com X-ALD, HTZ para X-ALD e de uma população normal.

**Tabela 3. Valores referenciais das concentrações plasmáticas do C26:0 e das razões (C26:0/C22:0 e C24:0/C22:0) em  $\mu\text{mol/L}$  para indivíduos normais (controles), HTZ e pacientes X-ALD.**

<b>Indivíduos (n=30)</b>	<b>C<sub>26:0</sub></b>	<b>C<sub>24:0</sub>/C<sub>22:0</sub></b>	<b>C<sub>26:0</sub>/C<sub>22:0</sub></b>
<b>Controles</b>			
Média	0,11-0,96	0,78- 1,09	0,008-0,03
<b>HTZ (♀)</b>			
Média	1,41-2,33	0,90-1,13	0,04-0,10

<b>X-ALD (♂)</b> Média	1,36-4,94	1,31-1,92	0,04-0,29
---------------------------	-----------	-----------	-----------

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

O modelo animal para a X-ALD consiste em camundongos *knockout* para o gene ABCD1. Os animais desenvolvem uma disfunção da medula espinhal que mimetiza pacientes com o fenótipo AMN, com início tardio (aos 20 meses de idade) (Fourcade et al., 2008). Sendo assim, o camundongo X-ALD apresenta reduzida  $\beta$ -oxidação de VLCFAs, resultando em níveis elevados de VLCFAs saturados nos tecidos, glândulas supra-renais e fluidos corporais. O teste geralmente usado para avaliar a função motora de ratos *knockout* é a motilidade em campo aberto, onde as atividades locomotoras e exploratórias são avaliadas de uma maneira geral (Pujol et al., 2002). É importante salientar que o desenvolvimento de um modelo animal facilita a compreensão da fisiopatologia da doença, ajuda a elucidar sua genética, sua complexidade fenotípica e contribui para a avaliação de estratégias terapêuticas (Lu et al., 1997).

### 1.3.1 Tratamento da X-ALD

O tratamento para X-ALD é ainda considerado experimental, não havendo nenhuma terapia satisfatória. Uma gama de opções de tratamento, incluindo modificação da dieta, uso de drogas e transplante da medula óssea, tem sido utilizadas com o intuito de atingir os principais objetivos de um tratamento bem sucedido, os quais são: estabilização da insuficiência adrenal,

diminuição da concentração de VLCFA no plasma e tecidos e diminuição do processo de desmielinização no cérebro (Moser et al., 2001; Turk et al., 2017).

Caso a insuficiência adrenal não seja tratada, as concentrações baixas de cortisol podem ser letais. Quando os níveis são considerados insuficientes, o paciente deve ser submetido a uma terapia de reposição que consiste na administração de glicocorticoide ou mineralocorticoide. Este tratamento melhora a qualidade de vida do paciente por melhorar a insuficiência adrenal, mas não altera a progressão neurológica da X-ALD (Moser et al., 2001; Van Geel et al., 1997).

Foi demonstrado que o ácido oléico (C18:1), um ácido graxo monoinsaturado, inibia competitivamente o sistema de alongação dos VLCFA interferindo, assim, na biossíntese destes ácidos graxos (Rizzo et al., 1986). Foram observados alguns efeitos positivos ao se associar dieta de restrição de gordura com administração de ácidos graxos monoinsaturados (ácido oléico) em combinação com glicerol trioleato (GTO). Esta terapêutica diminuiu os níveis de C26:0 no plasma em torno de 50% em 4 meses, mas eles ainda eram duas vezes superiores aos normais (Moser et al., 1991b).

Rizzo e col. (1987) demonstraram que a administração de GTO juntamente com glicerol trierucato (GTE) diminui acentuadamente os VLCFA no plasma. A mistura 4:1 de GTO e GTE, chamada de “Óleo de Lorenzo” (OL), normalizou os níveis de C26:0 no plasma da maioria dos pacientes em quatro semanas de tratamento. Sendo assim, a terapêutica proposta para a X-ALD consistiu na administração da mistura OL associada com uma dieta pobre em VLCFA, que produz a diminuição desses ácidos graxos nos tecidos. Todavia, somente em indivíduos assintomáticos esse tratamento previne a

sintomatologia progressiva da doença (Deon et al., 2008). Para pacientes com o fenótipo cerebral infantil, o transplante de medula óssea é a terapia mais efetiva nos casos em que a forma cerebral for detectada nos estágios iniciais da doença, sendo o único método que melhora a desmielinização cerebral (Moser et al., 2001).

Como ainda não estão completamente elucidados os efeitos benéficos do transplante de medula óssea, acredita-se que os seguintes mecanismos estejam envolvidos:

- a) suprimento de enzimas normais ao cérebro através de células derivadas do transplante (microglia);
- b) imunossupressão associada com o transplante;
- c) transferência de um gene modificador favorável.

Sendo assim, a razão para implementação desse tratamento na X-ALD está no fato de que a medula óssea contém células precursoras da microglia e essas células provenientes do doador migrariam para o SNC do afetado, onde seriam capazes de metabolizar os VLCFA acumulados. Ainda, acredita-se que o mecanismo esteja relacionado à interrupção do processo inflamatório no SNC associado ao dano à mielina. Devido ao seu alto risco e à necessidade de se ter um doador imunologicamente compatível, a indicação do transplante deve ser cuidadosamente analisada (Mahmood et al., 2005; Moser et al., 2001; Peters et al., 2004).

A resposta inflamatória, mediada tanto por citocinas inflamatórias quanto por mecanismos imunes parece ter grande importância na patogênese das lesões desmielinizantes (Moser et al., 2001). Dessa forma, acredita-se que a rápida progressão dessas lesões em pacientes X-ALD pode estar relacionada à

resposta inflamatória no cérebro. Considerando o exposto, a redução da resposta inflamatória possivelmente pode ser considerada uma estratégia terapêutica para esta doença (Stumpf et al., 1981).

#### **1.4 Radicais livres e Estresse Oxidativo**

Radical livre (RL) é um estrutura química com um elétron desemparelhado no seu último orbital, ou seja, ocupando um orbital atômico sozinho, o que confere uma alta reatividade à molécula (capacidade de se combinar inespecificamente com proteínas, lipídios e DNA). A formação de RL pode decorrer de processos metabólicos normais, como a auto-oxidação de formas reduzidas de carreadores de elétrons, flavinas reduzidas, citocromo P-450, reações inflamatórias, entre outros. Do mesmo modo, fatores ambientais como irradiação (luz ultra-violeta, raios X) e poluentes na atmosfera (ozônio, dióxido de carbono e fumaça de cigarro) podem levar a um aumento da atividade dos sistemas geradores de RL (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são compostos derivados do oxigênio que não são propriamente radicalares, mas que produzem radical livre, exemplos: radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) ou peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), sendo que este último é chamado de espécie reativa e não radical, por não possuir um elétron desemparelhado (Boveris, 1998; Halliwell e Gutteridge, 2007). Além das ERO, existem as espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), que é um RL gerado pela enzima óxido nítrico sintase nos sistemas biológicos (Giulivi et al., 1998). Este radical, por si só, é um fraco oxidante, entretanto se reagir com  $O_2^{\cdot-}$  forma o peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ),

o qual é um potente oxidante capaz de oxidar tióis, lipídios e resíduos de metionina (Pryor et al., 1994).

Para evitar os danos celulares ocasionados pela formação de RL, os sistemas biológicos desenvolveram defesas antioxidantes capazes de converter estas espécies reativas em derivados inativos (Halliwell, 1994). Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, significativamente retardam ou previnem a oxidação desse substrato (Halliwell e Gutteridge, 2007). Os antioxidantes podem ser enzimáticos ou não-enzimáticos.

Dentre os antioxidantes enzimáticos, incluem-se catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx) (Halliwell, 1994; Matés et al., 1999). A CAT controla os níveis de  $H_2O_2$ , transformando duas moléculas de  $H_2O_2$  em água e oxigênio. A SOD é uma enzima presente em todos os organismos aeróbios, que catalisa a dismutação de dois radicais  $O_2^{\cdot-}$ , formando  $H_2O_2$  e oxigênio. 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. São descritos três tipos principais da enzima (Halliwell e Gutteridge, 2007):

- 1) SOD1 ou CuZn-SOD (contêm cobre e zinco no sítio ativo): são encontradas no citoplasma e nos fluídos celulares;
- 2) SOD2 ou Mn-SOD (contêm manganês no sítio ativo): presentes na matriz mitocondrial;

3) SOD3 ou ECSOD: contém cobre e zinco e possui um peptídeo sinalizador que a direciona exclusivamente para o espaço extracelular.

GPx é a enzima que catalisa a decomposição de hidroperóxidos, utilizando a glutathiona reduzida (GSH) como co-substrato. A redução de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos se dá através da GSH para formar glutathiona oxidada (GSSG) e o produto de redução dos hidroperóxidos (água ou álcoois) (Travacio e Llesuy, 1996). A GPx é encontrada em todos os tecidos animais, apresentando alta atividade no fígado e nos eritrócitos e 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, 2007; Matés et al., 1999).

Há também os antioxidantes não enzimáticos, que compreendem as proteínas ligantes de metal (transferrina, ferritina, etc), as vitaminas (E, A, C, etc), GSH, albumina, entre outras (Halliwell, 1994; Halliwell e Gutteridge, 2007). O sistema da GSH fornece a principal defesa celular contra o dano oxidativo, e o equilíbrio redox é assegurado pelas proporções entre as formas reduzidas e oxidadas, portanto, uma diminuição da GSH ou um aumento da GSSG reflete uma perturbação oxidativa no ambiente celular (Schafer et al., 2001). 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, sequestro/inibição da formação das espécies reativas ou precursores (Halliwell, 1994). Outros mecanismos de atuação são: quelação de íons metálicos por meio de proteínas transportadoras (ferritina e transferrina), reparo do DNA e degradação de proteínas lesadas (Halliwell e Gutteridge, 2007).



Em condições fisiológicas, o nosso organismo está em equilíbrio entre a produção e degradação de RL, que existem em baixas concentrações em todos os tecidos biológicos (Wulf, 2001). O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a capacidade antioxidante e as espécies reativas formadas, em favor destas últimas, podendo ocorrer quando há uma diminuição nas defesas antioxidantes e/ou um aumento na concentração intracelular de espécies reativas. Perante o estresse oxidativo, o organismo pode reagir de duas formas: adaptando-se ou sofrendo injúria celular.

As principais consequências do estresse oxidativo são: peroxidação das membranas celulares, oxidação de proteínas e lesão ao DNA/RNA celular, podendo causar mutações (Halliwell e Gutteridge, 2007). A peroxidação lipídica é um processo fisiológico contínuo que ocorre nas membranas celulares decorrente da ação dos RLs. Os principais efeitos da peroxidação sobre a membrana são: alteração da fluidez, aumento da permeabilidade, alteração da seletividade e das trocas iônicas, o que pode levar à morte celular. Este processo pode ser dividido em três etapas (Halliwell e Gutteridge, 2007):

- 1) Reações de iniciação: um RL é formado a partir de um composto estável não radicalar;
- 2) Reações de propagação: um RL reage com uma molécula estável, formando um outro RL;
- 3) Reações de terminação: dois RLs reagem entre si e formam um produto estável.

Estudos demonstram que o estresse oxidativo participa da fisiopatologia de alguns EIM, como doenças lisossômicas de depósito, acidúrias orgânicas, e doenças peroxissomais (Donida et al., 2017; Mescka et al., 2016; Deon et al.,

2016). O dano gerado pelos RLs desempenha um papel importante em doenças neurodegenerativas, uma vez que o cérebro é um órgão extremamente suscetível à ação destes compostos, devido ao seu baixo conteúdo de defesas antioxidantes, ao alto conteúdo de lipídios poliinsaturados, ao alto consumo de oxigênio por unidade de massa de tecido e ao alto conteúdo de ferro em algumas áreas particulares (Halliwell e Gutteridge, 2007).

### ***1.5 Estresse Oxidativo na X-ALD e estudos com antioxidantes***

O estresse oxidativo em pacientes X-ALD vem sendo tema de estudos e revisões. A peroxidação lipídica, que é capaz de induzir alterações de integridade, fluidez, permeabilidade e perda funcional de biomembranas, foi verificada, independentemente do fenótipo dos pacientes X-ALD, tanto pelo aumento da produção de malondialdeído (MDA) (produto final da peroxidação lipídica) quanto pela formação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) (Deon et al., 2007; Marchetti et al., 2015; Rockenbach et al., 2012; Vargas et al., 2004).

A diminuição dos níveis plasmáticos de GSH, Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) e ácido docosahexacosanóico, bem como o aumento dos níveis de produtos de peroxidação lipídica (oxisteróis) trazem novas evidências de que o estresse oxidativo possa estar envolvido na fisiopatologia da X-ALD. Entre os produtos de peroxidação lipídica, Nury e col (2017) relataram que o 7-cetocolesterol foi capaz de promover oxidação, inflamação e morte celular nas células da microglia e capaz de causar modificações peroxissômicas generalizadas. Os

autores concluíram que 7-cetocolesterol exerce um papel importante na fisiopatologia da X-ALD.

A reatividade antioxidante total, método que avalia a rapidez com que o tecido combate um aumento das espécies reativas, mostrou-se diminuída em plasma de pacientes X-ALD sintomáticos e HTZ. Adicionalmente, o status antioxidante total (que representa a quantidade de antioxidantes não-enzimáticos teciduais) apresentou-se significativamente diminuído em pacientes com fenótipo cALD e AMN (Deon et al., 2007; Deon et al., 2008; Vargas et al., 2004).

Os marcadores de oxidação proteica mais específicos são representados pelo semialdeído glutâmico (GSA) e semialdeído aminoadípico (AASA) (Boyd-Kimball et al., 2005; Daneshvar et al., 1997). Além disso, sabe-se que compostos carbonil derivados da oxidação de carboidratos e lipídios podem reagir com proteínas, levando à formação de produtos de glicação avançada e produtos finais de lipoperoxidação, como malondialdeído-lisina (MDAL), carboximetil-lisina (CML) e carboxietil-lisina (CEL). Fourcade e col. (2008) verificaram, através de técnicas bastante sensíveis, um aumento de GSA, AASA, MDAL, CML e CEL em fibroblastos de pacientes X-ALD.

Os conteúdos de tióis e carbonilas também são considerados biomarcadores de dano proteico, e, neste sentido, estudos verificaram uma redução de tióis no plasma de pacientes cALD e AMN, assim como um aumento de carbonilas plasmáticas (Petrillo et al., 2013; Rockenbach et al., 2012). Adicionalmente, Rockenbach e col. (2012) encontraram uma correlação negativa entre o conteúdo de tióis e C26:0 em plasma de pacientes X-ALD,

sugerindo que o acúmulo do C26:0 e o estresse oxidativo estejam relacionados com a patogênese deste EIM.

O estresse no retículo endoplasmático em células mielinizantes contribui para a patogênese de vários distúrbios mielínicos, incluindo a Esclerose Múltipla. Van de Beek et al 2017 demonstraram que fibroblastos de pacientes X-ALD expostos à C26:0 metilado aumentaram a expressão de marcadores de estresse no retículo endoplasmático (como as proteínas EDEM1, GADD34 e CHOP) e resultaram em lipoapoptose. Os autores concluíram que o estudo sobre a toxicidade induzida por VLCFA é de grande importância para o desenvolvimento de um tratamento modificador da doença visando à normalização dos níveis de VLCFA nos tecidos.

No que concerne ao tratamento para X-ALD, Rockenbach e col. (2012) verificaram uma redução da peroxidação lipídica e aumento do conteúdo de sulfidrilas em pacientes X-ALD após o transplante de medula óssea (TMO), bem como uma redução da concentração plasmática de C26:0. Este estudo, portanto, reforça a ideia de que o TMO, quando bem sucedido e sob recomendação, deve ser considerado uma possível estratégia terapêutica para pacientes X-ALD e que o acúmulo de C26:0 esteja relacionado ao dano oxidativo nesta doença.

Visto que os tratamentos atualmente preconizados não são totalmente satisfatórios e também não estão direcionados para os aspectos neuroinflamatórios da X-ALD, há necessidade emergente de outras estratégias terapêuticas. Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* vêm investigando o papel dos antioxidantes em doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

Tolar e col. (2007) mostraram que o antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC), quando administrado antes e após o TMO, foi capaz de estabilizar os estados neurológicos e achados radiográficos cerebrais de três meninos cALD em estágio avançado. Eles concluíram que a NAC merece maior investigação como estratégia terapêutica para pacientes com cALD avançada, pois tem potencial de mudar a condição de doença letal para uma condição que pode ser corrigida através do TMO associado à terapêutica antioxidante. No mesmo contexto, Kartha e colaboradores em 2015 estudaram o mecanismo de ação da NAC em pacientes cALD submetidos ao TMO. Imunoensaios foram realizados para determinar mudanças na expressão da enzima heme oxigenase-1 (HO-1) e ferritina em amostras de plasma coletadas de meninos com cALD em três momentos diferentes durante o curso do transplante. Após terapia intravenosa com NAC, os autores observaram um aumento na expressão da HO-1 e ferritina nos plasmas dos pacientes.

Em um modelo in vitro para X-ALD, a NAC mostrou-se capaz de inibir a formação de radicais livres, como radical superóxido, em células gliais enriquecidas com C26:0 (Di Biase et al., 2005). Trolox (TRO – análogo hidrossolúvel da vitamina E) reverteu, in vitro, lesões oxidativas em fibroblastos de pacientes X-ALD (Fourcade et al., 2008).

Além disso, TRO, NAC ou ácido lipóico (AL), individualmente, normalizaram, in vitro, a geração de EROs dependente de C26:0, e, em conjunto e em baixas doses, apresentaram um efeito sinérgico em prevenir a acumulação de EROs, e em reverter o estresse oxidativo, a falha energética, a degeneração axonal e o prejuízo locomotor em ratos nocaute para ABCD1 (López-Erauskin et al., 2011). Galino e col. (2011), utilizando também um

modelo animal nocaute verificaram que a NAC e o AL tiveram a capacidade de prevenir a oxidação proteica, preservar os níveis de NADH, NADPH, ATP e GSH e normalizar a atividade da enzima piruvato quinase.

Rosuvastatina (RSV) mostrou possuir efeitos antioxidantes, habilidades para prevenir o dano ao DNA e o mecanismo relacionado a estas ações parece envolver a indução de expressão de enzimas de defesa antioxidante em células promielocíticas humanas (Schupp et al., 2008). Adicionalmente, pesquisas vêm demonstrando os efeitos antitrombóticos e anti-inflamatórios da RSV (Athiros et al., 2009; Blum e Shamburek, 2009) assim como sua efetiva capacidade de reduzir os níveis de MDA e 8-hidroxideoxiguanosina urinária, em pacientes com nefropatia diabética (Abe et al., 2011).

Algumas ERO podem causar injúrias no DNA de maneira indireta, por exemplo,  $O_2^{\cdot -}$  e  $H_2O_2$ , que provocam dano ao DNA pela interação com metais de transição, em particular cobre e ferro, na reação da Haber-Weiss, formando o  $OH^{\cdot}$  (Halliwell e Gutteridge, 2007). Com a evolução, nossas células desenvolveram mecanismos de reparo para proteger o DNA, entretanto, se estes mecanismos falharem, sérias consequências poderão ocorrer, como mutações, deleções, neoplasias e até morte celular (Cooke et al., 2006; Moraes et al., 2012).

Marchetti e col. (2015) observaram que pacientes X-ALD sintomáticos apresentavam dano ao DNA em leucócitos e que os antioxidantes NAC, RSV e TRO tiveram a capacidade de reduzir, in vitro, este dano a níveis de controles saudáveis. Ainda, foram observadas fortes correlações positivas entre o dano ao DNA e parâmetros de peroxidação lipídica, indicando que o dano ao DNA seja de origem oxidativa.

## **1.6 Inflamação na X-ALD**

Os processos dinâmicos e multicelulares da neuroinflamação são mediados pelas células não neuronais do SNC, que incluem os astrócitos e os macrófagos residentes no cérebro, a microglia. Embora o início de uma resposta inflamatória possa ser benéfico e fisiológico em decorrência de uma lesão do sistema nervoso, a neuroinflamação crônica ou mal-adaptativa pode ter resultados prejudiciais em muitas doenças neurológicas. O exato mecanismo que causa a reação inflamatória levando à perda de mielina na forma cerebral da X-ALD ainda é desconhecido, entretanto sabe-se que os VLCFA induzem apoptose em oligodendrócitos, causando ativação da microglia e levando à secreção de citocinas (Moser 2006, Kemp e Wanders, 2010). Citocinas são moléculas secretadas por células periféricas do sistema imune, pela microglia, por astrócitos e por neurônios no SNC. A inflamação periférica ou central é caracterizada por uma regulação positiva de citocinas e seus receptores no cérebro (Galic et al., 2012).

Existem muitas classes de citocinas, incluindo numerosas interleucinas (IL), linfocinas, quimiocinas, hematopietinas, interferons (IFN), bem como membros do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador (TGF) e fator de necrose tumoral (TNF) (Tayal et al., 2008; Galic et al., 2012). Estudos sugerem que o TNF-alfa (TNF- $\alpha$ ) possa ter um importante papel como resposta primária na X-ALD. Powers et al. (1992) relataram que, em lesões inflamatórias agudas de pacientes com X-ALD com comprometimento cerebral, os astrócitos são mais imunorreativos ao TNF- $\alpha$ . O TNF- $\alpha$  é um importante mediador da inflamação capaz de danificar

seletivamente oligodendrócitos e a bainha de mielina (Powers et al., 1992; Selmaj et al., 1988).

Existem muitos subtipos distintos de células auxiliares CD4<sup>+</sup> T (Th). Th1 e Th2 são identificáveis porque cada uma produz um conjunto diferente de citocinas. Algumas citocinas associadas a Th1 são IL-2, IL-6, IL-12 e IFN-gama (IFN- $\gamma$ ) e as citocinas associadas a Th2 são IL-4 e IL-10. O TNF- $\alpha$  e a IL-1beta (IL-1 $\beta$ ) são citocinas tipicamente produzidas por macrófagos (Abbas e Lichtman, 2003).

Cabe salientar que poucos estudos abordam inflamação nas diversas formas clínicas da X-ALD. Com o objetivo de compreender o papel dos mediadores inflamatórios na X-ALD, Paintlia et al., (2003) determinaram a expressão de citocinas inflamatórias/quimiocinas no cérebro de pacientes cALD. A expressão de mRNA de IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-6, TNF- $\alpha$  e GM-CSF na área inflamatória foi significativamente aumentada em comparação aos controles (Paintlia et al., 2003).

Segundo Di Biase e colaboradores (2001), os pacientes com X-ALD pareciam ter uma resposta Th1 predominante. A IL-12 (ativadora da resposta Th1) é secretada por várias células apresentadoras de antígenos e foi detectada em células da glia e no tecido da medula espinhal. A produção subsequente de IL-2 poderia levar à infiltração de macrófagos no SNC. Entretanto, as distinções das citocinas pró e anti-inflamatórias não devem ser rigidamente atribuídas a citocinas específicas, pois os efeitos de uma molécula sinalizadora podem diferir, dependendo de sua localização no SNC e no contexto da doença (Lyman et al., 2014).



Alguns estudos na literatura tem sugerido que a produção de citocinas inflamatórias pode desempenhar um papel nas variações fenotípicas da X-ALD. Neste contexto, McGuinness et al., (1995) procuraram determinar se o TNF- $\alpha$  é um componente primário nas lesões inflamatórias da X-ALD. Estes autores verificaram que a bioatividade e a atividade específica do TNF- $\alpha$  foram aumentadas em amostras de soro de pacientes com fenótipo cerebral quando comparados aos pacientes com AMN, pacientes assintomáticos e controles.

Marchetti et al., (2018a) mostraram que pacientes X-ALD assintomáticos e AMN apresentaram níveis aumentados de citocinas pró e anti-inflamatórias em comparação ao grupo controle saudável. Os autores hipotetizaram que a inflamação na X-ALD está relacionada à concentração plasmática de VLCFA, uma vez que houve correlações positivas entre níveis plasmáticos de C26:0 e citocinas pró-inflamatórias em pacientes assintomáticos e AMN e correlação negativa entre citocina anti-inflamatória e a razão C24:0/C22:0 em pacientes com o fenótipo AMN. Além disso, Marchetti et al., (2018b) demonstraram que células gliais enriquecidas com C26:0 liberaram maiores quantidades de IL-1 $\beta$  em comparação com as células nativas, e que os antioxidantes NAC, TRO e RSV foram capazes de reduzir os níveis da citocina se equiparando aos controles.

Ainda que a fisiopatologia da X-ALD não esteja muito bem esclarecida, os dados apresentados acima são indicativos de que o estresse oxidativo/nitrativo e a inflamação estejam envolvidos na X-ALD, sugerindo que os mesmos possam explicar, ao menos em parte, o comprometimento neurológico dos pacientes nesta doença. Além disso, uma terapia adjuvante com antioxidantes e/ou antiinflamatórios parece ser promissora, considerando

que ainda não há nenhum tratamento satisfatório para esta grave doença metabólica.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar parâmetros oxidativos, nitrativos, inflamatórios e alterações comportamentais induzidas por ácido hexacosanóico na X-ALD, e o efeito dos antioxidantes NAC, TRO e RSV.

### **2.2 Objetivos específicos**

a) Capítulo I: Avaliar o perfil plasmático pró-inflamatório e anti-inflamatório de pacientes com os seguintes fenótipos para X-ALD: assintomático, cerebral infantil e adrenomieloneuropatia.

b) Capítulo II: Analisar o efeito in vitro de NAC, RSV e TRO em células gliais enriquecidas com C26:0 sobre:

- dano oxidativo ao DNA,
- defesas antioxidantes,
- estresse nitrativo,
- peroxidação lipídica,
- inflamação

c) Capítulo III: Avaliar o efeito de NAC e RSV em fibroblastos de pacientes assintomáticos (HTZ e hemizigotos) sobre:

- liberação de espécies reativas
- defesas antioxidantes
- estresse nitrativo

d) Capítulo IV: Avaliar o efeito da administração de C26:0 em ratos Wistar selvagens sob parâmetros comportamentais relativos a respostas investigatórias, orientadoras, locomotoras e ansiolíticas:

- número de *crossings*
- tempo de latência
- número de *rearings*
- número de *groomings*


### **3. RESULTADOS**

Os resultados desta tese de doutorado serão apresentados na forma de capítulos, referentes a artigos científicos.

*3.1 Capítulo I- Artigo 1: Inflammatory profile in X-linked adrenoleukodystrophy patients: Understanding disease progression*

Este artigo científico foi publicado no periódico *Journal of Cellular Biochemistry*

# Inflammatory profile in X-linked adrenoleukodystrophy patients: Understanding disease progression

Desirée Padilha Marchetti<sup>1</sup>  | Bruna Donida<sup>1</sup> | Carlos Eduardo Jacques<sup>1</sup> |  
Marion Deon<sup>2,3,4</sup> | Tatiane Cristina Hauschild<sup>2</sup> | Patricia Koehler-Santos<sup>5</sup> |  
Daniella de Moura Coelho<sup>3,4</sup> | Adriana Simon Coitinho<sup>6</sup> | Laura Bannach Jardim<sup>3,4</sup> |  
Carmen Regla Vargas<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>3</sup> Serviço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>4</sup> Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>5</sup> Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP), Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>6</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia, UFRGS, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

## Correspondence

Carmen Regla Vargas, Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90.035-003, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.  
Email: crvargas@hcpa.edu.br

## Funding information

Brazilian Foundation Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Conselho Nacional de

## Abstract

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is an inherited disease characterized by progressive inflammatory demyelization in the brain, adrenal insufficiency, and an abnormal accumulation of very long chain fatty acids (VLCFA) in tissue and body fluids. Considering that inflammation might be involved in pathophysiology of X-ALD, we aimed to investigate pro- and anti-inflammatory cytokines in plasma from three different male phenotypes (CCER, AMN, and asymptomatic individuals). Our results showed that asymptomatic patients presented increased levels of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, and TNF- $\alpha$  and the last one was also higher in AMN phenotype. Besides, asymptomatic patients presented higher levels of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10. AMN patients presented higher levels of IL-2, IL-5, and IL-4. We might hypothesize that inflammation in X-ALD is related to plasmatic VLCFA concentration, since there were positive correlations between C26:0 plasmatic levels and pro-inflammatory cytokines in asymptomatic and AMN patients and negative correlation between anti-inflammatory cytokine and C24:0/C22:0 ratio in AMN patients. The present work yields experimental evidence that there is an inflammatory imbalance associated Th1, (IL-2, IL-6, and IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4 and IL-10), and macrophages response (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) in the periphery of asymptomatic and AMN patients, and there is correlation between VLCFA plasmatic levels and inflammatory mediators in X-ALD. Furthermore, we might also speculate that the increase of plasmatic cytokines in asymptomatic patients could be considered an early biomarker of brain damage and maybe also a predictor of disease progression.

**Abbreviations:** ABC, adenosine triphosphate-binding cassette; ALDP, adrenoleukodystrophy protein; AMN, adrenomyeloneuropathy; APCs, antigen-presenting cells; Asympt, asymptomatic; BBB, blood-brain barrier; C22:0, docosanoic acid; C24:0, tetracosanoic acid; C26:0, hexacosanoic acid; C27:0, heptacosanoic acid; CCER, childhood cerebral form; CNS, central nervous system; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; HTZ, heterozygotes; ICAMs, intercellular adhesion molecules; IFN, interferon; IFN- $\gamma$ , IFN-gamma; IL, interleukin; IL-1 $\alpha$ , interleukin-1alpha; IL-1 $\beta$ , interleukin-1beta; LPS, lipopolysaccharide; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PDGF, platelet-derived growth factor; PHA, phytohemagglutinin; TGF, transforming growth factor; Th, T helper cells; TNF, tumor necrosis factor; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha; VLCFA, very long chain fatty acid; X-ALD, X-linked adrenoleukodystrophy.

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA)

**KEYWORDS**

asymptomatic patients, cytokines, inflammation, very long chain fatty acids, X-linked adrenoleukodystrophy

## 1 | INTRODUCTION

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is an inborn error of peroxisome metabolism with an estimated overall frequency of 1:21 000 for hemizygotes men and of 1:14 000 for heterozygotes women.<sup>1</sup> The minimum incidence in the state of Rio Grande do Sul, Brazil is 1:35 000 newborns.<sup>2</sup> The disease is caused by mutations in the gene *ABCD1*, a member of the adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) transporter family, which encodes ABCD1 protein (formerly adrenoleukodystrophy protein [ALDP]). This protein is responsible for transporting very long chain fatty acids (VLCFA) into the peroxisomes for  $\beta$ -oxidation.<sup>3–6</sup> To date, more than 1750 different mutations in *ABCD1* have been identified in patients with X-ALD ([www.x-ald.nl](http://www.x-ald.nl)).

This genetic disorder is characterized by progressive inflammatory demyelization in the brain of cerebral form, adrenal insufficiency, and VLCFA accumulation, mainly hexacosanoic acid (C26:0) and tetracosanoic acid (C24:0) in tissues and body fluids.<sup>4</sup> The exact mechanisms underlying the brain damage in X-ALD are poorly elucidated, but it is understood that in childhood X-ALD, the VLCFA accumulation subsequently leads to a neuroinflammatory response with the expression of cytokines and intercellular adhesion molecules by astrocytes/microglial cells.<sup>7–9</sup>

No correlation has been demonstrated between phenotype and the *ABCD1* mutation. Moreover, different phenotypes often occur in the same family. Currently, there are seven distinct clinical phenotypes described in males (childhood cerebral form [CCER], juvenile cerebral form, adult cerebral form, adrenomyeloneuropathy [AMN], isolated Addison disease, olivo-ponto-cerebellar, and asymptomatic patients) and five in heterozygotes females (asymptomatic, mild myelopathy, moderate-to-severe myeloneuropathy, cerebral involvement, and clinically evident adrenal insufficiency).<sup>4</sup> Habekost et al<sup>10,11</sup> have described myelopathy and myeloneuropathy in heterozygote females since their mid 20–40s. Most of asymptomatic male individuals have genetic abnormality and VLCFA accumulation in tissues; however, they do not present neurological and adrenal involvement; most of them may progress to other phenotypes.<sup>4</sup> Practically all patients with X-ALD who reach adulthood develop AMN and the initial symptoms are limited to the spinal cord and peripheral nerves. They develop gradually progressive spastic paraparesis, sensory ataxia with impaired vibration sense,

sphincter dysfunction (mostly urinary), pain in the legs, and impotence.<sup>12</sup> All the cerebral X-ALD forms are inflammatory forms, associated with a rapidly progressive inflammatory myelinopathy, that usually begins in the parietooccipital regions<sup>13,14</sup> and may involve autoimmune mechanisms.<sup>14</sup>

The prominent inflammatory component of X-ALD raises the question whether the destruction of myelin could be mediated in part by an immunopathological process. Microglia and macrophages, one a brain resident and the other hematogenously derived, represent two related myeloid cells involved in the pathology of cerebral X-ALD. Both of them are primary sensors of brain pathology, rapidly recruited to the sites of inflammation where they act as competent presenters of antigen and interact with recruited T cells.<sup>15</sup>

Cytokines are signaling proteins secreted primarily by cells of the immune system, including monocytes, macrophages (eg, Kupffer cells, microglia), lymphocytes (B and T cells), and vascular endothelial cells. There are many classes of cytokines including numerous interleukins (IL), lymphokines, chemokines, hematopoietins, interferons (IFN), as well as members of the platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor (TGF), and tumor necrosis factor (TNF) families.<sup>16,17</sup> It has been suggested that TNF- $\alpha$  might have a role as a primary responder in the inflammatory form of X-ALD. Powers et al<sup>7</sup> have reported that, in acute inflammatory lesions of X-ALD patients with cerebral involvement, reactive astrocytes are most immunoreactive for TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  is an important mediator of inflammation capable of selectively damaging oligodendrocytes and myelin sheaths in vitro.<sup>7,18</sup>

There are two distinct subtypes of CD4+ T helper cells (Th), Th1 and Th2, at least, that are identifiable because each produces a different set of cytokines. Th1-associated cytokines are IL-2, IL-6, IL-12, and IFN- $\gamma$  and Th2-associated cytokines are IL-4 and IL-10. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  are cytokines typically produced by macrophages.<sup>19</sup> According to Di Bias et al,<sup>20</sup> X-ALD patients appeared to have a predominant Th1 response. An activator of the Th1 response, IL-12, is secreted by various antigen-presenting cells (APCs) and has been detected in glial cells and spinal cord tissue. The subsequent production of IL-2 may lead to the infiltration of macrophages into the central nervous system. However, pro- and anti-inflammatory distinctions should not be rigidly attributed to specific cytokines in all cases of normal physiology and disease pathology as the effects of a signaling



molecule may differ, depending on its location within the central nervous system (CNS) and in the context of disease.<sup>21</sup>

Cytokine blood levels are normally low, but they can markedly increase in response to pathogens, inflammation, or tissue injury, as well as in a variety of disease processes.<sup>17</sup> Considering that inflammation might be involved in disease worsened progression and in the pathophysiology of X-ALD, we sought to investigate a panel of 10 pro- and anti-inflammatory cytokines in plasma of three different male phenotypes: CCER, AMN, and asymptomatic individuals.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Subjects

Blood (plasma) taken from 24 patients with different clinical forms of X-ALD (eight CCER, eight AMN, and eight

asymptomatic) were included in this study. The patients ages varied between 8 years and 15 years ( $11.12 \pm 2.41$ ) for CCER patients, 16 years and 55 years ( $29.75 \pm 12.07$ ) for AMN, and 1 years and 12 years ( $5.25 \pm 4.09$ ) for asymptomatic patients. Patients had their diagnosis confirmed in our laboratory by plasma VLCFA determination. Mutation analysis was done as previously described by Pereira et al.<sup>22</sup> VLCFA plasma levels from X-ALD patients under study and their ages are depicted in Table 1. Table 2 demonstrates the plasma VLCFA reference values obtained in Metabolites Analysis Laboratory in Medical Genetic Service from Hospital de Clínicas de Porto Alegre. It is important to highlight that we have followed three asymptomatic patients (5, 7, and 8 of Table 1) until their evolution to cerebral phenotype and we obtained plasma aliquots from them at the asymptomatic phenotype time until the symptoms onset and cerebral impairment. Eight healthy individuals with ages ranging

**TABLE 1** Plasma VLCFA levels ( $\mu\text{mol/L}$ ) from X-ALD patients and their ages

Patients	Ages (years)	C26:0	C24:0/C22:0	C26:0/C22:0
1 (ASYMPT)	3	1.4	1.9	0.14
2 (ASYMPT)	1	5.9	1.88	0.12
3 (ASYMPT)	3	2.0	2.11	0.26
4 (ASYMPT)	3	1.6	2.01	0.2
5 (ASYMPT)	9	2.36	1.17	0.07
6 (ASYMPT)	2	2.65	1.19	0.04
7 (ASYMPT)	9	3.66	1.39	0.11
8 (ASYMPT)	12	2.81	1.55	0.07
Mean $\pm$ SD	$5.25 \pm 4.09$	$2.79 \pm 1.44$	$1.65 \pm 0.37$	$0.13 \pm 0.07$
9 (CCER)	10	5.6	1.86	0.1
10 (CCER)	12	1.7	1.75	0.19
11 (CCER)	9	1.6	1.79	0.18
12 (CCER)	8	1.5	1.79	0.18
13 (CCER)	10	0.9	1.91	0.15
14 (CCER)	15	3.5	1.59	0.29
15 (CCER)	14	2.5	1.49	0.13
16 (CCER)	11	3.0	1.22	0.16
Mean $\pm$ SD	$11.12 \pm 2.41$	$2.53 \pm 1.50$	$1.67 \pm 0.23$	$0.17 \pm 0.05$
17 (AMN)	30	2.4	1.09	0.09
18 (AMN)	36	2.5	1.42	0.08
19 (AMN)	16	5.5	1.87	0.16
20 (AMN)	18	1.7	2.0	0.17
21 (AMN)	55	2.6	1.44	0.14
22 (AMN)	27	2.1	2.13	0.23
23 (AMN)	27	2.0	1.44	0.18
24 (AMN)	29	4.6	1.89	0.13
Mean $\pm$ SD	$29.75 \pm 12.07$	$2.68 \pm 1.28$	$1.63 \pm 0.38$	$0.15 \pm 0.05$

C26:0, hexacosanoic acid; C24:0, tetracosanoic acid; C22:0, docosanoic acid; AMN, adrenomyeloneuropathy form; CCER, childhood cerebral form; ASYMPT, asymptomatic patients; SD, standard deviation.

**TABLE 2** VLCFA range reference values in plasma ( $\mu\text{mol/L}$ ) from X-ALD patients and healthy control individuals

Reference values	C26:0	C24:0/ C22:0	C26:0/ C22:0
Healthy individuals	0.11-0.96	0.78-1.09	0.008-0.03
X-ALD patients	1.36-4.94	1.31-1.92	0.04-0.29

Range reference values were obtained from Metabolites Analysis Laboratory in Hospital de Clínicas de Porto Alegre. C26:0, hexacosanoic acid; C24:0, tetracosanoic acid; C22:0, docosanoic acid.

between 3.1 years and 30.1 years ( $22.3 \pm 7.5$ ) were included in the control group. Clinical symptoms of CCER patients included leukodystrophy, learning difficulty, seizures, and hyperactivity. Patients with the AMN phenotype presented spastic paraparesis, limb weakness, and behavior disturbances. The study was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (number 15-0487) and all patients gave informed written consent to participate in the investigation.

## 2.2 | Samples collection and preparation

Plasma was prepared from whole blood samples obtained from fasting individuals (controls and X-ALD patients) by venous puncture with heparinized vials. Whole blood was centrifuged at 1000g for 10 min. Plasma was removed by aspiration and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

## 2.3 | VLCFA determination

Plasmatic VLCFAs were analyzed according to the technique by Moser and Moser.<sup>23</sup> This laboratorial procedure consisted of the preparation of total lipid extract and after a treatment of this extract with methanolic HCl (3N) for the formation of fatty acid methyl esters, which were then purified by thin-layer chromatography. The fatty acid methyl esters purified were extracted with hexane and analyzed by gas chromatography. A Varian gas chromatographer with an HP-5 column (5% methylphenyl silicone, 0.33 mm film thickness, 0.2 mm inner diameter, and 25 m in length), a flame ionization detector, a split/splitless injector, and helium as the mobile phase were utilized. Docosanoic acid (C22:0), tetracosanoic acid (C24:0), and hexacosanoic acid (C26:0) concentrations expressed in  $\mu\text{mol/L}$  were determined and the C26:0/C22:0 and C24:0/C22:0 ratios were calculated. Heptacosanoic acid (C27:0) was used as internal standard.

## 2.4 | Cytokines assay

Cytokines measured in plasma were performed by a Invitrogen kit: Human Ultrasensitive Cytokine 10-Plex Panel, which includes the measurement of IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6,

IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor). A sandwich immunoassay-based protein array system (Biosource International, Camarillo, CA), which contains dyed microspheres conjugated with a monoclonal antibody specific for a target protein, was used. Plasma samples were thawed and run in duplicates. Antibody-coupled beads were incubated with the plasma sample (antigen) after which they were incubated with biotinylated detection antibody before finally being incubated with streptavidin-phycoerythrin. This captured immunoassay was then read on a Luminex 100 instrument (Austin, TX) with a flow-based dual laser detector with real-time digital signal processing to facilitate the analysis of up to 100 different families of color-coded polystyrene beads and allow multiple measurements of the sample ensuing in the effective quantitation of cytokines. Cytokine levels were established by comparison with a standard curve according to the manufacturer's instructions. The results were expressed in pg/mL.

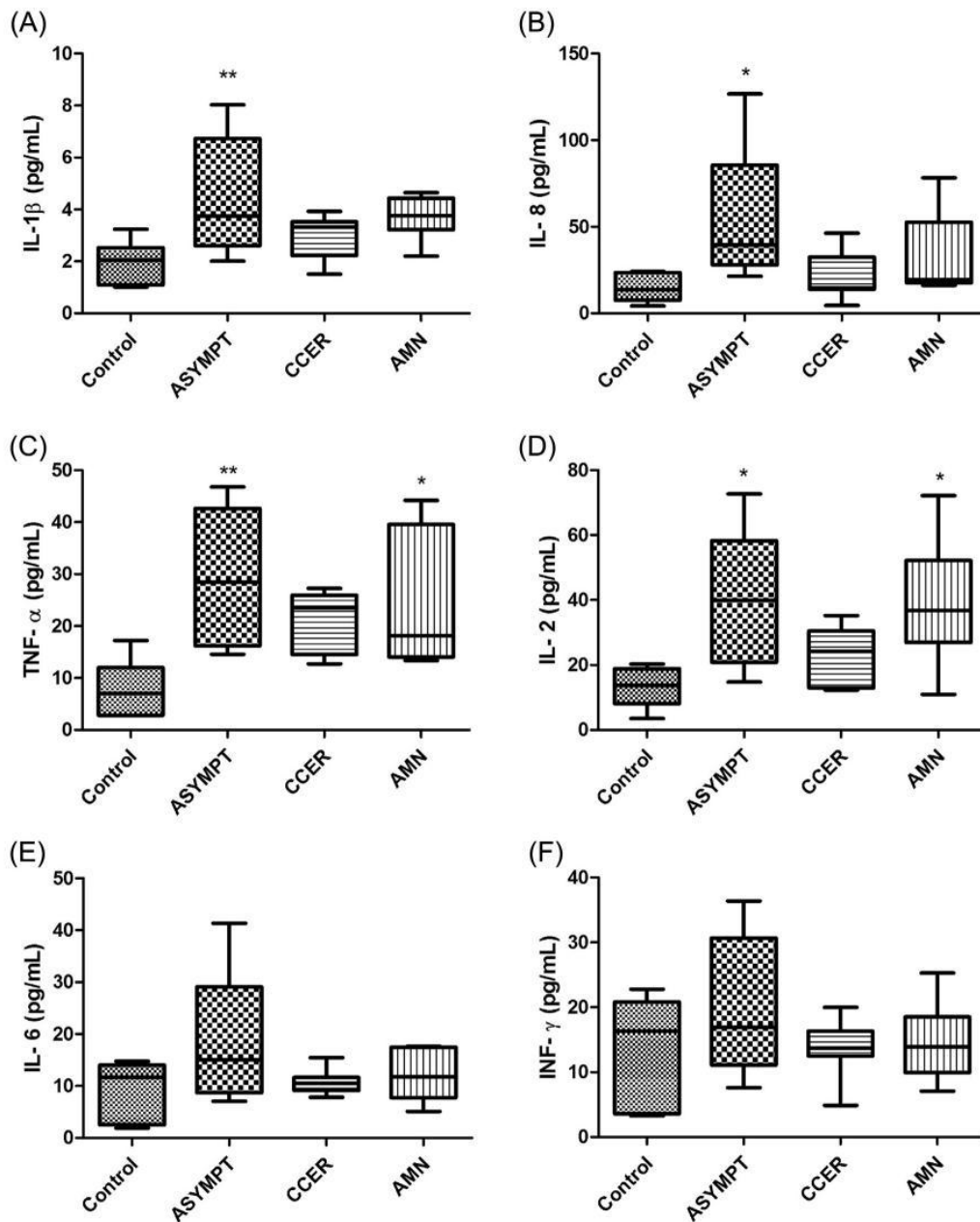
## 2.5 | Statistical analysis

Normal distribution was tested by Shapiro-Wilk test. Comparisons between means were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey. Correlations of patient's age and cytokine levels were performed by Pearson's correlation. Associations between cytokines and VLCFA levels were further tested by linear regression. Differences were considered statistically significant when *P* value was lower than 0.05. Statistical analyses and graphics were performed using the GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, version 5.0) software.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Pro-inflammatory cytokines

Pro-inflammatory cytokines measured in this study were IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ . None of them correlated with age of X-ALD patients under study ( $P > 0.05$ , Pearson's correlation). IL-1 $\beta$  (Figure 1A) and IL-8 (Figure 1B) levels were significantly increased in asymptomatic patients compared to control group ( $F[3,23] = 5.020$ ,  $P < 0.01$ ;  $F[3,23] = 3.087$ ,  $P < 0.05$ , respectively). TNF- $\alpha$  and IL-2 concentration were higher in both asymptomatic and AMN groups, compared to controls ( $F[3,24] = 6.048$ ,  $P < 0.01$  and  $F[3,24] = 5.366$ ,  $P < 0.05$ ) (Figure 1C,D). On the other hand, IL-6 and IFN- $\gamma$  measurements were similar between asymptomatic, CCER, AMN group, and controls (Figure 1E,F); however, it is important to notice that IL-6 and IFN- $\gamma$  concentrations in asymptomatic group has a tendency to be higher than the other groups.

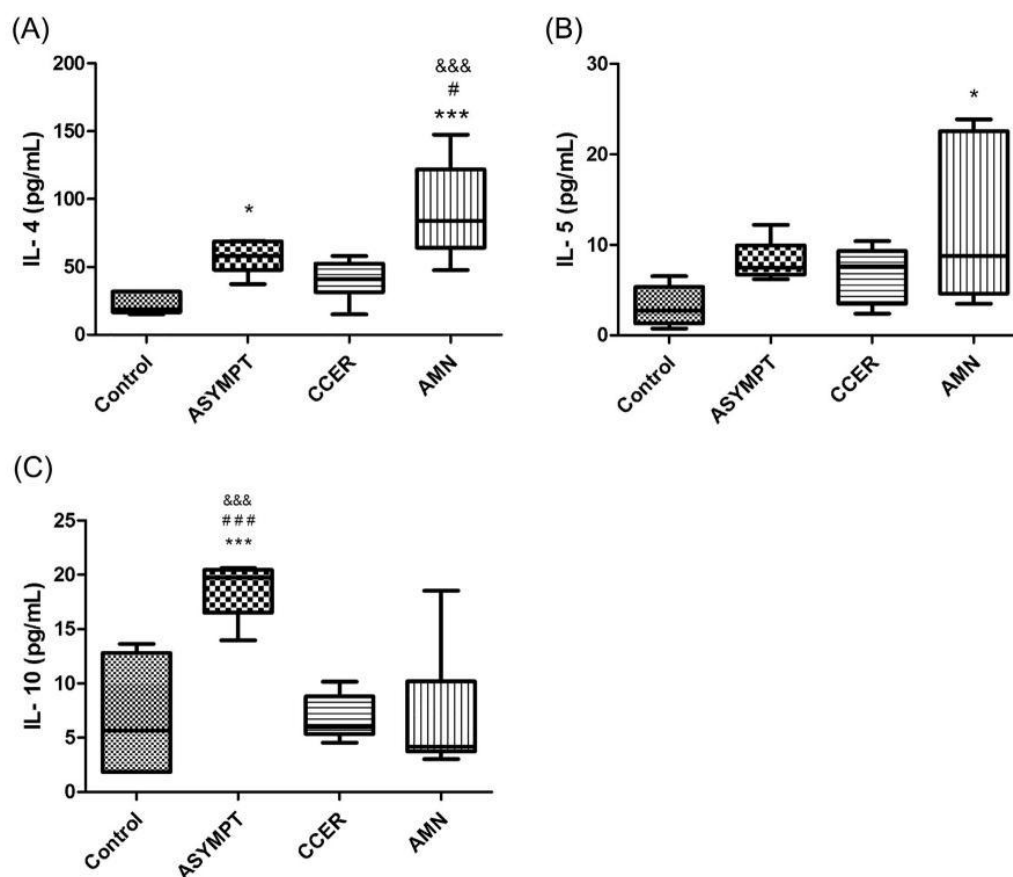


**FIGURE 1** Proinflammatory cytokines (interleukin-1 $\beta$ —IL-1 $\beta$  [A], interleukin-8—IL-8 [B], tumor necrosis factor alpha—TNF- $\alpha$  [C], interleukin-2—IL-2 [D], interleukin-6—IL-6 [E], and interferon gamma—INF- $\gamma$  [F]) in asymptomatic patients ( $n = 8$ ), childhood cerebral form (CCER;  $n = 8$ ), adrenomyeloneuropathy form (AMN;  $n = 8$ ), and controls ( $n = 8$ ). \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  compared to control group (one-way analysis of variance [ANOVA], followed by Tukey's multiple range test). Boxes represent interquartile ranges with median; whiskers indicate ranges

### 3.2 | Anti-inflammatory cytokines

The following anti-inflammatory cytokines were assessed: IL-4, IL-5, and IL-10. Again, none of them correlated with age of X-ALD patients under study ( $P > 0.05$ , Pearson's correlation). Asymptomatic patients had an increase in IL-4 levels

compared to controls, while AMN group had a strong significant increase in IL-4 levels compared to asymptomatic, CCER, and control groups ( $F[3,22] = 13.68$ ,  $P < 0.001$ ) (Figure 2A). AMN group presented significant increase in IL-5 compared to controls ( $F[3,30] = 3.218$ ,  $P < 0.05$ ) (Figure 2B). In addition, plasmatic concentration of IL-10



**FIGURE 2** Anti-inflammatory cytokines (interleukin-4—IL-4 [A], interleukin-5—IL-5 [B], and interleukin-10—IL-10 [C]) in asymptomatic patients ( $n = 8$ ), childhood cerebral form (CCER;  $n = 8$ ), adrenomyeloneuropathy form (AMN;  $n = 8$ ), and controls ( $n = 8$ ). \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$  compared to control group. # $P < 0.05$  compared to asymptomatic patients. &&& $P < 0.001$  compared to CCER form. ### $P < 0.001$  compared to AMN form (one-way analysis of variance—ANOVA, followed by Tukey's multiple range test). Boxes represent interquartile ranges with median; whiskers indicate ranges

was increased only in asymptomatic group, comparing CCER, AMN, and controls values (Figure 2C) ( $F[3,23] = 10.97$ ,  $P < 0.001$ ).

### 3.3 | GM-CSF levels

GM-CSF is a naturally occurring growth factor produced by several cell types in response to a variety of stimuli. In this study, no significant difference in GM-CSF levels was found between controls, asymptomatics, CCER, and AMN patients; nevertheless, it can be seen a greater tendency to increase in AMN when compared to other groups (Figure 3).

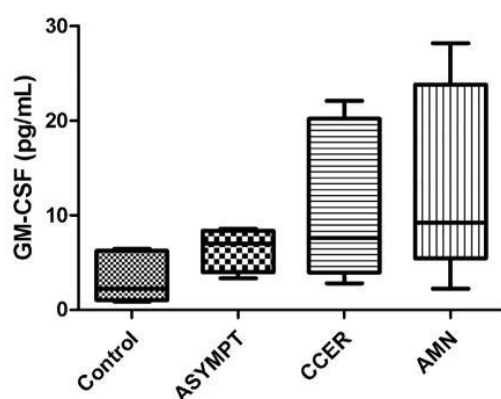
### 3.4 | Correlations between cytokines and VLCFA plasmatic levels

Table 3 has demonstrated that, in asymptomatic patients, C26:0 concentration positively correlated with IL-1 $\beta$ , IL-6,

and IL-8 pro-inflammatory cytokines. Likewise, in AMN group, C26:0 levels positively correlated with IL-8 and GM-CSF. C24:0/C22:0 ratio correlated negatively with IL-4 anti-inflammatory cytokine, in AMN group.

### 3.5 | Preliminary results of cytokines in patients with phenotype change

We calculated the average of IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-6, and IFN- $\gamma$  plasma levels from patients 5, 7, and 8 (Table 1) and it was possible to verify that the cytokines concentrations are increased around 31%, 18%, 90%, and 7.43% respectively, when the patients were still considered asymptomatic comparing to control levels. Moreover, the cytokines' average are reduced around 8%, 33.7%, 39.7%, and 7.6% when the patients change to CCER form comparing to asymptomatic state. The cytokine averages are described below: IL-1 $\beta$  average from controls, asymptomatic patients,



**FIGURE 3** Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) levels in asymptomatic patients ( $n = 8$ ), childhood cerebral form (CCER;  $n = 8$ ), adrenomyeloneuropathy form (AMN;  $n = 8$ ), and controls ( $n = 8$ ) (one-way analysis of variance—ANOVA, followed by Tukey's multiple range test). Boxes represent interquartile ranges with median; whiskers indicate ranges

and CCER form, respectively: 4.86; 6.38; 5.87 pg/mL. IL-10 average from controls, asymptomatic patients, and CCER form, respectively: 14.18; 16.77; 11.11 pg/mL. IL-6 average from controls, asymptomatic patients, and CCER form, respectively: 23.16; 44.11; 26.58 pg/mL. IFN- $\gamma$  average from controls, asymptomatic patients, and CCER form, respectively: 38.45; 41.31; 38.17 pg/mL.

## 4 | DISCUSSION

X-ALD is a progressive neurodegenerative disease that affects cerebral white matter, peripheral nerves, adrenal cortex, and testis.<sup>4</sup> The exact mechanism that causes the inflammatory reaction leading to loss of myelin in cerebral forms remains to be resolved, but it has been speculated that

**TABLE 3** Correlations between VLCFA plasma levels ( $\mu\text{mol/L}$ ) and cytokines (pg/mL) from X-ALD patients using linear regression analysis

Correlation	Significance ( $P$ )	$R^2$
Asymptomatic patients		
C26:0 $\times$ IL-1 $\beta$	0.02	0.75
C26:0 $\times$ IL-6	0.04	0.60
C26:0 $\times$ IL-8	0.01	0.75
AMN patients		
C26:0 $\times$ IL-8	0.02	0.68
C26:0 $\times$ GM-CSF	0.02	0.70
C24:0/C22:0 $\times$ IL-4	0.001	-0.89

C26:0, hexacosanoic acid; C24:0, tetracosanoic acid; C22:0, docosanoic acid; AMN, adrenomyeloneuropathy.

VLCFA induced apoptosis of oligodendrocytes resulting in activation of microglia and secretion of cytokines.<sup>24</sup>

Inflammation is known to be a crucial factor for X-ALD pathogenesis.<sup>14,25</sup> Powers et al<sup>7</sup> have provided evidence that reactive astrocytes, macrophages, and T lymphocytes were the most prevalent cellular elements. Later, it was reported that the transition from a metabolic defect to an inflammatory disease is accompanied by increased expression of pro-inflammatory cytokines and intercellular adhesion molecules (ICAMs) by astrocytes/microglial cells, perivascular cuffing lymphocytes, demyelination, and loss of myelinated axons and oligodendrocytes.<sup>26</sup>

Considering that inflammation seems to play an important role in X-ALD pathophysiology, in this work, we aimed to investigate pro and anti-inflammatory cytokines in plasma from three different X-ALD phenotypes in males: asymptomatic patients, AMN, and CCER forms. Besides, we correlated VLCFA levels and cytokines concentration in these patients.

Cytokines are regulators of host responses to infection, immune responses, inflammation, and trauma. Some cytokines act to make disease worse (pro-inflammatory), whereas others serve to reduce inflammation and promote healing (anti-inflammatory).<sup>27</sup> A dynamic and ever-shifting balance exists between both of them.<sup>28</sup> In healthy individuals, plasma levels of cytokines vary according to underlying disease (such as asthma), habits (such as smokers), gender, systolic blood pressure, total cholesterol, HDL cholesterol, triglyceride, and serum creatinine levels.<sup>29</sup> The literature shows that, in healthy subjects, some cytokine levels are undetectable; however, other cytokines presented a more complex profile, such as IL-4, IL-6, IL-13, IFN- $\gamma$ , PDGF-BB, and TNF- $\alpha$ , with a marked difference in the production in the children group (7-18 years), probably caused by the physiological changes that occur during adolescence.<sup>30</sup>

IL-1 is one of the most widely studied cytokines in terms of its role in neurodegeneration.<sup>31</sup> Since that TNF- $\alpha$  is capable of damaging oligodendrocytes and myelin sheaths, it has generated a great deal of interest regarding to X-ALD pathogenesis.<sup>32</sup> IL-8 plays a role in leukocyte activation and chemotaxis and has been shown to provoke polymorphonuclear leukocyte recruitment that is correlated with the breakdown of the blood-brain barrier (BBB).<sup>27</sup> Interestingly, our results have showed that asymptomatic patients presented higher plasmatic levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, and TNF- $\alpha$ , compared to control group. AMN phenotype has also presented increased levels of TNF- $\alpha$  compared to control group. IL-6 is a cytokine not only involved in inflammation and infection responses but also in the regulation of metabolic, regenerative, and neural processes.<sup>33</sup> Although it has not been verified any significant difference between groups regarding IL-6 and IFN- $\gamma$ , it can be observed in our study that asymptomatic

patients have a tendency to increase when compared to other groups, specially for IL-6.

Peripheral inflammation triggers a neuroinflammatory response involving BBB, glia, and neurons. Neuroinflammation is a term used to describe the broad range of immune responses of the CNS, differing from peripheral inflammation in a number of ways, primarily concerning the principle cells involved (such as microglia and astrocytes).<sup>21</sup>

The BBB and the transport of molecules across it is a key to understanding how peripheral inflammation can cause prolonged and damaging neuroinflammation. Inflammatory cytokines and other proteins were originally thought to be too large to enter the brain from the blood, but a number of transport mechanisms have come to light over the last two decades. BBB active transport systems have been observed facilitating the delivery of TNF and IL cytokines into the brain.<sup>34</sup>

TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , and other cytokines also have adverse affects on the integrity of the BBB, allowing it to become more permeable and enabling the entry of leucocytes into the brain.<sup>35</sup> Cytokine levels are known to modulate the permeability of the BBB by altering the resistance of tight junctions in endothelial cells in brain vasculature, high levels up-regulating inflammatory cytokines, and cyclooxygenase 2 transcription in the endothelium.<sup>36</sup> Thus, our results could show that peripheral pro-inflammatory cytokines will provide further insight into progression from asymptomatic to symptomatic forms of disease. Vagal stimulation by peripheral cytokines has direct influence on the CNS and induces sickness behavior and this presents another interesting area in the translation of peripheral inflammation to neuroinflammation.<sup>37</sup>

Anti-inflammatory cytokines are a series of immunoregulatory molecules that control the pro-inflammatory cytokine response.<sup>28</sup> In what concern anti-inflammatory cytokines analyzed in this study, it can be noted an increase in IL-4 levels for both AMN and asymptomatic patients and a strongly significant increase in IL-10 concentration in plasma of asymptomatic patients compared to AMN, CCER, and controls. Only AMN group presented higher levels of IL-5, which is a cytokine with Th2 profile and acts by stimulating the production, activation, and maturation of eosinophils.<sup>38</sup> IL-4 is a cytokine that functions as a potent regulator of immunity secreted primarily by mast cells, Th2 cells, eosinophils, and basophils. IL-10 is the most important anti-inflammatory cytokine found within the human immune response.<sup>28</sup> We speculated that the increase of anti-inflammatory cytokines in this disease probably occurs in an attempt to counteract the inflammation environment, considering that pro-inflammatory cytokines are either increased. A study developed by, Sheng et al<sup>39</sup> using cultures of human fetal microglial cells, have verified that acute release of pro-inflammatory cytokines could promote

subsequent release of IL-10, which functions to minimize the effects of pro-inflammatory cytokines.

Di Bias et al<sup>20</sup> have reported that X-ALD patients appeared to have a predominant Th1 response. The group analyzed IL-2, IL-10, IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from asymptomatic, AMN, and CCER patients, stimulated by either phytohemagglutinin (PHA) or lipopolysaccharide (LPS). Results showed that after stimulation by LPS, activated PBMC of both asymptomatic and symptomatic patients had an increase in IL-12 and TNF- $\alpha$  levels compared to controls. IL-2 levels appeared to increase with the severity of disease, and stimulated PBMC from CCER patients and controls had similar levels of IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6.

GM-CSF is a naturally occurring growth factor produced by several cell types in response to a variety of stimuli. GM-CSF has potent stimulatory effects on the growth and maturation of hematopoietic cells and has profound effects on mature circulating effector cells.<sup>40</sup> This cytokine is related to Th17 response, since IL-17 has pro-inflammatory properties and act on a broad range of cell types to induce cytokines, including GM-CSF.<sup>41</sup> Our results have showed no significant difference between plasmatic GM-CSF levels in studied groups, but it can be noted that AMN patients presented a tendency to increase compared to other groups.

With the purpose of understanding the role of inflammatory mediators in X-ALD, Paintlia et al<sup>26</sup> have determined the expression of inflammatory cytokines/chemokines in plaque area, inflammatory area, normal looking area of the X-ALD brain, and age-matched control brain by using gene array. The mRNA expression of cytokines IL-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), IL-2, IL-3, IL-6, TNF- $\alpha$ , and GM-CSF in inflammatory area was significantly increased compared to normal looking area of the CCER patients and controls.<sup>26</sup>

Some studies in literature have suggested that the production of inflammatory cytokines may play a role in phenotypic variations in X-ALD. McGuinness et al<sup>8</sup> sought to determine if TNF- $\alpha$  is a primary component in the inflammatory lesions of X-ALD. Bioactivity and specific activity of TNF- $\alpha$  were increased in serum samples from advanced CCER patients when compared to AMN patients, asymptomatic patients, and controls. Moreover, TNF- $\alpha$  production was examined in PBMCs after stimulation with PHA and IL-1 $\beta$  and there was no evidence that the X-ALD patients produced excessive TNF- $\alpha$  levels. In addition, McGuinness et al<sup>42</sup> have investigated the nature of the inflammatory demyelinating reaction in X-ALD patients with cerebral involvement. They have assessed cytokines gene expression in lesion samples taken postmortem from CCER patients and verified higher levels of Th1 cytokines since IFN- $\gamma$  and IL-2 were significantly increased in gliotic brain lesions compared to controls. On the other hand, the results of Th2 cytokines demonstrated increased levels of IL-6 in acute

lesions over controls, but IL-4 was not detected in lesions or controls.<sup>42</sup> This study has also reported that TNF- $\alpha$  mRNA in acute lesions was present in reactive astrocytes and macrophages but not detectable in oligodendrocytes and lymphocytes.<sup>42</sup>

The work performed by Lannuzel et al<sup>43</sup> has suggested that monocytes of X-ALD patients had an intrinsic alteration in the regulatory pathway of TNF- $\alpha$  production. They have verified in CCER patients with acute evolution that TNF- $\alpha$  serum levels but not IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4, and INF- $\gamma$  were higher than controls and X-ALD patients without cerebral demyelination. Besides, after *in vitro* stimulation by LPS, PBMC from symptomatic patients produced increased TNF- $\alpha$  levels compared to controls. On the contrary, in our study CCER patients have not showed an increase in any of the analyzed cytokines. It is important to note that five of the eight CCER patients included in our study presented milder manifestations and early stages of cerebral involvement. The symptoms comprised clinical features of pyramidal syndrome associated with cognitive deficits, recent onset seizures, slowly progressive of gait, psychomotor agitation, and hemiparesis. Corroborating with us, McGuinness et al<sup>8</sup> did not found an increase in bioactivity, serum levels, and specific activity of TNF- $\alpha$  in CCER patients with early stages of disease. Additionally, Lund et al<sup>44</sup> did not also found elevations in most pro-inflammatory cytokines investigated in serum, but observed increased in cerebral spinal fluid (CSF) levels in CCER patients.

We might presume that cerebral damage and demyelination degrees of the patients included in our study are milder and probably different from those with advanced stages studied by McGuinness et al<sup>8</sup> and Lannuzel et al.<sup>43</sup> Furthermore, we might assume that patients with severe brain damage hold response mechanisms more developed than those with milder phenotypes, generating a balance between pro- and anti-inflammatory cytokines production. Still, we may deduce that our results regarding plasmatic cytokines could differ from above studies because we have performed the analysis using an ultrasensitive kit for cytokines measurement and because the sample size of our study was higher compared to them.

Our findings allow us to infer that inflammation in the X-ALD patients might be related to plasmatic VLCFA accumulation, since there were positive correlation between C26:0 levels and pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-8 in asymptomatic patients. Likewise, C26:0 levels were positively correlated with IL-8 and GM-CSF in AMN patients. On the other hand, it was verified a negative correlation between the anti-inflammatory cytokine IL-4 and C24:0/C22:0 ratio in AMN patients. It is important to note that the increase in cytokine levels observed in patients was not related to their age, since we have not observed positive correlations between patient's age and cytokines levels (data not shown).

The results obtained in this study in what concern to the pronounced increase of both pro- and anti-inflammatory cytokines in asymptomatic X-ALD patients permit us to speculate that the increase of plasmatic inflammatory cytokines in these patients could be considered an early biomarker of brain damage and also a predictor of disease progression toward the CCER phenotype. Moreover, our hypothesis can be reinforced when we analyzed our preliminary results, since the same patients who were previously asymptomatic after evolving to the cerebral phenotype presented reduced levels of cytokines. Considering that treatment options in this disease are very limited, and that hematopoietic stem cell transplantation can halt or reverse clinical deterioration only in patients with the earliest stage of CCER,<sup>45</sup> the discovery of early biomarkers of brain damage and disease progression would be substantial to direct the treatment of asymptomatic patients.

It is important to highlight that this is the first study in literature to examine plasma levels of Th1, Th2, Th17, and macrophages-associated cytokines and to demonstrate the relationship between VLCFA plasma levels and inflammatory mediators in different X-ALD phenotypes. Although our results are found in the periphery, we might presume that inflammation is related to the X-ALD pathophysiology and also speculate that cytokine levels might be considered as an early biomarker of disease progression. However, the present results should be better investigated in cerebrospinal fluid to confirm our hypothesis and further studies with a larger number of asymptomatic patients and a comparison between them and symptomatic X-ALD patients are necessary.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Brazilian Foundation Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA). The authors also thank the patients, their families and the staff from Serviço de Genética Médica/Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

## CONFLICTS OF INTEREST

All authors declare that they have no conflicts of interest.

## INFORMED CONSENT

All procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. Informed consent was obtained from all patients for being included in the study.

## ORCID

Desirée Padilha Marchetti  <http://orcid.org/0000-0003-4143-4684>

## REFERENCES

1. Bezman L, Moser AB, Raymond GV, et al. Adrenoleukodystrophy: incidence, new mutation rate, and results of extended family screening. *Ann Neurol*. 2001;49:512–517.
2. Jardim LB, da Silva AC, Blank D, et al. X-linked adrenoleukodystrophy: clinical course and minimal incidence in South Brazil. *Brain Dev*. 2010;32:180–190.
3. Moser HW. Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain*. 1997;120:1485–1508.
4. Moser HW, Smith KD, Watkins PA, Powers J, Moser AB. 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.; 2001:3257–3301.
5. Moser HW, Raymond GV, Dubey P. Adrenoleukodystrophy—new approaches to a neurodegenerative disease. *JAMA*. 2005;294:3131–3134.
6. Berger J, Forss-Petter S, Eichler FS. Pathophysiology of X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochimie*. 2014;98:135–142.
7. Powers JM, Yan L, Moser AN, Moser HW. The inflammatory myelinopathy of adrenoleukodystrophy: cells, effector molecules, and pathogenetic implications. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1992;51:630–643.
8. McGuinness MC, Griffin DE, Raymond GV, Washington CA, Moser HW, Smith KD. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and X-linked adrenoleukodystrophy. *J Neuroimmunol*. 1995;2:61–69.
9. Powers JM. The pathology of peroxisomal disorders with pathogenetic considerations. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1995;54:710–719.
10. Habekost CT, Schestatsky P, Torres VF, et al. Neurological impairment among heterozygote women for X-linked adrenoleukodystrophy: a case control study on a clinical, neurophysiological and biochemical characteristics. *Orphanet J Rare Dis*. 2014;9:6.
11. Habekost CT, Pereira FS, Vargas CR, et al. Progression rate of myelopathy in X-linked adrenoleukodystrophy heterozygotes. *Metab Brain Dis*. 2015;30:1279–1284.
12. Moser HW, Mahmood A, Raymond GV. X-linked adrenoleukodystrophy. *Nat Clin Pract Neurol*. 2007;3:140–151.
13. Schaumburg HH, Powers JM, Raine CS, Suzuki K, Richardson EP, Jr. Adrenoleukodystrophy. A clinical and pathological study of 17 cases. *Arch Neurol*. 1975;32:577–591.
14. Ito M, Blumberg BM, Mock DJ, et al. Potential environmental and host participants in the early white matter lesion of adrenoleukodystrophy: morphologic evidence for CD8 cytotoxic T cells, cytolysis of oligodendrocytes, and CD1-mediated lipid antigen presentation. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001;60:1004–1019.
15. Eichler FS, Ren JQ, Cossoy M, et al. Is microglial apoptosis an early pathogenic change in cerebral X-linked adrenoleukodystrophy? *Ann Neurol*. 2008;63:729–742.
16. Tayal V, Kalra BS. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics—an update. *Eur J Pharmacol*. 2008;579:1–12.
17. Galic MA, Riazi K, Pittman QJ. Cytokines and brain excitability. *Front Neuroendocrinol*. 2012;33:116–125.
18. Selmaj K, Raine CS. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol*. 1988;23:339–346.
19. Abbas AK, Lichtman AH. 2003. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed. Philadelphia: WA Saunders.
20. Di Biase A, Merendino N, Avellino C, Cappa M, Salvati S. Th 1 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in X-linked adrenoleukodystrophy. *J Neurol Sci*. 2001;182:161–165.
21. Lyman M, Lloyd DG, Ji X, Vizcaychipi MP, Ma D. Neuroinflammation: the role and consequences. *Neurosci Res*. 2014;79:1–12.
22. Pereira FS, Matte U, Habekost CT, et al. Mutations, clinical findings and survival estimates in South American patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *PLoS ONE*. 2012;7:e34195.
23. Moser HW, Moser AB. Measurement of saturated very long chain fatty acid in plasma. In: Hommes FA, ed. *Techniques of diagnostic human biochemical genetics*. New York: Wiley; 1991:177–191.
24. Kemp S, Wanders R. Biochemical aspects of X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol*. 2010;20:831–837.
25. Amor S, Puentes F, Baker D, van der Valk P. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*. 2010;129:154–169.
26. Paintlia AS, Gilg AG, Khan M, Singh AK, Barbosa E, Singh I. Correlation of very long chain fatty acid accumulation and inflammatory disease progression in childhood X-ALD: implications for potential therapies. *Neurobiol Dis*. 2003;14:425–439.
27. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000;118:503–508.
28. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 2000;117:1162–1172.
29. Kim HO, Kim HS, Youn JC, Shin EC, Park S. Serum cytokine profiles in healthy young and elderly population assessed using multiplexed bead-based immunoassays. *J Transl Med*. 2011;9:113.
30. Kleiner G, Marcuzzi A, Zanin V, Monasta L, Zauli G. Cytokine levels in the serum of healthy subjects. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:434010.
31. Allan SM. The role of pro- and antiinflammatory cytokines in neurodegeneration. *Ann NY Acad Sci*. 2000;917:84–93.
32. Hudspeth MP, Raymond GV. Immunopathogenesis of adrenoleukodystrophy: current understanding. *J Neuroimmunol*. 2007;182:5–12.
33. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:878–888.
34. Gutierrez EG, Banks WA, Kastin AJ. Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. *J Neuroimmunol*. 1993;47:169–176.
35. Terrando N, Eriksson LI, Ryu JK, et al. Resolving postoperative neuroinflammation and cognitive decline. *Ann Neurol*. 2011;70:986–995.
36. de Vries HE, Blom-Roosemalen MC, van Oosten M, et al. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J Neuroimmunol*. 1996;64:37–43.
37. Fung A, Vizcaychipi M, Lloyd D, Wan Y, Ma D. Central nervous system inflammation in disease related conditions: mechanistic prospects. *Brain Res*. 2012;1446:144–155.
38. Simon HU, Cools J. Novel approaches to therapy of hyper-eosinophilic syndromes. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2007;27:519–527.
39. Sheng WS, Hu S, Kravitz FH, Peterson PK, Chao CC. Tumor necrosis factor alpha upregulates human microglial cell production



- of interleukin-10 in vitro. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1995;5:604–608.
40. Hill ADK, Naama HA, Calvano SE, Daly JM. The effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on myeloid cells and its clinical applications. *J Leukoc Biol.* 1995;58:634–642.
41. Dardalhon V, Korn T, Kuchroo VK, Anderson AC. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J Autoimmun.* 2008;31:252–256.
42. McGuinness MC, Powers JM, Bias WB, et al. Human leukocyte antigens and cytokine expression in cerebral inflammatory demyelinating lesions of X-linked adrenoleukodystrophy and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 1997;75:174–182.
43. Lannuzel A, Aubourg P, Tardieu M. Excessive production of tumour necrosis factor alpha by peripheral blood mononuclear cells in X-linked adrenoleukodystrophy. *Eur J Paediatr Neurol.* 1998;1:27–32.
44. Lund TC, Stadem PS, Panoskaltis-Mortari A, et al. Elevated cerebral spinal fluid cytokine levels in boys with cerebral adrenoleukodystrophy correlates with MRI severity. *PLoS ONE.* 2012;7:e32218.
45. Peters C, Charnas LR, Tan Y, et al. Cerebral X-linked adrenoleukodystrophy: the international hematopoietic cell transplantation experience from 1982 to 1999. *Blood.* 2004;104:881–888.

**How to cite this article:** Marchetti DP, Donida B, Jacques CE, et al. Inflammatory profile in X-linked adrenoleukodystrophy patients: Understanding disease progression. *J Cell Biochem.* 2018;119:1223–1233. <https://doi.org/10.1002/jcb.26295>

3.2 Capítulo II- Artigo 2: *Oxidative imbalance, nitrative stress and inflammation in C6 glial cells exposed to hexacosanoic acid: protective effect of N-acetyl-L-cysteine, Trolox and Rosuvastatin*

Este artigo científico foi publicado no periódico *Cellular and Molecular Neurobiology*



## Oxidative Imbalance, Nitrative Stress, and Inflammation in C6 Glial Cells Exposed to Hexacosanoic Acid: Protective Effect of *N*-acetyl-L-cysteine, Trolox, and Rosuvastatin

Desirée Padilha Marchetti<sup>1,8</sup> · Luiza Steffens<sup>2</sup> · Carlos E. Jacques<sup>1</sup> · Gilian B. Guerreiro<sup>3</sup> · Caroline P. Mescka<sup>3</sup> · Marion Deon<sup>3,4</sup> · Daniella M. de Coelho<sup>4</sup> · Dinara J. Moura<sup>2</sup> · Alice G. Viario<sup>5</sup> · Fernanda Poletto<sup>5</sup> · Adriana S. Coitinho<sup>6,7</sup> · Laura B. Jardim<sup>4</sup> · Carmen R. Vargas<sup>1,3,4,8</sup>

Received: 25 June 2018 / Accepted: 3 October 2018  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

### Abstract

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is an inherited neurometabolic disorder caused by dysfunction of the ABCD1 gene, which encodes a peroxisomal protein responsible for the transport of the very long-chain fatty acids from the cytosol into the peroxisome, to undergo  $\beta$ -oxidation. The mainly accumulated saturated fatty acids are hexacosanoic acid (C26:0) and tetracosanoic acid (C24:0) in tissues and body fluids. This peroxisomal disorder occurs in at least 1 out of 20,000 births. Considering that pathophysiology of this disease is not well characterized yet, and glial cells are widely used in studies of protective mechanisms against neuronal oxidative stress, we investigated oxidative damages and inflammatory effects of vesicles containing lecithin and C26:0, as well as the protection conferred by *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), trolox (TRO), and rosuvastatin (RSV) was assessed. It was verified that glial cells exposed to C26:0 presented oxidative DNA damage (measured by comet assay and endonuclease III repair enzyme), enzymatic oxidative imbalance (high catalase activity), nitrative stress [increased nitric oxide (NO) levels], inflammation [high Interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ) levels], and induced lipid peroxidation (increased isoprostane levels) compared to native glial cells without C26:0 exposure. Furthermore, NAC, TRO, and RSV were capable to mitigate some damages caused by the C26:0 in glial cells. The present work yields experimental evidence that inflammation, oxidative, and nitrative stress may be induced by hexacosanoic acid, the main accumulated metabolite in X-ALD, and that antioxidants might be considered as an adjuvant therapy for this severe neurometabolic disease.

**Keywords** X-linked adrenoleukodystrophy · Glial cells · *N*-acetyl-L-cysteine · Rosuvastatin · Trolox

### Abbreviations

BMT	Bone marrow transplant	HTZ	Heterozygotes
CAT	Catalase	IL	Interleukin
C22:0	Docosanoic acid	IL-1 $\beta$	Interleukin-1beta
C24:0	Tetracosanoic acid	LPS	Lipopolysaccharide
C26:0	Hexacosanoic acid	PBS	Phosphate buffer saline
C27:0	Heptacosanoic acid	NAC	<i>N</i> -acetyl-L-cysteine
CCER	Childhood cerebral form	NO	Nitric oxide
Endo III	Endonuclease III	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrate
GPx	Glutathione peroxidase	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrite
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogen peroxide	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxide anion
		SEM	Standard error of mean
		RSV	Rosuvastatin
		SOD	Superoxide dismutase
		TRO	Trolox
		VLCFA	Very long-chain fatty acid
		X-ALD	X-linked adrenoleukodystrophy

✉ Desirée Padilha Marchetti  
desireemarchetti@gmail.com

✉ Carmen R. Vargas  
crvargas@hcpa.edu.br

Extended author information available on the last page of the article

## Introduction

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is a peroxisomal metabolic disorder with an estimated incidence of 1:20,000 births (Moser et al. 2007). It is associated with mutations in the ATP-binding cassette, subfamily D, member 1 (ABCD1) gene, which results in accumulation of very long-chain fatty acids (VLCFAs), mainly hexacosanoic acid (C26:0) and tetracosanoic acid (C24:0) in tissue and body fluids (Moser et al. 2007). Elevated VLCFA levels seem to be related to the clinical outcome, which is characterized by severe progressive and multifocal demyelination, adrenal insufficiency, and inflammation (Kruska et al. 2015).

Seven phenotypes have been described in male patients [i.e., childhood cerebral form (CCER), juvenile cerebral form, adult cerebral form, adrenomyeloneuropathy, isolated Addison disease, olivo-ponto-cerebellar and asymptomatic patients] and five in heterozygotes (HTZ) females (asymptomatic, mild myelopathy, moderate to severe myeloneuropathy, cerebral involvement, and clinically evident adrenal insufficiency) (Moser et al. 2001). There are more than 600 known mutations in ABCD1, and there is no correlation between genotype and phenotype, even within the same family (Kemp et al. 2012). The onset of cerebral X-ALD is unpredictable, and it can occur during childhood but also in adulthood. HTZ women with X-ALD develop signs of myelopathy in adulthood and the most prominent findings were involvement of corticospinal and sensory ascendant tracts, and a peripheral neuropathy, all clearly related to aging. Cerebral involvement and adrenal insufficiency are rare in X-ALD women (Engelen et al. 2014; Habekost et al. 2014).

Many therapies, including immunosuppression and low-fat diet with lipid supplement (Lorenzo's oil—mixture of erucic acid and oleic acid), have been used in attempts to modify the relentless progression of X-ALD. None has proved to be effective. Current treatment options for X-ALD are limited to three modes of therapy and can change as the phenotypes evolve: adrenal hormone replacement, Lorenzo's oil therapy, and bone marrow transplant (BMT). The BMT have been the only known method to halt cerebral demyelination, and it is only recommended for individuals with mild evidence of brain involvement by magnetic resonance imaging but minimal neuropsychological findings and normal clinical neurologic examination (Tolar et al. 2007; Rockenbach et al. 2012). Although there is not any satisfactory therapy for X-ALD, many works have proposed the use of antioxidants as an adjuvant therapy for this disease (Di Biase et al. 2005; Fourcade et al. 2008; Tolar et al. 2007; Marchetti et al. 2015).

Despite the fact that mechanisms underlying tissue damage in X-ALD are still unclear, several studies have

demonstrated the role of oxidative stress in the pathophysiology of this disorder (Deon et al. 2007, 2008a, b; Vargas et al. 2004; Marchetti et al. 2015; Fourcade et al. 2015). Oxidative stress, which is an imbalance between reactive oxygen species production and the antioxidant systems, has been identified as an important contributor to neurodegenerative diseases (Halliwell and Gutteridge 2007), since brain has relatively low levels of antioxidant defenses, high lipid content (specially unsaturated fatty acids), and catecholamines, which are highly susceptible to free radical attack (Halliwell and Gutteridge 2007).

The nervous system is built from two broad categories of cells, neurones, and glial cells (Jessen 2004). It is assumed that glial cells play a significant role in host defense and tissue repair in the central nervous system. C6 glial cells are widely used in studies of protective mechanisms against neuronal oxidative stress, and have provided a useful model to study glial cell properties, glial factors, and sensitivity of glial cells to various substances and conditions (Mangoura et al. 1989; Dringen et al. 2000). Microglia are the resident macrophages of the brain and play critical roles in the development and maintenance of the neural environment. Under pathological conditions, glial cells are activated and produce a large number of substances, including cytokines and radicals such as nitric oxide (NO) (Hanisch 2002). Glezer et al. (2007) have reported that the process of demyelination in cerebral X-ALD might be related to the loss of microglia and/or abnormal microglia function. Glial cells seem to be involved in the progress of X-ALD; however, it is not known whether oligodendrocyte cell death, and therefore demyelination, is a primary or a secondary event in X-ALD (Hein et al. 2008).

In order to investigate the hypothesis that C26:0 induce inflammation, oxidative imbalance, and oxidative stress in X-ALD, we used a model proposed in the literature (Di Biase et al. 2004), where cultured C6 glial cells are incubated with a lecithin vesicle containing C26:0. Considering that *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), trolox (TRO), and resveratrol (RSV) have already been proven to be effective in protecting damages in animal and cellular models of X-ALD (Di Biase et al. 2005; Fourcade et al. 2008; Marchetti et al. 2015), we also aimed to study the effect of these compounds on C6 glial cells exposed to C26:0.

## Experimental Procedures

### Vesicle Preparation

Egg lecithin (Sigma-Aldrich®) was previously dissolved in ethanol and an aliquot corresponding to 8 mg of this phospholipid was withdrawn and transferred to a flask. After that, the organic solvent was dried under a stream of nitrogen and

4 mg of C26:0 methyl-ester (Sigma-Aldrich®) was added. The lipids were mixed to 2.5 mL of sterile water and the suspension was sonicated with a microtip (Sonicator Ultrasonic Processor XL—Misonix Incorporated). The same procedure was carried out without C26:0 methyl-ester in order to obtain empty lecithin vesicles, which were used as vehicle control (Di Biase et al. 2004, 2005).

### Cell Culture and Antioxidant Treatment

C6 rat glial cells (ATCC® Number: CCL-107™, Rockville, Maryland, USA), which are already well characterized as the glia model, were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM obtained from Gibco, Grand Island, NY, USA) containing 5% of fetal bovine serum at 37 °C in a humid atmosphere containing CO<sub>2</sub> 5% and harvested by treatment with 0.15% trypsin–0.08% EDTA in phosphate buffer saline (PBS). At confluence, the vesicles containing lecithin and C26:0 methyl-ester were added to the cell culture. After 24 h, the cells were harvested with trypsin and resuspended in a medium at the concentration of  $5 \times 10^5$  cells/mL and 1-mL aliquots were seeded into multiple 24-well plates. A pre-treatment was performed for 2 h at 37 °C with the following antioxidants: NAC (100 μM), RSV (5 μM), and TRO (75 μM) (Di Biase et al. 2005). Cells and supernatants were harvested for analysis of oxidative stress, DNA damage, and inflammation. The C6 glial cells we used in this study were early passage cells (up to passage 24). Early passage cells have similar characteristics to immature cells, and are related to the expression of astrocytes and oligodendrocytes.

### Cell Viability Assays

The cytotoxicity was evaluated using neutral red uptake assay, in accordance with protocol previously described (Repetto et al. 2008). This assay is based in the incorporation of neutral red dye into lysosomes of viable cells. The cells were seeded in 96-well plate ( $1.6 \times 10^4$  cells/well) and exposed to different treatments for 24 h. Then, cells were washed with PBS and incubated with 250 μL of neutral red solution (25 μg/mL) at 37 °C for 3 h. After this, cells were washed and incubated for 30 min, protecting from light, with adsorbent solution (mixture of acetic acid, ethanol, and water in ratio of 1:50:49). Absorbance was measured at 540 nm in spectrophotometer microplate reader. We also employed trypan blue dye-exclusion assay to measure cell viability, which evaluates the membrane integrity loss, following a protocol proposed by Hathaway et al. (1964). After treatment, 10 μL of cell suspension was mixed with 10 μL of 0.4% trypan blue solution. Cytotoxicity was determined from the number of viable cells (no color) in treated samples as a percentage of the PBS control. The

equipment Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen) was used to count the cells. The test was carried out according to the instructions of the manufacturer.

### Alkaline and Enzymatic Comet Assay

The alkaline comet assay was performed as reported by Singh et al. (1988). Cell culture (104 cells/mL) was mixed with low melting point agarose solution and spread on agarose-precoated microscope slides. For each treatment, three slides were made. Slides were incubated in ice-cold lysis solution (2.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris, 100 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, pH 10.0) at 4 °C for 24 h to remove cell membranes. Then, slides were placed in a horizontal electrophoresis unit and incubated with fresh alkaline buffer solution (300 mmol/L NaOH, 1 mmol/L EDTA, pH 13.0) at 4 °C for 20 min to allow DNA unwinding and the expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was conducted for 20 min at 25 V (94 V/cm). All these steps were performed under yellow light or in the dark to prevent additional DNA damage. Slides were stained using silver nitrate. One hundred cells from each treatment were selected and analyzed for DNA migration and the average of the three slides from each treatment group was used to determine the damage index. The damage index is an arbitrary score calculated for cells in different damage classes, which is scored visually according to the tail length of the “comet” into five classes: Class 0, undamaged, without a tail; Class 1, with a tail shorter than the diameter of the head nucleus; Class 2, with a tail length one- to twofold greater than the diameter of the head; Class 3, with a tail longer than twofold the diameter of the head; and Class 4, comets with no heads. The damage index ranges from 0 (no tail) to 400 (maximum migration). In the enzymatic comet assay, a bacterial repair enzyme was included in the alkaline comet assay before electrophoresis, in accordance with Dizdaroğlu et al. (1993). The enzyme used was endonuclease III (Endo III) which converts oxidized pyrimidines (including thymine glycol and uracil glycol) to strand breaks. After lysis, each slide was washed for 5 min in an enzyme buffer (40 mM HEPES–KOH, 1 M KCl, 5 mM EDTA, 2.5 mg/mL bovine serum albumin fraction V-BSA, and pH 8.0), followed by enzyme incubation for 45 min at 37 °C. Subsequent steps were the same as in the alkaline version of comet assay. DNA damage with Endo III was calculated as the score obtained with enzyme minus the score without enzyme (basal).

### Total Superoxide Dismutase (SOD) Activity

Total SOD activity was evaluated by quantifying the inhibition of superoxide-dependent autoxidation of epinephrine, verifying the absorbance of the samples at 480 nm (Misra

and Fridovich 1972). Briefly, to 10  $\mu\text{L}$  of cell suspension was added 170  $\mu\text{L}$  of 50 mM glycine buffer pH 10.2 and 10  $\mu\text{L}$  of 10 mM catalase (CAT). After that, 10  $\mu\text{L}$  of epinephrine was added and the absorbance was immediately recorded every 36 s for 15 min at 480 nm in SpectraMax M2e Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California). The inhibition of epinephrine autoxidation occurs in the presence of SOD, the activity of which can then be indirectly assayed spectrophotometrically. One SOD unit is defined as the amount of SOD necessary to inhibit 50% of epinephrine autoxidation and the specific activity was calculated as SOD Units/mg protein.

### Catalase (CAT) Activity

CAT activity was assayed according to the method described by Maehly and Chance (1954), based on the disappearance of hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) at 240 nm. Briefly, 30  $\mu\text{L}$  of homogenate was added to 1600  $\mu\text{L}$  of potassium phosphate buffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, pH 7.0). Subsequently, 10  $\mu\text{L}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (25 mM) was added and the absorbance was immediately recorded every 30 s for 5 min, using SpectraMax M2e Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California). One CAT unit was defined as 1  $\mu\text{mol}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumed per minute and the specific activity was calculated as CAT Units/mg protein.

### Cytokine Measurement

Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) measured in cell supernatant were performed by a Invitrogen ELISA kit (Biosource International, Camarillo, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The results were expressed as pg/mL.

### Nitrate and Nitrite Assay

The quantification of NO equivalents in cell supernatants was performed using the nitrate/nitrite colorimetric assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) according to the manufacturer's instructions. The NO produced in biological systems rapidly degrades to its stable products  $\text{NO}_3^-$  (nitrate) and  $\text{NO}_2^-$  (nitrite). The first step is the conversion of  $\text{NO}_3^-$  to  $\text{NO}_2^-$  using nitrate reductase. Subsequently, the formed  $\text{NO}_2^-$  is quantified using the Griess reaction, which results in a colored product, read at 540 nm. Results were expressed as  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$   $\mu\text{M}$ .

### Isoprostane Determination

The isoprostanes are products of arachidonic acid metabolism and biomarkers of lipid peroxidation. It was measured by a competitive enzyme-linked immunoassay (ELISA)

(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), according to the manufacturer's instructions. This assay is based on competition with an 8-isoprostane/acetylcholinesterase conjugate for a limited number of 8-isoprostane-specific rabbit antiserum binding sites. The observed absorbance (wavelength at 415 nm), determined spectrophotometrically, was inversely related to the amount of free 8-isoprostane in samples. Results were expressed as pg/mL.

### Protein Determination

Cayman's Protein Determination Kit is based on the well-known Bradford method. It takes advantage of the color change of Coomassie<sup>®</sup>Dye when it binds to proteins in acidic medium. When the dye binds, there is an immediate shift of the absorption maximum from 465 to 595 nm with a simultaneous change in color from brown to blue. Protein concentration was calculated from a regression line fit to a series of standard protein dilutions assayed on the same plate as the unknown samples. Results were expressed per gram of protein.

### Fatty Acid Analysis

VLCFAs were analyzed according to the technique by Moser and Moser (1991). This assay consisted of the preparation of total lipid extract and after a treatment of this extract with methanolic HCl (3 N) for the formation of fatty acid methyl esters, which were then purified by thin-layer chromatography. The fatty acid methyl esters purified were extracted with hexane and analyzed by gas chromatography. A Varian gas chromatographer with an HP-5 column (5% methylphenyl silicone, 0.33 mm film thickness, 0.2 mm inner diameter, and 25 m in length), a flame ionization detector, a split/splitless injector, and helium as the mobile phase were utilized. Docosanoic acid (C22:0), tetracosanoic acid (C24:0), and hexacosanoic acid (C26:0) concentrations expressed in  $\mu\text{mol/L}$  were determined and the C26:0/C22:0 and C24:0/C22:0 ratios were calculated. Heptacosanoic acid (C27:0) was used as internal standard.

### Statistical Analysis

The results obtained were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Comparisons between the mean values were made through one-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test. Values of  $p < 0.05$  were considered significant. The software used for statistical analysis and graphs was GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA—version 5.0).

## Results

### Incorporation of the Vesicles Containing C26:0 by Glial Cells

The vesicle formed by lecithin and C26:0 was effective in providing the acid uptake by the glial cells. The acid hexacosanoic concentration, measured by the technique described by Moser and Moser (1991), was 0.16  $\mu\text{M}$  C26:0/g of protein in cultured glial cells.

### Cell Viability Assays

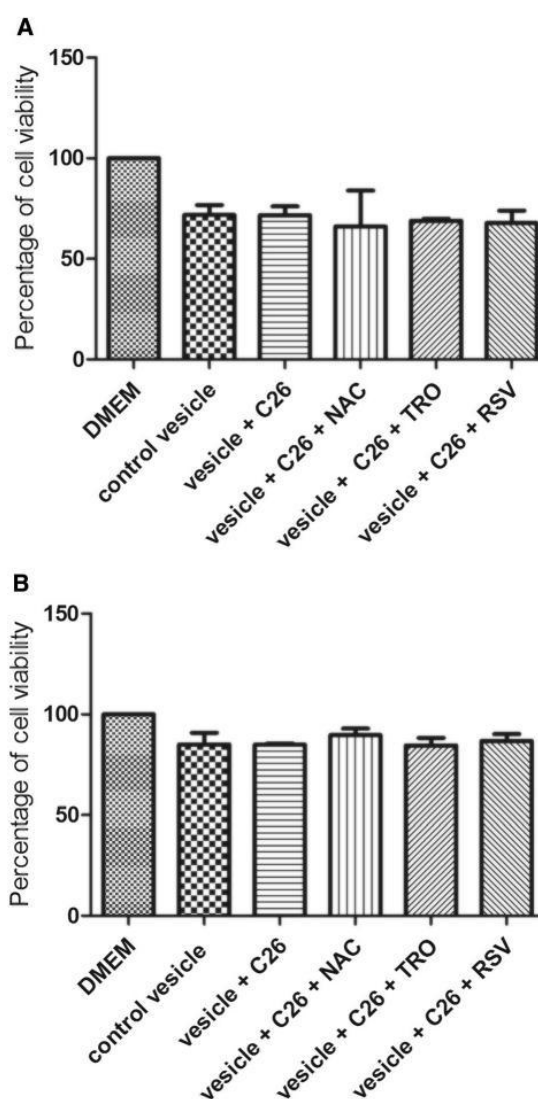
Cell viability was verified by the trypan blue dye-exclusion test (Fig. 1a), which evaluates the loss of membrane integrity and neutral red assay (Fig. 1b). Figure 1a demonstrates that both the lecithin vesicle (control vesicle) and the complete vesicle (vesicle + C26) with or without antioxidant treatment, reduce cell viability in approximately 30%, compared to DMEM group (native glial cells), in other words, 70% of cells are still viable. However, it was not statistically significant [ $F(5,12)=2.43$ ,  $p>0.05$ ]. Likewise, Fig. 1b shows that there is no significant difference between the groups [ $F(5,12)=3.05$ ,  $p>0.05$ ]. These results allow us to assert that the vesicle containing C26:0 is effective for our experiments and it did not impair cell growth.

### Basal DNA Damage

DNA damage was evaluated by comet assay. It was found that glial cells exposed to C26:0 (vesicle + C26) have showed three to four times more DNA damage index compared to control cells (native cells and cells exposed to lecithin vesicle). We found that control cells treated only with the lecithin vesicle had approximately 10% more damage compared to the native control cells (DMEM group); however, it is not considered statistically significant. In addition, it can be seen that the three antioxidants (NAC, TRO, and RSV), when added to the glial cells exposed to C26:0, were capable to reduce DNA damage. However, only the NAC and RSV groups had significantly capacity of reduction (Fig. 2a) [ $F(5,12)=10.63$ ,  $p<0.001$ ]. Pictures of cells and treatments are represented in Fig. 2b.

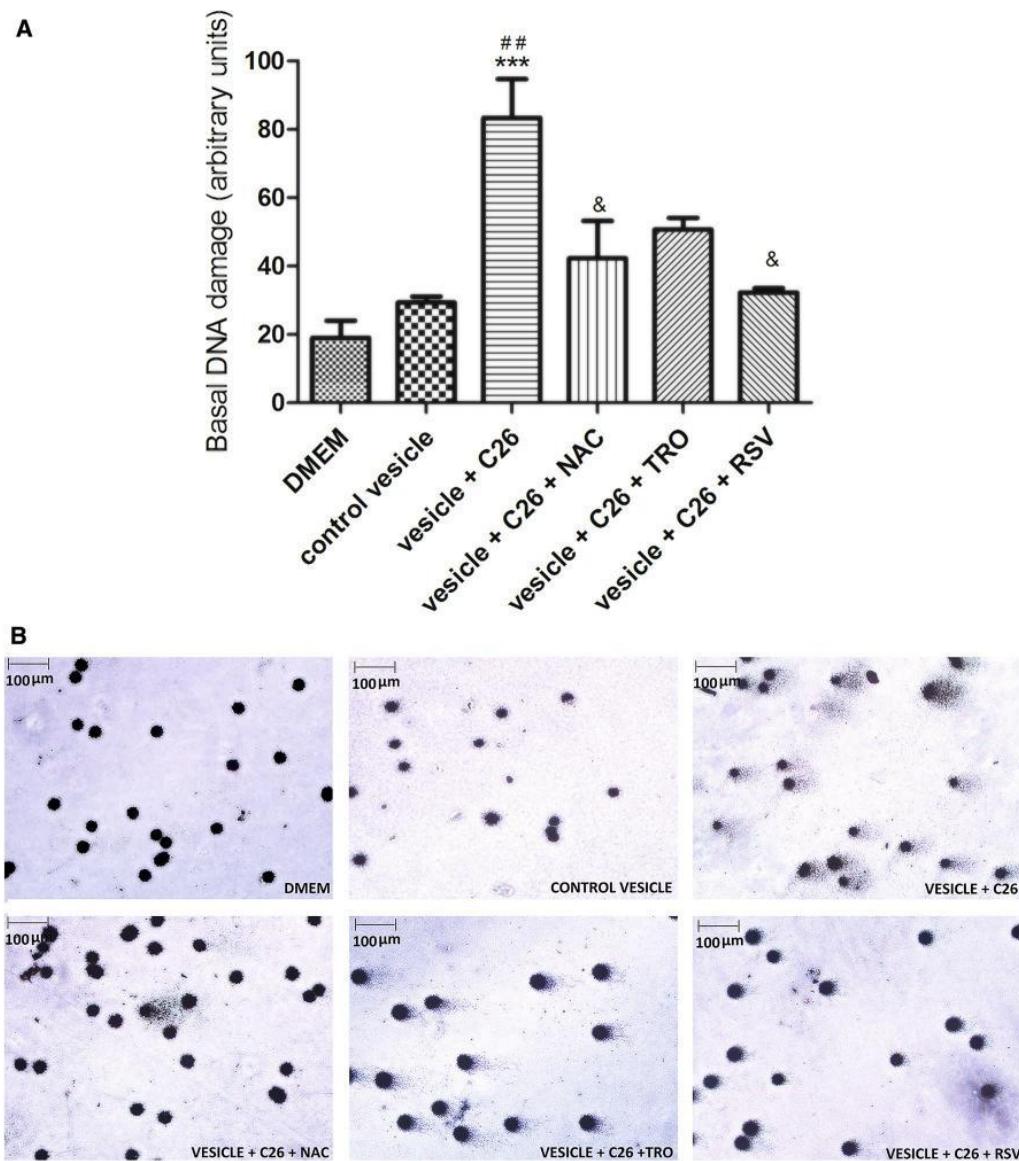
### Oxidative DNA Damage

The damage represented in Fig. 3 was calculated as the score obtained with enzyme Endo III damage minus the score without the enzyme (basal damage). In the assay with Endo III enzyme, it was observed an elevated oxidative damage (more than five times) in cells exposed to C26:0 compared



**Fig. 1** **a** Trypan blue viability assay in native glial cells (DMEM), glial cell with lecithin-control vesicle (control vesicle), glial cells with complete vesicle (vesicle + C26), glial cells with complete vesicle treated with *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), trolox (TRO), and rosuvastatin (RSV). Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test. **b** Neutral red viability assay in native glial cells (DMEM), glial cell with lecithin-control vesicle (control vesicle), glial cells with complete vesicle (vesicle + C26), glial cells with complete vesicle treated with *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), trolox (TRO) and rosuvastatin (RSV). Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test

to control cells. Besides, NAC antioxidant was effective in reducing DNA damage compared to glial cell incubated with



**Fig. 2 a** DNA damage in native glial cells (DMEM), glial cell with lecithin-control vesicle (control vesicle), glial cells with complete vesicle (vesicle+C26), glial cells with complete vesicle treated with *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), trolox (TRO), and rosuvastatin (RSV). Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \*\*\* $p$  < 0.001 compared to DMEM group. ## $p$  < 0.01 compared to

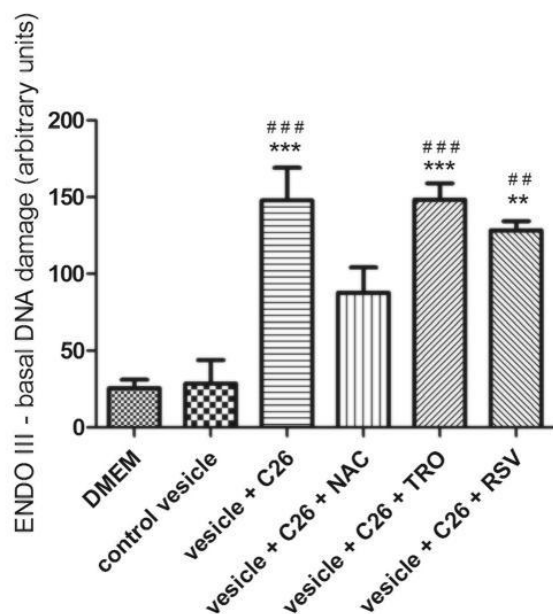
control vesicle group. & $p$  < 0.05 compared to vesicle+C26 group. One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test. **b** DNA damage by comet assay (x400). The cells were classified according to tail length. Class 0 (undamaged—no tail) until Class 4 (maximum migration)

complete vesicle, but not significantly (vesicle + C26). TRO and RSV have not altered oxidative DNA damage presented by cells exposed to hexacosanoic acid [ $F(5,12) = 16.97$ ,  $p < 0.0001$ ].

### Enzymatic Antioxidant Defenses

SOD and CAT enzymes work in sequence to reduce the superoxide anion to water. Figure 4a demonstrates that CAT activity was five times higher in glial cell exposed to C26:0 than native glial cell and than glial cell enriched with





**Fig. 3** Oxidative DNA damage in native glial cells (DMEM), glial cell with lecithin-control vesicle (control vesicle), glial cells with complete vesicle (vesicle+C26), glial cells with complete vesicle treated with *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), trolox (TRO), and rosuvastatin (RSV). Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  compared to DMEM group. ## $p < 0.01$  and ### $p < 0.001$  compared to control vesicle group. One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test

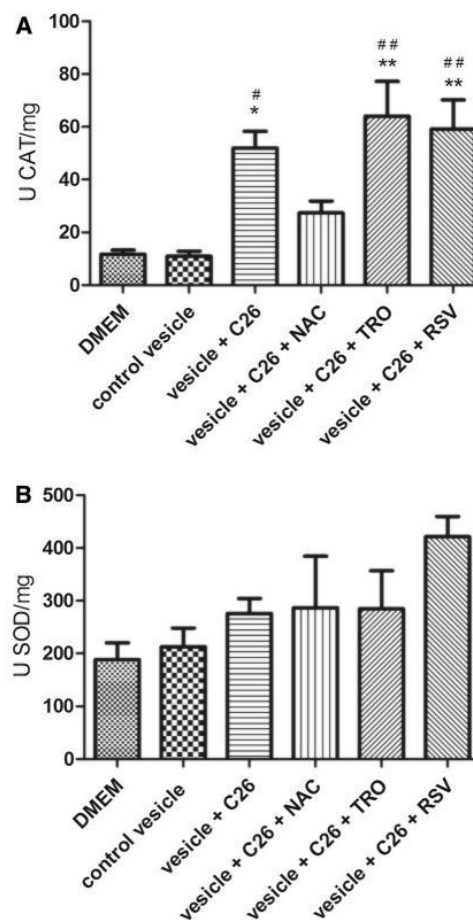
lecithin vesicle (control vesicle) [ $F(5,12) = 9.49, p < 0.001$ ]. Figure 4b shows that SOD activity did not differ from the studied groups [ $F(5,12) = 2.05, p > 0.05$ ]. Besides, the antioxidants treatment did not affect the enzymes activity in glial cells exposed to C26:0. It may be observed that NAC treatment attempted to reduce the CAT activity; however, it was not significant statistically.

### Nitrate and Nitrite Cellular Levels

It was verified that glial cells exposed to C26:0 produced 90% more NO equivalents compared to native glial cell (DMEM) and approximately 76% more NO compared to glial cells incubated with lecithin vesicle (control vesicle). Additionally, when NAC, TRO, and RSV were added to glial cells exposed to C26:0, they were able to significantly reduce more than three times the levels of nitrite and nitrate (Fig. 5) [ $F(5,12) = 139.20, p < 0.0001$ ].

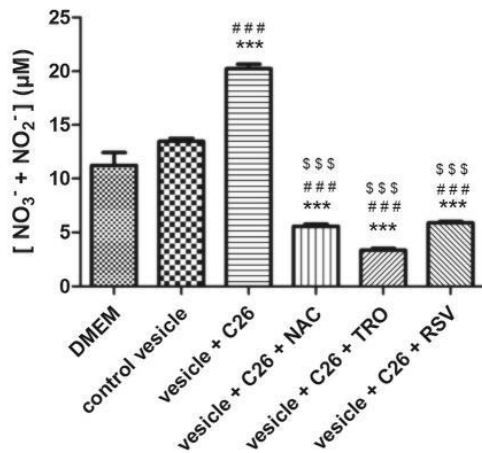
### IL-1 $\beta$ Levels

It can be observed in Fig. 6 that, in the presence of C26:0 (vesicle + C26), the glial cells have increased

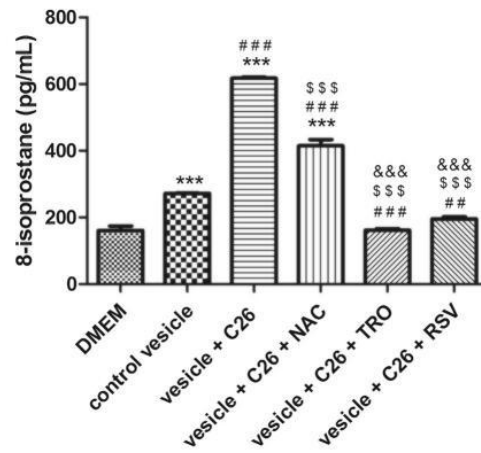


**Fig. 4** a CAT activity in native glial cells (DMEM), glial cell with lecithin-control vesicle (control vesicle), glial cells with complete vesicle (vesicle + C26), glial cells with complete vesicle treated with *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), trolox (TRO), and rosuvastatin (RSV). Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  and compared to DMEM group. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  and compared to control vesicle group. One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test. b Total SOD activity in native glial cells (DMEM), glial cell with lecithin-control vesicle (control vesicle), glial cells with complete vesicle (vesicle + C26), glial cells with complete vesicle treated with *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), trolox (TRO), and rosuvastatin (RSV). Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test

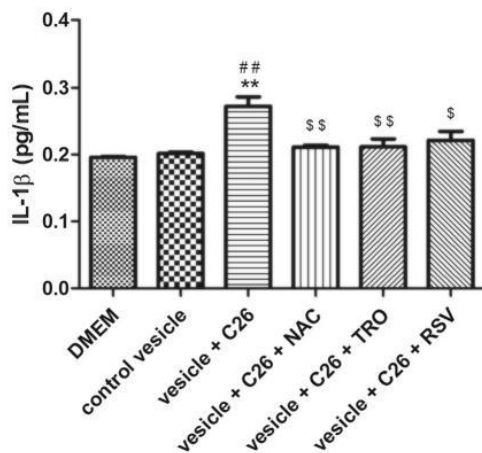
approximately 67% of IL-1 $\beta$  production, compared to native glial cells (DMEM) and to glial cells enriched with lecithin vesicle (control vesicle). Moreover, NAC, TRO, and RSV were effective in significantly decreasing IL-1 $\beta$  levels in almost 40% compared to cells enriched with the acid [ $F(5,12) = 8.48, p < 0.01$ ].



**Fig. 5** Nitrate and nitrite levels in native glial cells (DMEM), glial cell with lecithin-control vesicle (control vesicle), glial cells with complete vesicle (vesicle+C26), glial cells with complete vesicle treated with *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), trolox (TRO), and rosuvastatin (RSV). Results represent mean ± SEM (standard error of the mean). \*\*\* $p < 0.001$  compared to DMEM group. ### $p < 0.001$  compared to control vesicle group. sss $p < 0.001$  compared to vesicle+C26 group. One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test



**Fig. 7** Isoprostane levels in native glial cells (DMEM), glial cell with lecithin-control vesicle (control vesicle), glial cells with complete vesicle (vesicle+C26), glial cells with complete vesicle treated with *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), trolox (TRO), and rosuvastatin (RSV). Results represent mean ± SEM (standard error of the mean). \*\*\* $p < 0.001$  compared to DMEM group. ### $p < 0.001$  compared to control vesicle group. sss $p < 0.001$  compared to vesicle+C26 group. &&& $p < 0.001$  compared to vesicle+C26+NAC group. One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test



**Fig. 6** Interleukin-1 $\beta$  levels in native glial cells (DMEM), glial cell with lecithin-control vesicle (control vesicle), glial cells with complete vesicle (vesicle+C26), glial cells with complete vesicle treated with *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), trolox (TRO), and rosuvastatin (RSV). Results represent mean ± SEM (standard error of the mean). \*\* $p < 0.01$  compared to DMEM group. ## $p < 0.01$  compared to control vesicle group. \$ $p < 0.05$  and \$\$ $p < 0.01$  compared to vesicle+C26 group. One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test

## Isoprostane Levels

Figure 7 demonstrates that glial cells exposed to C26:0 (vesicle + C26) produced 192% more 8-isoprostane levels compared to native glial cell (DMEM) and that lecithin vesicle produced 85% more 8-isoprostane levels compared to native glial cell (DMEM). In the same way, glial cells exposed to the acid (vesicle + C26) produced 113% more 8-isoprostane levels compared to control vesicle (lecithin vesicle).

The antioxidant NAC, when added to glial cells exposed to C26:0, was capable to significantly reduce isoprostane levels in 33% [ $F(5,12) = 330.4$ ,  $p < 0.0001$ ]. Interestingly, only TRO and RSV reduced approximately three times isoprostanes production, until the levels of native glial cell (DMEM).

## Discussion

X-ALD is a complex inherited disease characterized by VLCFA accumulation, in which the same mutation in the ABCD1 gene can lead to clinically very distinct phenotypes (Berger et al. 2014). The molecular mechanism by which the excess of VLCFA triggers oxidative stress in X-ALD is still unclear. However, it is important to note that VLCFA are usually found as constituents of complex lipids and may incorporate into membranes, causing destabilization of cell

membranes or disturbance of the cell microenvironment, which may lead to dysfunction and death (Hein et al. 2008).

Glial cells seem to be involved in the progress of X-ALD, since microglia is most likely activated to release proinflammatory cytokines in cooperation with astrocytes (Fourcade et al. 2015). Considering that it is currently completely unknown how brain cells react to VLCFA accumulation, we aimed to investigate the toxic effects of C26:0 in C6 glial cells and the protective role of three antioxidant compounds NAC, TRO (hydrosoluble analogue of tocopherol), and RSV on the cell exposed to C26:0.

In this work, we verified that the lecithin vesicle containing C26:0 was effective in promoting the acid uptake by the cells, since we found a concentration at 0.16  $\mu\text{M}$  C26:0/g of protein in glial cells. When we observed the viability assays, it was possible to conclude that the acid did not impair cell growth, because all the studied groups presented a viability cell percentage approximately 70% (trypan blue) and 85% (neutral red) when compared to native glial cells growth. A reduced number of viable cells in the presence of lecithin is expected, since lecithin is a natural mixture of phospholipids and neutral lipids, and therefore it can penetrate the membranes causing cellular destabilization. Besides that, the literature has already described a decrease in cell viability in the presence of liposomes and nanoparticles containing lecithin (Xu and Wu 2009; Taner et al. 2014).

Many previous studies have been considering that oxidative stress has an important role in X-ALD pathophysiology. (Moser et al. 2001, 2007; Vargas et al. 2004; Deon et al. 2007, 2008a, b; Marchetti et al. 2015). Free radicals can cause damage to biomolecules such as proteins, lipids, and DNA (Halliwell and Gutteridge 2007). Throughout evolution, cells have developed many mechanisms that protect DNA molecules from damage, whether these mechanisms fail, deleterious consequences may occur, like mutations, deletions, cancer and even cell death (Cooke et al. 2006; Moraes et al. 2012). Recently, DNA damage was described in leukocytes from X-ALD patients and it was also reported the protective effect of NAC, TRO, and RSV on leukocytes DNA damaged (Marchetti et al. 2015). In our work, we verified that glial cells exposed to C26:0 have showed increased DNA damage index, compared to control cells (native glial cells and the cells incubated with control vesicle). Also, we found that control cells treated only with the lecithin vesicle had approximately 10% more damage compared to the native control cells (DMEM group); however, it is not considered statistically significant. Moreover, NAC, TRO, and RSV, when added to the glial cells, were capable to reduce DNA damage induced by the C26:0 enriched-glial cells. Considering that a digestion step with Endo III, which is a repair enzyme that removes a spectrum of oxidized DNA bases, was added to the comet assay, we may assert that the DNA cell damage, caused by C26:0, had an oxidative origin.

Additionally, only NAC appeared to be effective in reducing DNA damage in the cells exposed to acid. Our hypothesis is that TRO and RSV may be related to correction oxidative damages to other DNA bases, considering that Endo III recognizes only oxidized pyrimidines (including thymine glycol and uracil glycol) (Moraes et al. 2012).

SOD is an antioxidant enzyme present in all aerobic organisms, which catalyzes the dismutation of two superoxide anion radicals forming  $\text{H}_2\text{O}_2$  and oxygen. CAT controls  $\text{H}_2\text{O}_2$  levels, transforming two  $\text{H}_2\text{O}_2$  molecules into water and oxygen (Halliwell and Gutteridge 2007). Our results showed that glial cells exposed to C26:0 presented higher CAT activity compared to control cells (native glial cells and cells enriched with control vesicle). Glial cells exposed to the acid did not alter total SOD activity; therefore, we might infer that there is a high formation of the substrate  $\text{H}_2\text{O}_2$ , from different metabolic routes, and an enzymatic oxidative imbalance in cellular environment. Besides, the antioxidant treatment did not affect the enzymes activity in glial cells exposed to C26:0. An in vitro study using cultured human fibroblasts enriched with high doses of C26:0 and TRO demonstrated that this antioxidant prevented the induction of the SOD enzyme against C26:0 treatment. Additionally, Vargas et al. (2004) have found that erythrocytes of CCER patients showed a moderate increase in glutathione peroxidase (GPx) activity, whereas the CAT and SOD enzymes showed a marked increase. The alteration of these enzymes activity occurs probably in response to the high level of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and superoxide anion ( $\text{O}_2^-$ ) that are being formed (Vargas et al. 2004).

NO is an important regulator of physiological processes in the central nervous system. However, at pathological levels, NO adversely affects brain function producing nitritative stress (Virarkar et al. 2013). The final products of NO in vivo are nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) and nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ). In this work, we verified that glial cells exposed to C26:0 produced elevated NO levels compared to control cells (native glial cells and cells enriched with control vesicle). Moreover, NAC, TRO, and RSV were able to reduce NO levels in the glial cell exposed to C26:0 below control levels. Similar results have already been found in the literature, since Di Biase et al. (2004) verified that glial cells in the presence of C26:0 and LPS (*E. coli* lipopolysaccharide) produced high levels of nitrite and nitrate. However, we observed an average of 20  $\mu\text{M}$  NO released by the cells, and Di Biase and co-workers averaged 9  $\mu\text{M}$  NO (in the presence of LPS).

In the cells, hexacosanoic acid is converted to hexacosanoic acid methyl-ester and it was recently reported that hexacosanoic acid methyl-ester induced more cell damage, since it reached the cells faster (Van de Beek et al. 2017). Besides, fibroblasts of X-ALD patients, when exposed to C26:0 methyl-ester, suffered lipoapoptosis (Van de Beek et al. 2017). It is important to note that we have used C26:0

methyl-ester in our vesicle preparation, contrary to Di Biase, which could explain, at least in part, the different results.

The prominent inflammatory component of X-ALD raises the question whether the destruction of myelin could be mediated in part by an immunopathological process. It has been speculated that VLCFA induced apoptosis of oligodendrocytes resulting in activation of microglia and secretion of cytokines (Kemp and Wanders 2010). IL-1 is one of the most widely studied cytokines in terms of its role in neurodegeneration. Marchetti et al. (2018) have reported that X-ALD patients presented increased IL-1 $\beta$  levels, compared to normal subjects. Our results demonstrated that glial cells exposed to C26:0 enhanced IL-1 $\beta$  production compared to control cells (native cells and cells exposed to control vesicle). In addition, NAC, TRO, and RSV were effective in significantly reducing these levels in the C26:0 exposed glial cells. Di Biase et al. (2004) have evaluated proinflammatory cytokines, including IL-1 $\beta$ , in glial cell culture supernatant incubated with C26:0, LPS, and oxidized low-density lipoproteins and the authors did not find substantial differences between treated and non-treated cells. It should be noted that Di Biase in 2004, different from our study, tested non-esterified C26:0, which is less toxic than methyl-ester (Van de Beek et al. 2017).

In the same context, our results showed that glial cells released higher levels of isoprostanes when were exposed to C26:0, compared to control cells. Furthermore, in control vesicle exposure, the cells enhanced isoprostane production compared to native cells, which was expected, since lecithin is a phospholipid that can suffer oxidation. NAC, TRO, and RSV, when added to glial cells exposed to C26:0, were capable to significantly reduce isoprostane levels until native glial cells. Isoprostanes are prostaglandin-like compounds formed in vivo primarily by free radical-catalyzed peroxidation of arachidonic acid independent of the cyclooxygenase enzyme. In addition to being used as reliable indicators of oxidative stress, 8-isoprostanes exert pharmacological actions on smooth muscles from several tissues and organs, and they play a role in the release of neurotransmitters from the central and peripheral nervous systems (Opere et al. 2008). Lipid peroxidation has already been described in X-ALD. A substantial accumulation of quantitative markers of glycoxidation and lipoxidation and protein lipoxidation in human X-ALD fibroblasts and plasma was reported (Deon et al. 2007; Fourcade et al. 2008). Likewise, Fourcade et al. (2008) showed that the incubation of X-ALD fibroblasts with C26:0 provoked oxidative damage to proteins and lipids, but not in control fibroblasts, suggesting a defective antioxidant defense in X-ALD cells.

It is already known that NAC is an antioxidant and anti-inflammatory drug, and its ability to reduce nitrite release and superoxide anion radical production in glial cell culture is described in the literature (Di Biase et al. 2005).

In our study, this compound reduced inflammation, lipid peroxidation, nitrate stress, and oxidative DNA damage in cultured glial cell exposed to C26:0. In addition, TRO and RSV were also able to reduce inflammation, lipid peroxidation, and nitrate stress. It has been described in the literature that NAC, TRO, and RSV protected leukocytes from X-ALD patients against DNA damage (Marchetti et al. 2015), and protected ATII cells (alveolar type II) against genotoxicity and inflammation through scavenger mechanisms (Messier et al. 2013). Kim et al. (2007) suggest that RSV exerts anti-inflammatory effects via inhibition of adhesion molecules and subsequent neutrophil infiltration.

It is known that C26:0 is an important contributor to neuroinflammation in X-ALD, and it could be involved in oxidative stress and inflammation. Besides, these two metabolic processes are correlated in cells. Considering this, our data demonstrate, for the first time in literature, that C26:0, by itself, induced in glial cells culture: oxidative DNA damage, lipid oxidative damage, antioxidant enzyme imbalance, NO release, and increasing IL-1 $\beta$ . Microglia play a significant role in normal brain physiology by monitoring tissue for debris and pathogens and maintaining homeostasis in the parenchyma via phagocytic activity. Besides, microglia are activated during a number of injury and disease conditions, including neurodegenerative disease. In this context, our findings in cultured glial cell are important to better elucidate physiopathology of X-ALD, which is a severe neuro-metabolic disease. Furthermore, we verified that NAC, TRO, and RSV were capable to attenuate some damage caused by C26:0 in glial cells. The ability of NAC, TRO, and RSV to exert protective effects in glial cell culture might be of relevance as an adjuvant treatment for X-ALD, since there is still no completely satisfactory therapy for this disorder.

**Acknowledgements** This study was supported by Brazilian Foundation *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), and *Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos* (FIPE/HCPA).

### Compliance with Ethical Standards

**Conflict of interest** All authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical Approval** The study was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Number 15-0487).

### References

- Berger J, Forss-Petter S, Eichler FS (2014) Pathophysiology of X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochimie* 98:135–142

- Cooke MS, Olinski R, Evans MD (2006) Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta* 365:30–49
- Deon M, Sitta A, Barschak AG, Coelho D, Pigatto M, Schimitt G et al (2007) Introduction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Int J Dev Neurosci* 25:441–444
- Deon M, Garcia MP, Sitta A, Barschak AG, Coelho D, Schimitt G et al (2008a) Hexacosanoic and docosanoic acids plasma levels in patients with cerebral childhood and asymptomatic X-linked adrenoleukodystrophy: Lorenzo's oil effect. *Metab Brain Dis* 23:43–49
- Deon M, Sitta A, Barschak AG, Coelho D, Terroso T, Schimitt GO et al (2008b) Oxidative stress is induced in female carriers of X-linked adrenoleukodystrophy. *J Neurol Sci* 266:79–83
- Di Biase A, Di Benedetto R, Fiorentini C, Travaglione S, Salvati S, Attorri L, Pietraforte D (2004) Free radical release in C6 glial cells enriched in hexacosanoic acid: implication for X-linked adrenoleukodystrophy pathogenesis. *Neurochem Int* 44:215–221
- Di Biase A, Benedetto R, Salvati S, Attorri L, Leonardi F, Pietraforte D (2005) Effects of L-mono methyl-arginine, N-acetyl-L-cysteine and diphenyliodonium on free radical release in C6 glial cells enriched in hexacosanoic acid. *Neurochem Res* 30(2):215–223
- Dizdaroglu M, Laval J, Boiteux S (1993) Substrate specificity of the *Escherichia coli* endonuclease III: excision of thymine- and cytosine-derived lesions in DNA produced by radiation-generated free radicals. *Biochemistry* 32:12105–12111
- Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J (2000) Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 267:4912–4916
- Engelen M, Barbier M, Dijkstra IM, Schür R, de Bie RM, Verhamme C et al (2014) X-linked adrenoleukodystrophy in women: a cross-sectional cohort study. *Brain* 137:693–706
- Fourcade S, López-Erauskin J, Galino J, Duval C, Naudi A, Jove M et al (2008) Early oxidative damage underlying neurodegeneration in X-adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet* 17:1762–1773
- Fourcade S, Ferrer I, Pujol A (2015) Oxidative stress, mitochondrial and proteostasis malfunction in adrenoleukodystrophy: a paradigm for axonal degeneration. *Free Radic Biol Med* 88:18–29
- Glezer I, Simard AR, Rivest S (2007) Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience* 147:867–883
- Habekost CT, Schestatsky P, Torres VF, de Coelho DM, Vargas CR, Torrez V et al (2014) Neurological impairment among heterozygote women for X-linked adrenoleukodystrophy: a case-control study on a clinical, neurophysiological and biochemical characteristics. *Orphanet J Rare Dis* 9:6
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) Free radicals in biology and medicine, 4 edn. Oxford University, Oxford
- Hanisch UK (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40:140–155
- Hathaway WE, Newby LA et al (1964) The acridine orange viability test applied to bone marrow cells. I. Correlation with trypan blue and eosin dye exclusion and tissue culture transformation. *Blood* 23:517–525
- Hein S, Schönfeld P, Kahlert S, Reiser G (2008) Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture. *Hum Mol Genet* 17:1750–1761
- Jessen KR (2004) Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1861–1867
- Kemp S, Wanders R (2010) Biochemical aspects of X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol* 20:831–837
- Kemp S, Berger J, Aubourg P (2012) X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, metabolic, genetic and pathophysiological aspects. *Biochim Biophys Acta* 1822:1465–1474
- Kim YS, Ahn Y, Hong MH et al (2007) Rosuvastatin suppresses the inflammatory responses through inhibition of c-Jun N-terminal kinase and nuclear factor-kB in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 49(6):376–383
- Kruska N, Schönfeld P, Pujol A, Reiser G (2015) Astrocytes and mitochondria from adrenoleukodystrophy protein (ABCD1)-deficient mice reveal that the adrenoleukodystrophy-associated very long-chain fatty acids target several cellular energy-dependent functions. *Biochim Biophys Acta* 1852:925–936
- Maehly AC, Chance B (1954) The assay of catalases and peroxidases. *Methods Biochem Anal* 1:357–424
- Mangoura D, Sakellaris N, Jones J, Vernadakis A (1989) Early and late passage C-6 glial cell growth: similarities with primary glial cells in culture. *Neurochem Res* 14(10):941–947
- Marchetti DP, Donida B, da Rosa HT, Manini PR, Moura DJ, Saffi J, Deon M, Mescka CP, Daniella Coelho DM, Jardim LB, Vargas CR (2015) Protective effect of antioxidants on DNA damage in leukocytes from X-linked adrenoleukodystrophy patient. *Int J Dev Neurosci* 43:8–15
- Marchetti DP, Donida B, Jacques CE, Deon M, Hauschild TC, Koehler-Santos P, de Moura Coelho D et al (2018) Inflammatory profile in X-linked adrenoleukodystrophy patients: understanding disease progression. *J Cell Biochem* 119(1):1223–1233
- Messier EM, Bahmed K, Tuder RM, Chu HW, Bowler RP, Kosmider B (2013) Trolox contributes to Nrf2-mediated protection of human and murine primary alveolar type II cells from injury by cigarette smoke. *Cell Death Dis* 4:e573
- Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247(10):3170–3175
- Moraes MC, Neto JB, Menck CF (2012) DNA repair mechanisms protect our genome from carcinogenesis. *Front Biosci* 17:1362–1388
- Moser HW, Moser AB (1991) Measurement of saturated very long chain fatty acid in plasma. In: Hommes FA (ed) *Techniques of diagnostic human biochemical genetics*. Wiley-Liss, New York
- Moser HW, Smith KD, Watkins PA, Powers J, Moser AB (2001) X-linked adrenoleukodystrophy. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th edn. McGraw-Hill, New York, p 3257–3301
- Moser HW, Mahmood A, Raymond GV (2007) X-linked adrenoleukodystrophy. *Nat Clin Pract Neurol* 3:140–151
- Opere CA, Ford K, Zhao M, Ohia SE (2008) Regulation of neurotransmitter release from ocular tissues by isoprostanates. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 30(9):697–701
- Repetto G, del Peso A, Zurita JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 3(7):1125–1131
- Rockenbach FJ, Deon M, Marchese DP et al (2012) The effect of bone marrow transplantation on oxidative stress in X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol Genet Metab* 106:231–236
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175(1):184–191
- Taner G, Yeşilöz R, Vardar DO, Şenyiğit T, Özer O, Degen GH, Başaran N (2014) Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of lecithin/chitosan nanoparticles. *J Nanopart Res* 16:2220
- Tolar J, Orchard PJ, Bjoraker KJ, Ziegler RS, Shapiro EG, Charnas L (2007) N-acetyl-L-cysteine improves outcome of advanced cerebral adrenoleukodystrophy. *Bone Marrow Transpl* 39:211–215

- van de Beek M, Ofmana R, Dijkstra I et al (2017) Lipid-induced endoplasmic reticulum stress in X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim Biophys Acta* 1863(9):2255–2265
- Vargas CR, Wajner M, Sirtori LR, Goulart L, Chiochetta M, Coelho D et al (2004) Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim Biophys Acta* 1688:26–32
- Virarkar M, Alappat L, Bradford PG, Awad AB (2013) L-arginine and nitric oxide in CNS function and neurodegenerative diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 53(11):1157–1167
- Xu ZH, Wu QY (2009) Effect of lecithin content blend with poly(L-lactic acid) on viability and proliferation of mesenchymal stem cells. *Mater Sci Eng C* 29:1593–1598

## Affiliations

Desirée Padilha Marchetti<sup>1,8</sup> · Luiza Steffens<sup>2</sup> · Carlos E. Jacques<sup>1</sup> · Gilian B. Guerreiro<sup>3</sup> · Caroline P. Mescka<sup>3</sup> · Marion Deon<sup>3,4</sup> · Daniella M. de Coelho<sup>4</sup> · Dinara J. Moura<sup>2</sup> · Alice G. Viario<sup>5</sup> · Fernanda Poletto<sup>5</sup> · Adriana S. Coitinho<sup>6,7</sup> · Laura B. Jardim<sup>4</sup> · Carmen R. Vargas<sup>1,3,4,8</sup>

Luiza Steffens  
luizasteffens@live.com

Carlos E. Jacques  
carloseduardo.jacques@hotmail.com

Gilian B. Guerreiro  
gilian\_guerreiro@hotmail.com

Caroline P. Mescka  
carolmescka@yahoo.com.br

Marion Deon  
marion\_deon@yahoo.com.br

Daniella M. de Coelho  
dcoelho@hcpa.edu.br

Dinara J. Moura  
dinjamoura@gmail.com

Alice G. Viario  
alicegaier@gmail.com

Fernanda Poletto  
fernanda.poletto@ufrgs.br

Adriana S. Coitinho  
adriana.simon@ufrgs.br

Laura B. Jardim  
ljardim@hcpa.edu.br

do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, Porto Alegre, RS CEP 90035-003, Brazil

<sup>2</sup> Universidade Federal de Ciências de Saúde de Porto Alegre, Rua Sarmento Leite, 245, Porto Alegre, RS CEP 90050170, Brazil

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre, RS CEP 90610-000, Brazil

<sup>4</sup> Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS CEP 90035-003, Brazil

<sup>5</sup> Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P.BOX 15003, Porto Alegre, RS CEP 91501-970, Brazil

<sup>6</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, Porto Alegre, RS CEP 90050-170, Brazil

<sup>7</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, Porto Alegre, RS CEP 90050-170, Brazil

<sup>8</sup> Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS CEP 90.035-003, Brazil

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande

3.2 Capítulo III- Artigo 3: *The protective effect of n-acetyl-L-cysteine and rosuvastatin against oxidative stress in fibroblasts from asymptomatic X-ALD patients: a preliminary study*

Este artigo científico foi submetido ao periódico *Toxicology In Vitro* no formato de short communication

**Title: The protective effect of n-acetyl-L-cysteine and rosuvastatin against oxidative stress in fibroblasts from asymptomatic X-ALD patients: a preliminary study**

Desirèe P. Marchetti <sup>1\*</sup>, Graziela de O. S. Ribas <sup>2</sup>, Bruna Donida <sup>1</sup>, Verônica Brito <sup>3</sup>, Dinara J. Moura <sup>3</sup>, Daniella de M. Coelho <sup>2</sup>, Andryele Z. Machado <sup>2</sup>, Rejane G. Kessler <sup>2</sup>, Adriana S. Coitinho <sup>4,5</sup> and Carmen R. Vargas <sup>1,2\*</sup>

1 Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

2 Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

3 Universidade Federal de Ciências de Saúde de Porto Alegre, UFCSPA. Porto Alegre, RS, Brazil.

4 Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

5 Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Porto Alegre, RS, Brazil.

**Authors e-mails:** desireepmarchetti@gmail.com; grazielaribas@yahoo.com.br; donida.bruna@gmail.com; veronicabrito@faccat.br; dinjamoura@gmail.com; dcoelho@hcpa.edu.br; machadoandryele@gmail.com; rkessler@hcpa.edu.br; adriana.simon@ufrgs.br; crvargas@hcpa.edu.br

**\*Correspondence:** Corresponding author at: Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350. CEP 90.035 003, Porto Alegre, RS, Brasil. Telephone: +55 51 33598011. Telefax: +55 51 33598010. E-mail addresses: desireepmarchetti@gmail.com (Desirèe Padilha Marchetti) and crvargas@hcpa.edu.br (Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmen Regla Vargas)



## **Abstract**

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is an inherited peroxisomal disorder, which is characterized by accumulation of very long chain fatty acids, mainly tetracosanoic (C24:0) and hexacosanoic acid (C26:0) in tissue and blood fluids. Despite the pathophysiology of the disease remains unclear, it is known that fatty acids are toxic to cells in symptomatic forms of X-ALD. In addition, many studies in the literature have shown the role of oxidative stress and adjuvant therapies for X-ALD. In this work we investigated whether antioxidants such as n-acetyl-L-cysteine (NAC) and rosuvastatin (RSV) were capable of altering the reactive species generation, the status redox and nitrate stress found in fibroblasts from X-ALD asymptomatic patients. We demonstrated that asymptomatic X-ALD fibroblasts released high reactive oxygen species compared to controls, and when treated with NAC and RSV these levels were decreased compared to non-treated X-ALD fibroblasts. Moreover, asymptomatic X-ALD fibroblasts presented higher catalase activity, compared to controls, and only NAC was capable of increasing the enzyme activity. These preliminary results indicated that NAC and RSV were able to improve some parameters of oxidative stress in fibroblasts from asymptomatic X-ALD patients and showed the importance of adjuvant therapy with antioxidants for the treatment of asymptomatic patients affected with this severe metabolic disease.

**Keywords**

X-linked adrenoleukodystrophy, fibroblasts, n-acetyl-L-cysteine, rosuvastatin, oxidative stress

**Abbreviation:**

AASA: aminoadipic semialdehyde; AMN: adrenomyeloneuropathy; C22:0: docosanoic acid; C24:0: tetracosanoic acid; C26:0: hexacosanoic acid; CAT: catalase; CCER: childhood cerebral form; CEL: N1-carboxyethyl-lysine; CML: N1-carboxymethyl-lysine; DCF: dichlorofluorescein; GSA: glutamic semialdehyde; HTZ: heterozygote; LA: lipoic acid; LC-C26:0: lysophosphatidylcholine - C26:0; MDAL: N1-malondialdehyde-lysine; NAC: n-acetyl-L-cysteine; NO: nitric oxide; ROS: reactive oxygen species; RSV: rosuvastatin; SOD: superoxide dismutase; VLCFA: very long chain fatty acid; X-ALD: X-linked adrenoleukodystrophy.

## 1. Introduction

X-Linked Adrenoleukodystrophy (X-ALD) is a severe neurodegenerative disorder resulting from defective ABCD1 transporter protein. This gene encodes ALDP protein, which is responsible for mediate peroxisomal uptake of very long chain fatty acid (VLCFA) as well as their CoA-esters. As consequence, the fatty acids, mainly hexacosanoic (C26:0) and tetracosanoic acid (C24:0), accumulate in body fluids, adrenal glands, tissue and plasma of patients (Moser et al. 2001 and 2005).

X-ALD is the most common peroxisomal disorder, occurs in all regions of the world and the estimated birth incidence is 1 in 17,000 newborns (male and female) (Bezman and Moser 1998; Kemp et al. 2001). Moser et al. (2001) described four main phenotypes in X-ALD patients [childhood cerebral form (CCER), adrenomyeloneuropathy (AMN), asymptomatic patients and heterozygotes (HTZ) females]. Asymptomatic individuals are those that have the genetic abnormality and the accumulation of VLCFA in the tissues, however without adrenal and neurological involvement (Moser et al., 2001). The diagnosis of X-ALD consists in the increased concentrations of the VLCFA in serum, as well as by high C24:0/C22:0 (docosanoic acid) and C26:0/C22:0 ratios. However, the mutation analysis is considered the best method to establish the carrier status in women and currently, more than 643 different mutations have been identified for the gene ABCD1 (Moser and Moser 1991; Kemp et al., 2001). In recent years, LC-MS/MS methods were developed to quantify in dried blood spots hexacosanoyl-2-lyso-sn-3-glycerophosphorylcholine, a biomarker demonstrated to be elevated already at birth in

blood of patients with X-ALD and other peroxisomal blood disorders (Turgeon et al. 2015).

Oxidative damage, caused by reactive oxygen and nitrogen species, is an important mediator of neurodegeneration since brain has relatively low levels of antioxidant defenses, high lipid content and catecholamines, which are highly susceptible to free radical attack (Halliwell and Gutteridge 2007). The mechanisms related to tissue damage in X-ALD are not well elucidated; however the literature have demonstrated that oxidative stress is engaged in pathophysiology of the disease (Fourcade et al. 2008; Marchetti et al. 2015; Deon et al. 2016; Van de Beek et al. 2017).

Many studies have shown the potential effects of antioxidants as an adjuvant treatment for symptomatic patients. N-acetyl-L-cysteine (NAC) is a compound with antioxidant and anti-inflammatory activities that has been studied in X-ALD (Di Biase et al. 2005; Tolar et al. 2007; Marchetti et al. 2015). It is an agent with properties that stimulates glutathione synthesis, scavenges free radicals and it has been hypothesized to provide neuroprotective capacity (Harvey et al. 2008; Henderson et al. 1996; Marchetti et al. 2018). Rosuvastatin (RSV) is one of the most potent widely available statins, and is approved for reducing circulating low-density lipoprotein levels (Luvai et al. 2012). Additionally, the literature have verified anti-inflammatory and antioxidant effects of RSV on leukocytes from X-ALD and on glial cells enriched with C26:0 (Marchetti et al. 2015 and 2018).

There have already been works in literature reporting oxidative stress in plasma, leukocytes, fibroblasts and post-mortem brains of symptomatic X-ALD patients (Vargas et al. 2004; Powers 2005; Fourcade et al. 2008; Deon et al.

2008a and b; Marchetti et al. 2015). Considering that our group, in previous studies, has already verified that NAC and RSV were effective in reducing inflammation, oxidative and nitrative stress in symptomatic X-ALD patients, in this work we aimed to analyze the effect of these compounds on oxidative and nitrative stress in fibroblasts from asymptomatic X-ALD patients.

## **2. Material and Methods**

### **2.1 Subjects**

Blood and human primary skin fibroblasts cell lines from asymptomatic patients and healthy subjects were collected through the Genetic Medical Service - Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Subjects' information were described in table 1. Mutation analysis was done as previously described by Pereira and coworkers (2012) and patients had their diagnosis confirmed in our laboratory by plasma C26:0 determination and by blood lysophosphatidylcholine-C26:0 (LC-C26:0) analysis (table 2). The study was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (number 15-0487) and all patients gave informed written consent to participate in the investigation.

### **2.2 Samples collection and preparation**

Plasma was prepared from whole blood samples obtained from fasting individuals (controls and X-ALD patients) by venous puncture with heparinized vials. Whole blood was centrifuged at 1000 x g for 10 minutes. Plasma was removed by aspiration and frozen at - 80°C until analysis. An aliquot of whole blood was added to the filter paper to prepare dried blood spots for LC-C26:0

analysis. The fibroblasts were collected and frozen in liquid nitrogen until the analysis.

### **2.3 Cell culture and antioxidant treatment**

Skin biopsies were taken from patients under local anesthesia and were placed in polyethylene sterile vials (type Falcon T25) for culture cells. The primary and secondary cells were cultured in DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium obtained from GIBCO, Grand Island, NY, USA) containing 5% of fetal bovine serum at 37 °C in a humid atmosphere containing CO<sub>2</sub> 5 % and harvested by treatment with 0.15 % trypsin–0.08 % EDTA in PBS (phosphate buffer saline). At confluence, the antioxidant treatment was performed for 2 hours at 37 °C with NAC (100 µM) and RSV (5 µM) (Marchetti et al., 2018). Cells and supernatants were harvested for analysis of oxidative stress.

### **2.4 Cell viability assay**

The cytotoxicity was evaluated using neutral red uptake assay, in accordance to protocol previously described (Repetto et al. 2008).

### **2.5 Nitrite and nitrate assay**

The quantification of NO equivalents in cell supernatants was performed using the nitrate/nitrite colorimetric assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) according to the manufacturer's instructions.

### **2.6 Protein determination**

The protein concentration in the protein extracts of the fibroblasts after treatments was determined according to the method described by Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard.

### **2.7 Dichlorofluorescein diacetate Oxidation (H<sub>2</sub>DCF-DA) measurement**

The generation of Reactive Oxygen Species (ROS) can be estimated by the method described by LeBel et al. (1992) using H<sub>2</sub>DCF-DA, which, in the presence of ROS, leads to the production of dichlorofluorescein (DCF), a fluorescent product that can be quantified by fluorimetry. A calibration curve was performed with standard DCF (10 µM) and the levels of EROs expressed as µmol DCF / mg protein.

### **2.8 Superoxide Dismutase (SOD) activity**

The activity of SOD was calculated by the method described by Misra and Fridovich (1972). A unit (U) of SOD is defined as the amount of enzyme required to inhibit 50% of adrenaline oxidation, having activity expressed as U SOD / mg protein.

### **2.9 Catalase enzyme activity (CAT)**

The activity of CAT was determined by the method described by Aebi (1984). One unit (U) of CAT is defined as 1 µmol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumed per minute, with activity expressed as U CAT / mg protein.

### **2.10 Fatty acid analysis**

### **2.10.1 LC-C26:0 determination**

Dried blood spot samples from control subjects and X-ALD patients were used LC-C26:0 analysis. The samples were processed based on the method described by Turgeon and collaborators (2015), with some adaptations. The results were expressed as  $\mu\text{g/mL}$ .

### **2.10.2 C26:0 measurement**

C26:0 was analyzed according to the technique by Moser and Moser (1991). The procedure consisted of the preparation of total lipid extract and after a treatment of this extract with methanolic HCl (3N) for the formation of fatty acid methyl esters, which were then purified by thin-layer chromatography. The fatty acid methyl esters purified were extracted with hexane and analyzed by gas chromatography. A Varian gas chromatographer with an HP-5 column (5 % methylphenyl silicone, 0.33 mm film thickness, 0.2 mm inner diameter and 25 m in length), a flame ionization detector, a split/splitless injector, and helium as the mobile phase were utilized. C26:0 concentrations were expressed in  $\mu\text{mol/L}$ . Heptacosanoic acid was used as internal standard.

### **2.11 Statistical analysis**

The results obtained were expressed as mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). Comparisons between the mean values were made through one-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test. Values of  $p < 0.05$  were considered significant. The software used for statistical analysis and graphs was GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA - version 5.0).



### **3. Results**

#### **3.1 Cell viability assay**

Fibroblasts viability were verified by neutral red assay. Fig. 1 demonstrates that there is no significant difference between the groups: controls, non-treated X-ALD fibroblasts, NAC and RSV (X-ALD fibroblasts treated with 100 $\mu$ M of NAC and 5 $\mu$ M of RSV, respectively) [F(3,8) = 1.36,  $p > 0.05$ ]. These results allow us to assert that these antioxidants were not cytotoxic and did not impair cell growth.

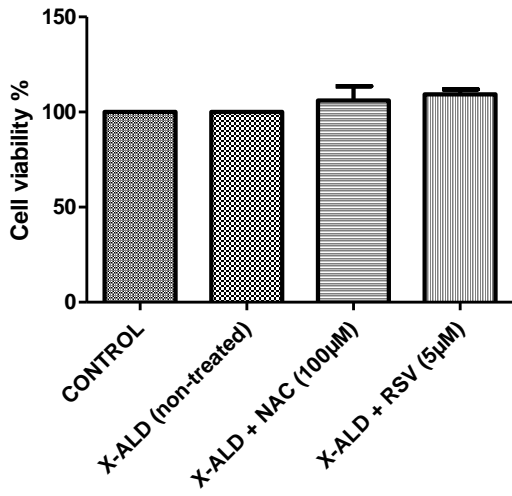
#### **3.2 Markers of oxidative and nitrative stress**

It can be noted in figure 2a that asymptomatic X-ALD fibroblasts released higher ROS levels compared to controls and that NAC and RSV were capable to reduce these levels, compared to non-treated asymptomatic X-ALD fibroblasts. Likewise, the antioxidant NAC was more effective than RSV in reduce these levels [F(3,9) = 40.73,  $p < 0.0001$ ].

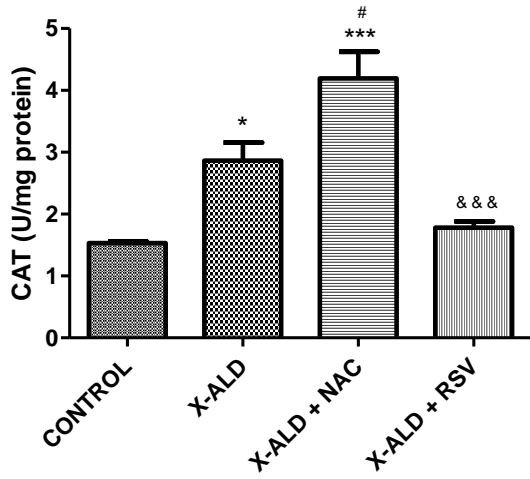
When observing figure 2b and 2c, it is possible to verify that only CAT activity was altered in asymptomatic X-ALD fibroblasts compared to controls, and that only NAC was capable to increase CAT and SOD enzymatic activity [F(3,8) = 21.18,  $p < 0.001$ ] and [F(3,8) = 13.79,  $p < 0.01$ ], respectively; when compared to non-treated asymptomatic X-ALD fibroblasts and to fibroblasts treated with RSV. Nitrative stress was determined by quantification of NO equivalents. Figure 2d shows that there was no difference between the groups. NAC and RSV were not able to alter nitrative stress in asymptomatic X-ALD fibroblasts [F(3,8) = 0.82,  $p > 0.05$ ].

Figures:

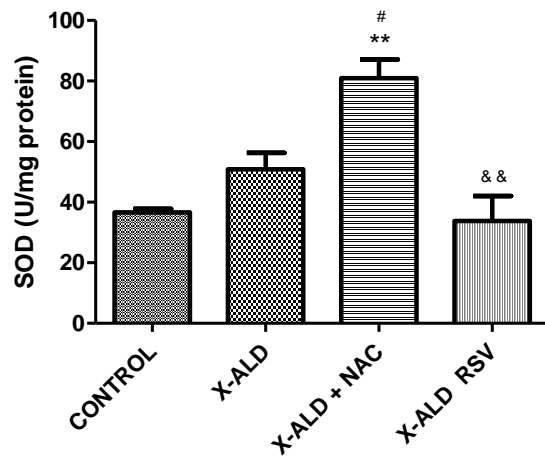
1



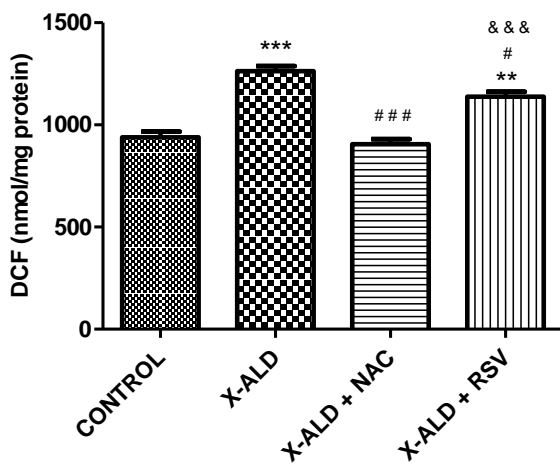
2a



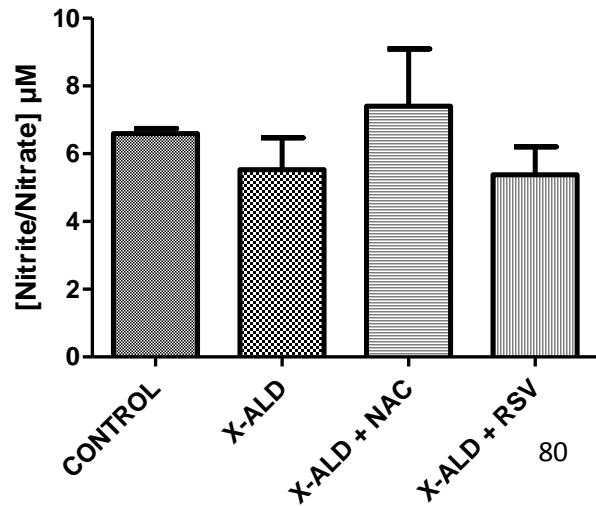
2b



2c



2d



#### **4. Discussion**

Many studies have reported that oxidative stress may be involved on pathophysiology of neurodegenerative disorders. Free radical is a chemical structure with an electron unpaired in its last orbital, occupying an atomic orbital alone, which confers a high reactivity to the molecule (ability to combine nonspecifically with proteins, lipids and DNA) (Halliwell and Gutteridge 2007). To avoid cell damage caused by free radicals formation, biological systems have developed antioxidant defenses capable of converting these reactive species into inactive derivatives. Antioxidants may be enzymatic or non-enzymatic. Among the enzymatic antioxidants are catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (Halliwell and Gutteridge 2007). There are also non-enzymatic antioxidants, which comprise the metal binding proteins, vitamins (such as E, A, C) among others (Halliwell and Gutteridge 2007). The literature has shown that many compounds have antioxidant activity and are being used in the treatment of several diseases, since they have the ability to chelate reactive species and convert them into inactive derivatives, such as NAC and RSV. Oxidative stress occurs when there is an imbalance between the antioxidant capacity and the reactive species formed in favor of the latter, which may occur when there is a decrease in antioxidant defenses and / or an increase in the intracellular concentration of reactive species (Halliwell and Gutteridge 2007).

In this work, we investigated the effects of NAC and RSV on oxidative and nitrative stress in X-ALD fibroblasts from asymptomatic patients. We verified that asymptomatic X-ALD fibroblasts released higher ROS levels compared to controls and that NAC and RSV were able to reduced ROS

formation, in comparison with non-treated fibroblasts. Moreover, NAC was more effective than RSV. We also shown that asymptomatic X-ALD fibroblasts presented higher CAT activity compared to controls and when these fibroblasts were treated with NAC, they showed an increase in enzymatic activities of SOD and CAT, compared to non-treated asymptomatic X-ALD fibroblasts. In what concern nitrate stress, asymptomatic X-ALD fibroblasts did not present alterations and the antioxidants were not able to alter NO production. Considering our results, we can note that NAC seems to be more potent to reduce oxidative stress asymptomatic X-ALD fibroblasts compared to RSV. Works have demonstrated that NAC supplied the cysteine necessary for glutathione synthesis and has proven to be effective in treating disease-associated oxidative stress (Zafarullah et al. 2003; Atkuri et al. 2007). Moreover, NAC was capable to reduce disulphide bonds in proteins, scavenge free radicals and bind metals to form complexes (Zafarullah et al. 2003).

Several data in literature have reported oxidative changes in plasma, fibroblasts and leukocytes from symptomatic X-ALD patients (Deon et al. 2008a,b and 2016; Fourcade et al. 2008; Marchetti et al. 2015), and many studies have shown the protective effect of antioxidants, such as NAC and RSV, on X-ALD in both in vivo and in vitro experiments (Tolar et al. 2007; Fourcade et al. 2008; Marchetti et al. 2015 and 2018). Marchetti et al. (2015) demonstrated that the antioxidants NAC, trolox (water soluble analog of vitamin E-TRO) and RSV were able to reduce DNA damage in leukocytes from symptomatic X-ALD patients. Likewise, Marchetti et al. (2018) verified that glial cells enriched with C26:0 induced oxidative DNA damage, lipid oxidative damage, antioxidant enzyme imbalance, NO release and increased levels of

IL-1 $\beta$ . Besides, these authors verified that NAC, TRO and RSV were capable to attenuate some damage caused by C26:0 in glial cells (Marchetti et al. 2018).

Corroborating with our work, Vargas and coworkers in 2004 have observed a significant increase of CAT activity in fibroblasts from symptomatic X-ALD patients compared to controls. Additionally, Powers et al. (2005) examined Mn-SOD expression in skin fibroblasts derived from normal individuals and symptomatic X-ALD patients and found evidence for increased expression of Mn-SOD in X-ALD that was consistent with a response to oxidative stress. In the same context, Fourcade et al. (2008) have reported that fibroblasts from X-ALD patients (CCER and AMN phenotypes) showed marked increases in oxidative, glycoxidative and lipoxidative damages, represented by N1-malondialdehyde-lysine (MDAL), N1-carboxyethyl-lysine (CEL), N1-carboxymethyl-lysine (CML), amino adipic semialdehyde (AASA) and glutamic semialdehyde (GSA). The authors have also observed an antioxidant response when incubating the X-ALD fibroblasts and their controls with C26:0, since the expression of SOD2 was induced in the C26:0 presence. All markers, lipoxidative (MDAL), glycoxidative/lipoxidative (CEL, CML) and protein oxidative (GSA, AASA), roughly doubled their level in the fibroblasts samples derived from symptomatic X-ALD patients. In addition, it was verified that TRO prevented SOD-2-induction in human fibroblasts, and corrected levels of oxidative lesion markers in patients' fibroblasts (Fourcade et al. 2008). In 2010, Fourcade and colleagues reported that valproic acid induces ABCD2 gene expression in the fibroblasts of symptomatic X-ALD patients and reduces oxidative damage to proteins (Fourcade et al., 2010).

López-Erauskin et al. (2011) have suggested that an early and carefully tailored antioxidant intervention using an cocktail could be a plausible therapeutic option for AMN patients, who do not suffer from severe neuroinflammation and demyelination, since they verified the potential of NAC, TRO and lipoic acid (LA) to scavenge reactive oxygen species (ROS) production generated by an excess of C26:0 in symptomatic X-ALD fibroblasts. All three antioxidants were capable individually of normalizing ROS levels after the addition of C26:0. When combining the antioxidants at low doses, a synergistic effect was observed, resulting in a full prevention of ROS accumulation in X-ALD fibroblasts (López-Erauskin et al. 2011). In 2012, these authors have verified that symptomatic X-ALD fibroblasts could not survive when forced to rely on mitochondrial energy production. Further, treatment with antioxidants (NAC and LA) rescued mitochondrial damage markers in X-ALD, including cyclophilin D oxidative modifications (López-Erauskin et al. 2012). Other findings in literature have shown that in X-ALD patients' fibroblasts, excess of C26:0 generated mtDNA oxidation and specifically impairs oxidative phosphorylation triggering mitochondrial ROS production from electron transport chain complexes (López-Erauskin et al. 2013).

Considering our findings presented above, we may conclude that NAC and RSV had potential to improve oxidative imbalance in fibroblasts from X-ALD asymptomatic patients. Future studies with a large number of asymptomatic X-ALD fibroblasts should be done to better elucidate our preliminary results. Even so, these results allow us to infer that antioxidants may be considered as an adjuvant treatment for this severe neurogenetic disorder, especially in

asymptomatic patients that would be treated early, before the onset of neurologic symptoms.

### Figure captions

**Fig 1.** Neutral red viability assay in non-treated X-ALD fibroblasts, X-ALD fibroblasts treated with 100  $\mu$ M of n-acetyl-L-cysteine (NAC) and X-ALD fibroblasts treated with 5 $\mu$ M of rosuvastatin (RSV) (n=3 for each group). Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test.

**Fig. 2.** Oxidative and nitrate stress in control fibroblasts, non-treated X-ALD fibroblasts, X-ALD fibroblasts treated with 100  $\mu$ M of n-acetyl-L-cysteine (NAC) and X-ALD fibroblasts treated with 5 $\mu$ M of rosuvastatin (RSV) (n=3 for each group). (a) catalase CAT activity, (b) superoxide dismutase (SOD) activity, (c) reactive oxygen species (ROS) release (d) nitrite/nitrate levels. Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \* p<0.05, \*\* p<0.01 and \*\*\* p<0.001 compared to controls. # p<0.05 and ### p<0.001 compared to X-ALD group. &&p<0.01 and &&&p<0.001 compared to X-ALD + NAC group. One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test.

**Table 1.** Asymptomatic X-ALD patients and healthy age-matched controls' data.

<b>Subjects</b>	<b>Ages (years)</b>	<b>Gender</b>	<b>Sample collection</b>
<b>Patient 1</b>	37	female	Blood
<b>Patient 2</b>	39	female	Blood
<b>Patient 3</b>	38	female	Blood
<b>Patient 4</b>	9	male	Blood and fibroblast
<b>Patient 5</b>	10	male	Blood and fibroblast
<b>Patient 6</b>	11	male	Blood and fibroblast
<b>Mean ± SD</b>	24 ± 15.4	-	-
<b>Control 1</b>	35	female	Blood
<b>Control 2</b>	36	female	Blood
<b>Control 3</b>	22	female	Blood
<b>Control 4</b>	21	female	Blood
<b>Control 5</b>	10	male	Blood
<b>Control 6</b>	9	male	Blood and fibroblast
<b>Control 7</b>	8	male	Blood and fibroblast
<b>Control 8</b>	38	female	Blood and fibroblast
<b>Mean ± SD</b>	22 ± 12.7	-	-



**Table 2.** Concentrations of hexacosanoic acid (C26:0) and lysophosphatidylcholine-C26:0 (LC-C26:0) in controls and X-ALD patients

<b>Subjects</b>	<b>C26:0 (<math>\mu\text{mol/L}</math>) (in plasma)</b>	<b>LC-C26:0 (<math>\mu\text{g/mL}</math>) (in whole blood)</b>
Healthy controls (n=8)	0.35 $\pm$ 0.10	0.51 $\pm$ 0.07
X-ALD males (n=3)	0.80 $\pm$ 0.17	0.80 $\pm$ 0.17 *
X-ALD females (n=3)	1.35 $\pm$ 0.45 **	1.12 $\pm$ 0.17 *** and #

\*p<0.05 and \*\*\*p<0.001 compared to controls. #p<0.05 compared to X-ALD females. Results represent mean  $\pm$  SD (standard deviation). One-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test.

## **Conflict of interest disclosure**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## **Informed Consent**

All procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. Informed consent was obtained from all patients for being included in the study.

## **Acknowledgements**

This study was supported by Brazilian Foundation Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA). The authors also thank the patients, their families and the staff from Serviço de Genética Médica/Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

## References

Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121–126.

Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA (2007) N-Acetylcysteine: a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr Opin Pharmacol* 7(4):355-9.

Bezman L, Moser HW (1998) Incidence of X-linked adrenoleukodystrophy and the relative frequency of its phenotypes. *Am J Med Genet* 76:415– 419.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–54.

Deon M, Garcia MP, Sitta A, Barschak AG, Coelho D, Schimitt G, et al. (2008a). Hexacosanoic and docosanoic acids plasma levels in patients with cerebral childhood and asymptomatic X-linked adrenoleukodystrophy: Lorenzo's oil effect. *Metab Brain Dis* 23:43–49.

Deon M, Sitta A, Barschak AG, Coelho D, Terroso T, Schimitt GO, et al. (2008b). Oxidative stress is induced in female carriers of X-linked adrenoleukodystrophy. *J Neurol Sci* 266:79–83.

Deon M, Marchetti DP, Donida B, Wajner M, Vargas C (2016). Oxidative Stress in Patients with X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Cell Mol Neurobiol* 36(4):497-512.

Di Biase A, Benedetto R, Salvati S, Attorri L, Leonardi F, Pietraforte D (2005) Effects of L- mono methy-arginine, N-acetyl-l-cysteine and diphenyliodonium on free radical release in C6 glial cells enriched in hexacosanoic acid. *Neurochem Res* 30 (2): 215–223.

Fourcade S, López-Erauskin J, Galino J, Duval C, Naudi A, Jove M, Kemp S, Villarroya F, Ferrer I, Pamplona R, Portero-Otin M, Pujol A (2008). Early oxidative damage underlying neurodegeneration in X-adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet* 17:1762-1773.

Fourcade S, Ruiz M, Guilera C, Hahnen E, Brichta L, Naudi A, Portero-Otín M, Dacremont G, Cartier N, Wanders R, Kemp S, Mandel JL, Wirth B, Pamplona R, Aubourg P, Pujol A (2010) Valproic acid induces antioxidant effects in X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet* 19(10):2005-14.

Halliwell B and Gutteridge JMC (2007) *Free radicals in biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford, 4. ed.

Harvey BH, Joubert C, du Preez JL, Berk M (2008) Effect of chronic N-acetyl-l-cysteine administration on oxidative status in the presence and absence of induced oxidative stress in rat striatum. *Neurochem Res* 33:508–517.

Henderson JT, Javaheri M, Kopko S, Roder JC (1996) Reduction of lower motorneuron degeneration in wobbler mice by N-acetyl-L-cysteine. *J Neurosci* 16:7574–7582.

Kemp S, Pujol A, Waterham HR, van Geel BM, Boehm CD, Raymond GV, et al (2001) ABCD1 mutations and the X-linked adrenoleukodystrophy mutation database: role in diagnosis and clinical correlations. *Hum Mutat* 18:499-515.

LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992) Evaluation of the probe 20,7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5:227–231.

López-Erauskin J, Fourcade S, Galino J, Ruiz M, Schlüter A, Naudi A, Jove M, Portero-Otín M, Pamplona R, Ferrer I, Pujol A (2011) Antioxidants halt axonal degeneration in a mouse model of X-adrenoleukodystrophy. *Ann Neurol* 70(1):84-92.

López-Erauskin J, Galino J, Bianchi P, Fourcade S, Andreu AL, Ferrer I, Muñoz-Pinedo C, Pujol A (2012) Oxidative stress modulates mitochondrial failure and cyclophilin D function in X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain* 135(Pt 12):3584-98.

López-Erauskin J, Galino J, Ruiz M, Cuezva JM, Fabregat I, Cacabelos D, Boada J, Martínez J, Ferrer I, Pamplona R, Villarroya F, Portero-Otín M, Fourcade S, Pujol A (2013) Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in

the peroxisomal disease X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet* 22(16):3296-305.

Luvai A, Mbagaya W, Hall AS, Barth JH (2012) Rosuvastatin: a review of the pharmacology and clinical effectiveness in cardiovascular disease. *Clin Med Insights Cardiol* 6, 17–33.

Marchetti DP, Donida B, da Rosa HT, Manini PR, Moura DJ, Saffi J, Deon M, Mescka CP, Coelho DM, Jardim LB, Vargas CR (2015). Protective effect of antioxidants on DNA damage in leukocytes from X-linked adrenoleukodystrophy patients. *Int J Devl Neuroscience* 43: 8–15.

Marchetti DP, Steffens L, Jacques CE, Guerreiro GB, Mescka CP, Deon M, de Coelho DM, Moura DJ, Viario AG, Poletto F, Coitinho AS, Jardim LB, Vargas CR (2018) Oxidative Imbalance, Nitrative Stress, and Inflammation in C6 Glial Cells Exposed to Hexacosanoic Acid: Protective Effect of N-acetyl-L-cysteine, Trolox, and Rosuvastatin. *Cell Mol Neurobiol* 38(8):1505-1516.

Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170–3175.

Moser HW, Moser AB (1991) Measurement of saturated very long chain fatty acid in plasma. In: Hommes FA (ed) *Techniques of diagnostic human biochemical genetics*. Wiley, New York, pp 177–191.

Moser HW, Raymond GV, Dubey P (2005) Adrenoleukodystrophy: new approaches to a neurodegenerative disease. *JAMA* 294(24):3131-4.

Moser HW, Smith KD, Watkins PA, Powers J, Moser AB (2001) 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.

Pereira FS, Matte U, Habekost CT, et al (2012) Mutations, clinical findings and survival estimates in South American patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *PLoS ONE* 7:e34195.

Powers JM (2005) Adreno-leukodystrophy: oxidative stress of mice and men. *J Neuropathol Exp Neurol* 64(12):1067–1079.

Repetto G, del Peso A, Zurita JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 3(7):1125–1131.

Tolar J, Orchard PJ, Bjoraker KJ, Ziegler RS, Shapiro EG, Charnas L (2007) N-Acetyl-l-cysteine improves outcome of advanced cerebral adrenoleukodystrophy. *Bone Marrow Transpl* 39: 211–215.

Turgeon CT, Moser AB, Mørkrid L, Magera MJ, Gavrillov DK, Oglesbee D, Raymond K, Rinaldo P, Matern D, Tortorelli S (2015) Streamlined determination

of lysophosphatidylcholines in dried blood spots for newborn screening of X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol Genet Metab* 114(1):46-50.

Van de Beek MC, Ofman R, Dijkstra I, Wijburg F, Engelen M, Wanders R, Kemp S (2017) Lipid-induced endoplasmic reticulum stress in X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863(9):2255-2265.

Vargas CR, Wajner M, Sirtori LR, Goulart L, Chiochetta M, Coelho D, Latini A, Llesuy S, Bello-Klein A, Giugliani R, Deon M, Mello CF (2004) Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim Biophys Acta* 1688(1):26-32.

Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M (2003) Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 60(1):6-20.



3.2 Capítulo IV- Artigo 4: *Increased levels of hexacosanoic acid in brain from Wistar rats: a behavioral study*

Este artigo científico foi submetido ao periódico *International Journal of Developmental Neuroscience* no formato de short communication

**Title: Increased levels of hexacosanoic acid in brain from Wistar rats: a behavioral study**

Desirée P Marchetti <sup>1\*</sup>, Daniella de M Coelho <sup>2</sup>, Adriana S Coitinho <sup>3,4</sup>, Edson F M Guzzo <sup>4</sup>, Rafael B Padilha<sup>3</sup>, Gabriel de L Rosa <sup>3</sup>, Carmen R Vargas <sup>1,2\*</sup>.

1 Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

2 Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

3 Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

4 Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Porto Alegre, RS, Brazil.

**Authors e-mails:** desireepmarchetti@gmail.com; dcoelho@hcpa.edu.br; adriana.simon@ufrgs.br; edeson.muller@gmail.com; rafael.bremm@outlook.com ; gabriel.lima@ufrgs.br; crvargas@hcpa.edu.br

**\*Correspondence:**

Corresponding author at: Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350. CEP 90.035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. Telephone: +55 51 33598011. Telefax: +55 51 33598010.

E-mail addresses: desireepmarchetti@gmail.com (Desirée Padilha Marchetti) and crvargas@hcpa.edu.br (Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmen Regla Vargas)

## **Abstract**

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is a peroxisomal metabolic disorder associated with mutations in the ATP-binding cassette, subfamily D, member1 (ABCD1) gene. Practically, all male X-ALD patients develop adrenocortical insufficiency in childhood and progressive myelopathy and peripheral neuropathy in adulthood. However, some male patients develop a fatal cerebral demyelinating disease, cerebral adrenoleukodystrophy. The exact mechanisms underlying brain damage in X-ALD are poorly elucidated, however it is known that hexacosanoic acid (C26:0) accumulation represents a hallmark in the pathogenesis of X-ALD. We sought to examine whether an overload of C26:0 injection in Wistar rats was capable to cause changes in behavior of animals. Using open field task, we showed evidence that animals submitted to C26:0 administration presented a reduced number of crossing and rearings and higher latency to locomotion, 45 minutes after C26:0 injection. The present work yields experimental evidence that C26:0, the main accumulated metabolite in X-ALD, can cause behavior alteration in rats, such as impairment of locomotion, exploratory capabilities and cause reduction of orienting-investigatory responses. These results are preliminary but they are extremely important for future studies relating C26:0 accumulation and locomotor impairment in X-ALD patients.

## **Keywords**

X-linked adrenoleukodystrophy, C26:0, Wistar rats, Open field.

## Abbreviations

ABCD1: ATP-binding cassette, subfamily D, member1, AMN: adrenomieloneuropathy, C26:0: hexacosanoic acid, C24:0: tetracosanoic acid, CCER: cerebral childhood form, VLCFA: very long chain fatty acid, X-ALD: X-linked adrenoleukodystrophy.

## 1. Introduction

X-linked Adrenoleukodystrophy (X-ALD) is a pathology characterized by progressive demyelination of the central nervous system (brain and spinal cord) and peripheral adrenal insufficiency. This progressive neurodegenerative disease has an estimated incidence of 1 in 17,000, and it has been diagnosed in all geographic regions and ethnic group (Kemp et al. 2016). The genetic mutation present in this pathology occurs at the level of the ABCD1 gene at the Xq28 locus of the X chromosome. The affected gene is responsible for the encoding of a peroxisomal protein that is present in the membrane of the peroxisomes and intervenes in the transmembrane transport of the very long chain fatty acids (VLCFA) into the peroxisomes, where the first  $\beta$ -oxidation steps occur. Consequently, VLCFAs, mainly tetracosanoic (C24:0) and hexacosanoic acid (C26:0), accumulate in plasma and tissues, including the white matter of the brain, spinal cord and adrenal cortex (Moser et al. 2001 and 2016). Although the mechanisms related to tissue damage are poorly understood, it is believed that the mainly accumulate metabolite (C26:0) could contribute, at least in part, to pathophysiology of this disease since it is known that C26:0 and C24:0 induce apoptosis in oligodendrocytes, causing activation of the microglia and leading to the secretion of cytokines and free radicals (Moser et al. 2001).

X-ALD presents a variety of phenotypes, and the classification of these is based on the age of onset of symptoms and the main site on the nervous system of the lesions. Literature describes seven main phenotypes in male hemizygotes: childhood cerebral form (CCER), juvenile cerebral form, adult cerebral form, AMN, Addison-only, olivo-ponto-cerebellar and asymptomatics

patients (Engelen et al. 2012). The most frequent phenotypes are CCER and AMN. CCER form appears around 7 years of age, it is the most severe form and it is characterized by a rapid and progressive demyelination and deterioration of the white matter of the brain, which usually begin in parietal-occipital regions. AMN usually arises around the second decade of life. It is characterized by involvement of the spinal cord and peripheral nerves and progresses over decades. It is an axonopathy that involves more severely the distal aspects of the axons with the loss of myelin in the spinal cord. However, some patients with AMN also end up developing cerebral demyelination (Moser et al., 2016; Engelen et al. 2012).

Considering that X-ALD is a disease that affects the nervous system, the symptoms are varied. The patient with the CCER form begins to manifest the symptoms of the disease by losing the ability to move, talk, and feed. There are also vision problems, such as strabismus. The clinical manifestations of X-ALD involve gait problems and difficulties of locomotion, neurological deterioration, retardation, retinal degeneration, facial anomalies, weak muscles, perception problems, loss of memory, vision, hearing, speech, severe dementia, seizures, dysfunction adrenal, urinary incontinence and hepatic hypertrophy. With the progression of the disease, the individual starts feeding through a catheter, has many seizures and in a short time can stay in a coma. Death usually occurs two to four years after the onset of the first symptoms (Engelen et al. 2012 and 2014).

On the other hand, AMN is considered as a milder form of X-ALD compared to CCER, and also present slower progression. Neurological symptoms appear mainly between the 3rd and 4th decade of life. Pure AMN

(without cerebral involvement) is a noninflammatory distal axonopathy that involves the long tracts of the spinal cord and, to a lesser extent, the peripheral nerves. The main clinical manifestations found in these patients are: gradual weakness and stiffness in the legs, weight loss, excessive muscle tone, difficulty walking, visual problems, erectile dysfunction, urinary incontinence, ataxia (movement disorder), muscle atrophy, loss of sensitivity in the legs and sphincter disorders (Moser et al. 2005; Berger and Gärtner 2006).

Considering that our group have already verified changes in glial cells metabolism owing to addition of C26:0 in cell culture (Marchetti et al. 2018b), and it has not yet been described in the literature the behavioral effect of C26:0 administration in rats, in this study we aimed to investigate if an overload of C26:0, by peritoneal injection in wild Wistar rats, may cause behavioral changes in animals.

## **2. Material and methods**

### **2.1 Vesicle preparation**

Eight milligram of egg lecithin (Sigma-Aldrich®) in ethanol were dried under a stream of nitrogen and 4 mg of C26:0 methyl-ester (Sigma-Aldrich®) were added. The sample was suspended in 2.5 mL of sterile water and then sonicated with a microtip (Sonicator Ultrasonic Processor XL - Misonix Incorporated). The same procedure without C26:0 methyl-ester was used to obtain lecithin vesicle used as vehicle control (Di Biase et al. 2004 and 2005).

### **2.2 Animals**

Male Wistar rats were obtained from the central vivarium at Universidade Federal do Rio Grande do Sul at 2-3 weeks of age. Immediately, the animals were placed in polypropylene boxes with the measures of 41x34x16 cm. A maximum of 4 animals per box were placed, which were kept for 12 hours in a light-dark environment at a controlled temperature of  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ . The animals had free access to feed and water. The experiments were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHEW Publication No. (NIH) 80-23 (1985) and approved by the local ethical committee at Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA nº 10814).

### **2.3 Experimental groups**

The animals were divided into eight experimental groups (6 animals in each group): control basal (without injection), control saline (received 100 $\mu\text{L}$  of sodium chloride 0,9g%), lecithin vesicle (15 min), lecithin vesicle (45 min), lecithin vesicle (60 min) (received 100  $\mu\text{L}$  of lecithin vesicle and sacrificed at 15-45-60 minutes after injection, respectively), vesicle + C26 (15 min), vesicle + C26 (45 min) and vesicle + C26 (60 min), (received 100  $\mu\text{L}$  of vesicle enriched with C26:0 methyl-ester, at final concentration of 4 mM, and sacrificed at 15-45-60 minutes after injection, respectively). The animals received all treatments by intraperitoneal injections.

### **2.4 Behavior test**

The rats were submitted to a behavioral task, using the Open Field test, 5 minutes before the sacrifice. For the Open Field test, the animals were placed in an acrylic box whose lower part was divided by black lines in 12 same-sized



quadrants, the rats were placed facing the box wall always in the same quadrant and were left to explore the box freely for five minutes. The open field apparatus consisted of the following measures: 40 cm × 60 cm linoleum floor surrounded on three sides by a 60 cm-high plywood wall and in the front by a 60 cm-high glass wall. Four behavioral parameters were analyzed in rats. Latency (latency to move) is the time it takes the rat to start moving. Crossing the lines represents locomotion and exploration, rearing is when the rat raises the front legs and indicates orienting-investigatory responses. Grooming is when the rats make the movement of scratching the face, and represents anxiety manifestation (Izquierdo 1989). After each test, the floor was cleaned with water and ethanol (70%) to avoid a potential excitatory effect on locomotion produced by the presence of urine or fecal residues.

## **2.5 Brain microdissection and tissue preparation**

At the end of the study, the animals were sacrificed by decapitation and the brains were immediately removed and kept on an ice-plate. Total brains were dissected and kept chilled until homogenization. The brain tissues were homogenized in 1:5 (w/v) saline solution (0.9 % NaCl). The homogenate was centrifuged at 800×g for 10 min at 4 °C, and the supernatant was used to determine C26:0 concentration.

## **2.6 Fatty acid analysis**

C26:0 were analyzed according to the technique by Moser and Moser (1991). The procedure consisted of the preparation of total lipid extract and after a treatment of this extract with methanolic HCl (3N) for the formation of fatty

acid methyl esters, which were then purified by thin-layer chromatography. The fatty acid methyl esters purified were extracted with hexane and analyzed by gas chromatography. A Varian gas chromatographer with an HP-5 column (5 % methylphenyl silicone, 0.33 mm film thickness, 0.2 mm inner diameter and 25 m in length), a flame ionization detector, a split/splitless injector, and helium as the mobile phase were utilized. C26:0 concentrations were expressed in  $\mu\text{mol/L}$ . Heptacosanoic acid was used as internal standard.

## **2.7 Statistical analysis**

The results obtained were expressed as mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). Comparisons between the mean values were made through one-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test. Values of  $p < 0.05$  were considered significant. The software used for statistical analysis and graphs was GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA - version 5.0).

## **3. Results**

### **3.1 C26:0 concentrations in total rats' brain**

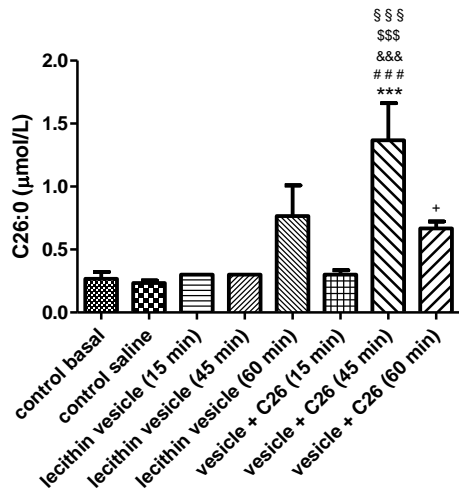
Figure 1 shows the C26:0 concentration in total rats' brain of each eight studied group. It can be observed that the rats that received peritoneal injection of C26:0 in a lecithin vesicle and were sacrificed at 45 minutes presented higher C26:0 brain concentration, compared to the other groups [F(7,40)=8.08,  $p < 0.0001$ ].

### 3.2 Behavior tests

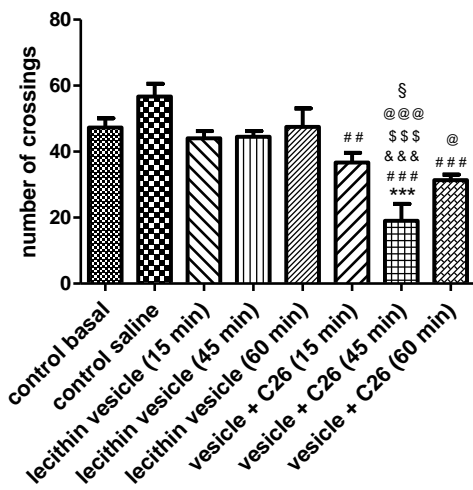
Results obtained from Open Field task were demonstrated in figure 2. Figure 2a showed reduced locomotion and exploratory capabilities (represented by decreased number of crossings) in rats that received injection of lecithin vesicle and C26:0, with sacrifice time at 45 minutes after injection, compared to other groups [ $F(7,40)=10.74$ ,  $p<0.0001$ ]. Corroboration with that, it can be observed in figure 2b rats that received injection of lecithin vesicle and C26:0, with sacrifice time at 45 minutes presented higher latency to locomotion (expressed in seconds) compared to other groups [ $F(7,38)=6.59$ ,  $p<0.0001$ ]. Likewise, the figure 2c showed that the rats belonging to this group presented reduction of orienting-investigatory responses (showed by number of rearings) [ $F(7,40)=5.41$ ,  $p<0.0001$ ]. Figure 2d represents anxiety manifestation (number of groomings) and it was not observed significantly difference between the rats behavior in eight studied groups [ $F(7,40)=0.67$ ,  $p>0.05$ ].

# Figures

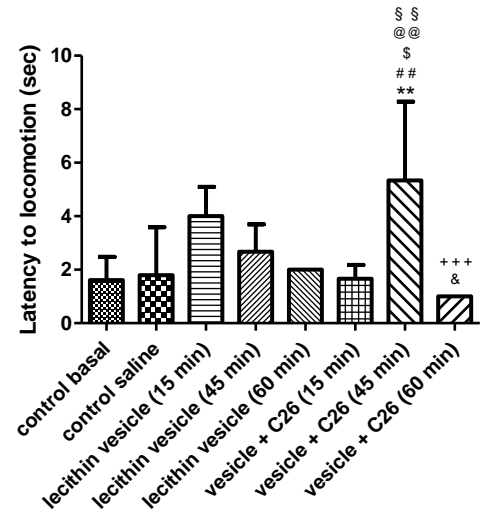
1.



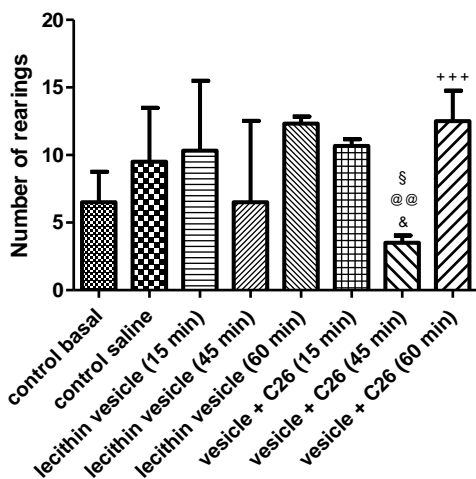
2a.



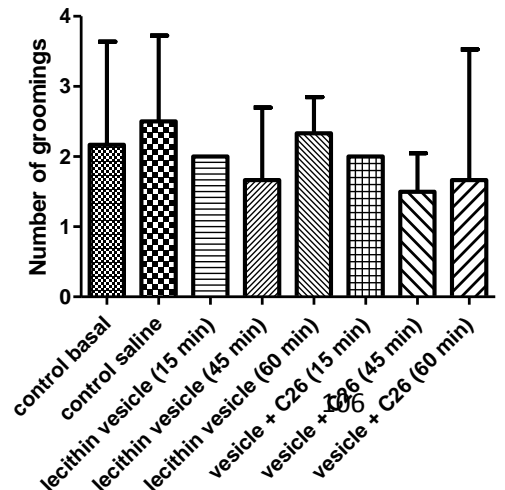
2b.



2c.



2d.



#### 4. Discussion

X-ALD is an inborn error of peroxisome metabolism, which is characterized by progressive demyelination of the white matter and adrenal insufficiency. Mutations in ABCD1 gene result in several phenotypic variants that vary in onset age, disease progress rate, and primary affected tissue. In this work, we investigated whether an overload of C26:0 (the mainly accumulated metabolite in X-ALD), by peritoneal administration, might induce behavioral changes in male Wistar rats.

Here, we presented compelling evidence that a lecithin vesicle enriched with C26:0 is able to reach the brain and attain a peak concentration after 45 minutes of sacrifice. Observing figure 1, we can note that C26:0 concentration is significantly higher in the group "vesicle + C26 " with a sacrifice time at 45 minutes, compared to the other groups, mainly compared to the group whose sacrifice time was 15 and 60 minutes. In addition, we can see the kinetics of the acid, since after one hour of sacrifice its concentration decreases again, being equal to the other groups. It probably occurs because the fatty acid is being oxidized inside the peroxisome, since rats are not knockouts and do not have dysfunction in the ABCD1 gene. According to literature, in X-ALD knockout mice, surprisingly, there is no detectable elevation of C24:0 or C26:0 in plasma, and our results corroborated with them (data not shown) (Lu et al. 1997). Furthermore, the same authors have reported a 5-fold increase of C26:0 level in knockout rats brain, compared to other tissues. In this work we verified that the Wistar rats which had C26:0 peritoneal administration and were sacrificed time at 45 minutes presented an average of 1.37  $\mu\text{mol/L}$  of C26:0, which would

approach plasmatic levels of male X-ALD patients. In humans, the diagnosis of X-ALD is usually made by measuring VLCFA levels in plasma (Moser and Moser 1991) and male patients present an average range between 1,36-4,94  $\mu\text{mol/L}$  of C26:0 concentration, female heterozygotes an average range between 1,41-2,33  $\mu\text{mol/L}$  and healthy individuals present an average range between 0,11-0,96  $\mu\text{mol/L}$  (Marchetti et al. 2018a).

Behavioral tests are important to biomedical research for testing novel treatments, investigating currently used drugs or mechanistic studies. The open field task is one of the most commonly used tests to measure behaviors in animals. It is a fast and relatively easy test that provides a variety of behavioral information ranging from general ambulatory ability to data regarding the emotionality of the subject animal (Walsh and Cummins 1976). We performed open field test and assessed the number of crossings, number of groomings, number of rearings and latency to locomotion. Based on behavior tests, we reported, in this study, that Wistar rats submitted to C26:0 administration developed acute impairment to central nervous system, once they presented sloppiness to start locomotion, decreased exploratory capabilities and reduction of orienting-investigatory responses.

It is important to highlight that these changes were observed in rats that were sacrificed at 45 minutes, suggesting that these results express the kinetics of acid degradation, since the effects at sacrifice time of 15 minutes were still not pronounced. Figure 2a demonstrated that rats submitted to C26:0 administration and sacrificed at 45 minutes had a smaller number of crossings compared to the control groups, as well as compared to the group that was submitted to lecithin injection and sacrificed at 45 minutes. Likewise, when we

observed the latency to locomotion time, we can note that animals belonging to "vesicle + C26 - 45 min" presented a higher latency time to move compared to the control groups and compared to the group that received lecithin alone with sacrifice time in 45 minutes. Analyzing these two tests, we can clearly note the exclusive effect of C26:0 under the behavior of animals, and we can also affirm that lecithin (vehicle component of vesicle) has no influence in this behavior test. In what concern number of rearings, it was observed in figure 2c that the rats of group "vesicle + C26 - 45 min" presented decreased numbers compared to the groups lecithin vesicle (15 min and 60 min) and vesicle + C26 (15 min). When we note the group "vesicle + C26 - 60 min" in the behavior tests, it is possible to infer that the acid had already been oxidized after one hour of injection, because the behavior tend to reverse in comparison to group vesicle + C26 - 45 min. Also, we can note in figure 2d (number of groomings) that there was not significantly difference between the rats behavior in eight studied groups, in other words, the rats had no difference in anxiety manifestation.

The work performed by Pujol and coworkers (2002) corroborated with us in what concern behavior alterations. They have shown that older ALD-deficient mice (knockout) exhibit an abnormal neurological and behavior phenotype, starting at around 15 months. Additionally, X-ALD mutant rats at 20 months at age showed severe impairment in motor coordination ability, verified by latency to fall off test and presented a significant reduction of exploratory activities or hipoactivity during crossed bars test. The authors related the behavioral effects with a slower nerve conduction, and with myelin and axonal anomalies detectable in the spinal cord and the sciatic nerve, which would resemble the AMN patients.

However, differently from Pujol et al. (2002), the rats used in our work were young, they were 2-3 weeks of age, the age at which the animals had not yet reached sexual maturity. We might presume that administration of C26:0 in healthy rats induce behavior changes similar to a child with the initial symptoms of the disease, considering that the earliest CCER symptoms are frequently cognitive dysfunction manifested as behavior disturbances. In order to complement our work, more studies would be needed to confirm our hypothesis, for instance, to assess a neuroimaging study with the Wistar rats brain and to increase the time of sacrifice and number of C26:0 injection, to simulate a chronicity of the disease.

Considering above, our data demonstrate, for the first time in literature, that C26:0, by itself, can induce behavior alterations in young Wistar rats at the level of motor capacity, in an acute time of 45 minutes after C26:0 injection. These results are preliminary and should be complemented with histological studies and molecular biology, but they are extremely important and promising for future studies of X-ALD pathophysiology and for understanding the relation between C26:0 accumulation and locomotor impairment in patients.



## Figure captions

**Fig 1.** Concentration of hexacosanoic acid (C26:0) in total rats' brain (n=6 for group). Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \*\*\*p<0.001 compared to control basal group. ###p<0.001 compared to control saline group. &&&p < 0.001 compared to lecithin vesicle (15 min) group. \$\$\$p<0.001 compared to lecithin vesicle (45 min). §§§p<0.001 compared to vesicle + C26 (15 min) group. +p<0.05 compared to vesicle + C26 (45 min) group. Oneway analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test.

**Fig 2.** Open field tasks (n=6 for group). (a) Crossings, (b) latency to locomotion, (c) rearing and (d) grooming. \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001 compared to control basal group. ##p<0.01 and ###p<0.001 compared to control saline. &p<0.05 and &&p<0.001 compared to lecithin vesicle (15 min). \$p<0.05 and \$\$\$p<0.001 compared to lecithin vesicle (45 min). @p<0.05, @@p<0.01 and @@@p<0.001 compared to lecithin vesicle (60 min). §p<0.05 and §§p<0.01 compared to vesicle + C26 (15 min). +++p<0.001 compared to vesicle + C26 (45 min). Results represent mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). Oneway analysis of variance ANOVA followed by Tukey post hoc test.

**Conflict of interest disclosure**

The authors declare that they have no conflict of interest.

**Acknowledgements**

This study was supported by Brazilian Foundation Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA).

**Ethical statement**

The study was approved by the Ethics Committee of Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## References

Berger J, Gärtner J (2006) X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, biochemical and pathogenetic aspects. *Biochim Biophys Acta* 1763(12):1721-32.

Di Biase A, Benedetto R, Salvati S, Attorri L, Leonardi F, Pietraforte D (2005) Effects of l-mono methyl-arginine, N-acetyl- cysteine and diphenyliodonium on free radical release in C6 glial cells enriched in hexacosanoic acid. *Neurochem Res* 30(2):215–223.

Di Biase A, Di Benedetto R, Fiorentini C, Travaglione S, Salvati S, Attorri L, Pietraforte D (2004) Free radical release in C6 glial cells enriched in hexacosanoic acid: implication for X-linked adrenoleukodystrophy pathogenesis. *Neurochem Int* 44:215–221.

Engelen M, Kemp S, de Visser M, van Geel BM, Wanders RJ, Aubourg P, Poll-The BT (2012) X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): clinical presentation and guidelines for diagnosis, follow-up and management. *Orphanet J Rare Dis* 7:51.

Engelen M, Kemp S, Poll-The BT (2014) X-linked adrenoleukodystrophy: pathogenesis and treatment. *Curr Neurol Neurosci Rep* 14(10):486.

Izquierdo I (1989) Different forms of posttraining memory processing. *Behav Neural Biol* 51: 171–202.

Kemp S, Huffnagel IC, Linthorst GE, Wanders RJ and Engelen M (2016) Adrenoleukodystrophy – neuroendocrine pathogenesis and redefinition of natural history. *Nat Rev Endocrinol* 10: 606-15.

Lu JF, Lawler AM, Watkins PA, Powers JM, Moser AB, Moser HW, Smith KD (1997) A mouse model for X-linked adrenoleukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(17):9366-71.

Marchetti DP, Donida B, Jacques CE, Deon M, Hauschild TC, Koehler-Santos P, de Moura Coelho D et al (2018a) Inflammatory profile in X-linked adrenoleukodystrophy patients: Understanding disease progression. *J Cell Biochem* 119(1):1223-1233.

Marchetti DP, Steffens L, Jacques CE, Guerreiro GB, Mescka CP, Deon M, de Coelho DM, Moura DJ, Viario AG, Poletto F, Coitinho AS, Jardim LB and Vargas CR (2018b) Oxidative Imbalance, Nitrative Stress, and Inflammation in C6 Glial Cells Exposed to Hexacosanoic Acid: Protective Effect of N-acetyl-L-cysteine, Trolox, and Rosuvastatin. *Cell Mol Neurobiol* 38(8):1505-1516.

Moser HW, Moser AB (1991) Measurement of saturated very long chain fattyacid in plasma. In: Hommes FA (ed) *Techniques of diagnostic human biochemical genetics*. Wiley-Liss, New York.

Moser HW, Smith KD, Watkins PA, Powers J, Moser AB (2001) 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.

Moser HW, Raymond GV, Dubey P (2005) Adrenoleukodystrophy: new approaches to a neurodegenerative disease. *JAMA* 294(24):3131-4.

Moser A, Jones R, Hubbard W, Tortorelli S, Orsini J, Caggana M, Vogel B, Raymond G (2016) Newborn screening for X-linked adrenoleukodystrophy. *Int J Neonatal Screen* 2: 1-5.

Pujol A, Hindelang C, Callizot N, Bartsch U, Schachner M, Mandel JL (2002) Late onset neurological phenotype of the X-ALD gene inactivation in mice: a mouse model for adrenomyeloneuropathy. *Hum Mol Genet* 11(5):499-505.

Walsh RN, Cummins RA (1976) The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull* 83(3):482-504.

#### 4. DISCUSSÃO GERAL

Os estudos sobre os EIM iniciaram-se na primeira década do século XX quando Archibald Garrod descreveu a alcaptonúria. Em seu clássico artigo eram destacados os aspectos genéticos da doença, que foi uma das primeiras alterações para a qual a herança mendeliana recessiva foi proposta (Garrod, 1902). Hoje, os EIM representam cerca de 10% de todas as doenças genéticas. Geralmente correspondem a um defeito enzimático capaz de acarretar a interrupção de uma via metabólica, levando ao acúmulo de produtos tóxicos. 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 podem ser classificados em três grandes grupos, sendo um deles o grupo dos distúrbios na síntese ou degradação de macromoléculas complexas. Os sintomas das doenças pertencentes a este grupo são permanentes, progressivos, não-dependentes de eventos intercorrentes e não está relacionado à ingestão alimentar. Fazem parte deste grupo as doenças lisossômicas de depósito e as doenças peroxissomais (X-ALD, doença de Refsum, síndrome de Zellweger, etc.) (Saudubray e Charpentier, 2001).

A X-ALD é uma grave doença neurometabólica, e dentre as doenças peroxissomais, é a mais frequente, podendo se manifestar em diferentes faixas etárias. A doença possui uma ampla variedade fenotípica e não há correlação entre genótipo e fenótipo. Todos os pacientes possuem a mutação no gene ABCD1, no entanto, a clínica é altamente diversificada, variando de insuficiência adrenal a desmielinização cerebral rapidamente progressiva e fatal.

O envolvimento de radicais livres e do estresse oxidativo/nitrativo na fisiopatologia de várias doenças que comprometem o SNC vem sendo cada vez mais comprovados. 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 (Halliwell e Gutteridge, 2007). O cérebro é um órgão extremamente suscetível ao ataque de espécies reativas. Ele consome uma alta quantidade de oxigênio por unidade de massa de tecido, e a principal razão para isto é a grande quantidade de ATP que é requerida para conservar a homeostase neuronal intracelular. Adicionalmente, algumas áreas cerebrais são ricas em ferro, o qual é capaz de catalisar a produção de EROs através da reação de Fenton. As membranas neuronais são abundantes em ácidos graxos poliinsaturados que são, particularmente, mais propensos a sofrer peroxidação lipídica pelo ataque de espécies reativas. Outro aspecto que faz com que cérebro seja sensível ao estresse oxidativo é a presença de aminoácidos excitotóxicos e neurotransmissores auto-oxidáveis (dopamina e noradrenalina) (Halliwell, 2006). Por fim, o cérebro possui atividades baixas a moderadas das enzimas SOD, CAT e GPx comparado ao rim e fígado (Halliwell e Gutteridge, 2007).

As espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio possuem uma função dupla, podendo ter efeitos nocivos ou benéficos dependendo das suas quantidades nos sistemas biológicos (Halliwell e Gutteridge, 2007). Os efeitos benéficos ocorrem em baixas a moderadas concentrações e envolvem papéis

fisiológicos relacionados às respostas celulares contra agentes infecciosos, às cascatas de sinalizações e à transcrição gênica. Em contrapartida, a superprodução de radicais livres é deletéria para os organismos vivos, podendo lesar biomoléculas, como lipídios, proteínas e o DNA (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Apesar da fisiopatologia da X-ALD ainda não estar totalmente esclarecida, estudos vem demonstrando que a inflamação possar ser um fator contribuinte para o dano cerebral encontrado nos pacientes e para a progressão da doença. Por isso, no capítulo I (artigo 1) desta tese nós investigamos um painel de 10 citocinas, entre elas: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e GM-CSF (pró e anti-inflamatórias), em plasma de pacientes com três diferentes fenótipos para a X-ALD: assintomáticos, CCER e AMN. Curiosamente, nossos resultados mostraram que pacientes assintomáticos apresentaram níveis plasmáticos mais elevados das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8 e TNF- $\alpha$ , em comparação ao grupo controle. O fenótipo AMN também apresentou níveis aumentados de TNF- $\alpha$  em comparação ao grupo controle. Apesar de não ter sido verificada diferença significativa entre os grupos em relação à IL-6 e IFN- $\gamma$ , observou-se que os pacientes assintomáticos apresentaram tendência ao aumento, quando comparados aos demais grupos, principalmente para a IL-6.

A inflamação periférica desencadeia uma resposta neuroinflamatória envolvendo a BHE, glia e neurônios (Lyman et al, 2014). Assim, nossos resultados poderiam mostrar que o aumento periférico de citocinas pró-inflamatórias podem fornecer informações sobre a progressão das formas assintomáticas para sintomáticas na X-ALD. A estimulação vagal por citocinas



periféricas tem influência direta sobre o SNC, uma vez que é capaz de induzir a uma piora clínica (Fung et al., 2012).

As citocinas anti-inflamatórias são moléculas imunorreguladoras que controlam a resposta pró-inflamatória (Opal e DePalo, 2000). Em relação às citocinas anti-inflamatórias analisadas neste estudo, foi possível observar um aumento nos níveis de IL-4 tanto para AMN quanto para pacientes assintomáticos e um aumento fortemente significativo na concentração de IL-10 no plasma de pacientes assintomáticos comparado a AMN, CCER e controles. Apenas o grupo AMN apresentou níveis mais elevados de IL-5, que é uma citocina com perfil Th2 e atua estimulando a produção, ativação e maturação dos eosinófilos (Simon et al., 2007). Nós especulamos que o aumento de citocinas anti-inflamatórias na X-ALD provavelmente ocorra como uma tentativa de neutralizar o ambiente inflamatório, considerando que as citocinas pró-inflamatórias estão aumentadas. Um estudo desenvolvido por Sheng e colaboradores (1995), utilizando culturas de células microgliais fetais humanas, verificou que a liberação aguda de citocinas pró-inflamatórias poderia promover a liberação subsequente de IL-10, que funcionaria para minimizar os efeitos de citocinas pró-inflamatórias.

Nossos resultados não mostraram diferença significativa entre os níveis plasmáticos de GM-CSF nos grupos estudados, mas os pacientes AMN apresentaram uma tendência ao aumento em comparação com os outros grupos. O GM-CSF é um fator de crescimento natural produzido por vários tipos de células em resposta a uma variedade de estímulos, tem potentes efeitos estimuladores no crescimento e maturação de células hematopoiéticas e está relacionada à resposta Th17 (Dardalhon et al., 2007).

Nossos achados nos permitem inferir que a inflamação nos pacientes X-ALD pode estar relacionada ao acúmulo plasmático de VLCFA, uma vez que houve correlação positiva entre os níveis de C26:0 e as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 em pacientes assintomáticos. Da mesma forma, os níveis de C26:0 foram positivamente correlacionados com IL-8 e GM-CSF em pacientes AMN. Por outro lado, verificou-se correlação negativa entre as citocinas anti-inflamatórias IL-4 e a razão C24:0/C22:0 nos pacientes AMN.

Nossos resultados corroboram com a literatura, uma vez que Di Biase et al. (2001) relataram que pacientes X-ALD pareciam ter uma resposta Th1 predominante. O grupo analisou a produção de IL-2, IL-10, IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  por células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes assintomáticos, AMN e CCER, estimulados por fitohemoaglutinina (PHA) ou lipopolissacarídeo de *E.coli* (LPS). Os resultados mostraram que após a estimulação por LPS, as PBMC ativadas de ambos os pacientes assintomáticos e sintomáticos tiveram um aumento nos níveis de IL-12 e TNF- $\alpha$  em comparação com os controles. Alguns estudos na literatura sugeriram que a produção de citocinas inflamatórias poderia desempenhar um papel nas variações fenotípicas da X-ALD. McGuinness e colaboradores (1995) procuraram determinar se o TNF- $\alpha$  é um componente primário nas lesões inflamatórias. A bioatividade e a atividade específica do TNF- $\alpha$  foram aumentadas em amostras de soro de pacientes com CCER avançada quando comparados com pacientes com AMN, pacientes assintomáticos e controles. O trabalho realizado por Lannuzel et al. (1998) sugeriu que os monócitos de pacientes X-ALD tinham uma alteração intrínseca na via reguladora da produção de TNF- $\alpha$ . Os autores verificaram em pacientes CCER com evolução

aguda que os níveis séricos de TNF- $\alpha$  (mas não IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4 e INF- $\gamma$ ) eram maiores que controles e pacientes X-ALD sem desmielinização cerebral.

Em nosso estudo, os pacientes CCER não apresentaram aumento em nenhuma das citocinas analisadas. É importante notar que 5 dos 8 pacientes CCER incluídos em nosso estudo apresentaram manifestações mais leves e estágios iniciais de envolvimento cerebral. Os sintomas compreendiam características clínicas da síndrome piramidal associada a déficits cognitivos, crises recentes, lentidão progressiva da marcha, agitação psicomotora e hemiparesia. Podemos presumir que os graus de dano cerebral e desmielinização dos pacientes incluídos em nosso estudo são mais leves e provavelmente diferentes daqueles com estágios avançados estudados por McGuinness (1995) e Lannuzel (1998).

Os resultados obtidos neste estudo em relação ao aumento pronunciado de citocinas pró e anti-inflamatórias em pacientes X-ALD assintomáticos nos permitem especular que o aumento plasmático de citocinas inflamatórias nesses pacientes poderia ser considerado um biomarcador precoce de dano cerebral, e também um preditor da progressão da doença em direção ao fenótipo CCER. Além disso, nossa hipótese pode ser reforçada quando analisamos os resultados preliminares dos três pacientes assintomáticos que tiveram acompanhamento até a progressão para o fenótipo cerebral. Estes pacientes assintomáticos, após evoluir para o fenótipo cerebral, apresentavam níveis reduzidos de citocinas. Considerando que as opções de tratamento nesta doença são muito limitadas e que o TMO pode deter ou reverter a progressão clínica apenas em pacientes CCER nos estágios iniciais da doença (Peters et al., 2004), a descoberta de biomarcadores precoces de dano

cerebral e de progressão da doença seria substancial para direcionar o tratamento de pacientes X-ALD assintomáticos.

Além do componente inflamatório, estudos na literatura também demonstraram que o estresse oxidativo possa estar relacionado a fisiopatologia da X-ALD. Já foram verificados danos oxidativos em plasma de pacientes com diferentes fenótipos para a doença, em leucócitos de pacientes, em fibroblastos e em cérebro pós-mortem (Vargas et al., 2004; Powers, 2005; Deon et al., 2007, 2008, 2016; Fourcade et al., 2008; Petrillo et al., 2013; Marchetti et al., 2015). Adicionalmente, o uso de compostos com propriedade antioxidantes e anti-inflamatórias vem sendo proposto como uma alternativa terapêutica em doenças relacionadas ao estresse oxidativo e inflamação, e principalmente, na X-ALD, visto que atualmente nenhum tratamento é completamente satisfatório. A NAC é um agente com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, uma vez que estimula a síntese da GSH, a qual fornece a principal defesa celular contra o dano oxidativo, e também possui habilidade para sequestrar espécies reativas (Ferrari et al., 1995; Harvey et al., 2008; Henderson et al., 1996). TRO é um conhecido análogo hidrossolúvel do alfa-tocoferol (Halliwell e Gutteridge, 2007), o qual age em lipídios peroxil dentro das membranas, reduzindo-os a hidroperóxidos e então, inibindo a propagação da peroxidação lipídica. O alfa-tocoferol interrompe a reação em cadeia, pois sofre auto-oxidação, convertendo-se em um radical durante o processo. Sua forma oxidada pode ser reciclada à forma reduzida pelo ascorbato ou ubiquinona (coenzima Q) (Sies e Stahl, 1995; Wang e Quinn, 1999). A RSV é uma das estatinas mais potentes disponíveis no mercado e é comprovadamente capaz de reduzir os níveis circulantes de lipoproteínas de baixa densidade (Luvai et al., 2012). Achados na

literatura demonstraram que a RSV de forma dose-dependente, mostrou-se protetora frente à peroxidação lipídica induzida pela reação de Fenton, em fígado e cérebro de ratos (Ajith et al., 2008).

Glezer e colaboradores (2007) relataram que o processo de desmielinização cerebral na X-ALD pode ser relacionado à perda de microglia e/ou função anormal da microglia. As células da glia parecem estar envolvidas na progressão da X-ALD, no entanto, não se sabe se a morte celular de oligodendrócitos e, portanto, a desmielinização, é um evento primário ou secundário na doença (Hein et al., 2008). O capítulo II deste trabalho (artigo 2) teve por objetivo investigar se o C26:0, principal metabólito acumulado na X-ALD, seria capaz de induzir inflamação, desequilíbrio oxidativo e estresse nitrativo na X-ALD. Para isso, utilizamos um modelo proposto na literatura (Di Biase et al., 2004), onde células gliais C6 foram incubadas com uma vesícula de lecitina contendo C26:0 em seu interior. Considerando que a NAC, o TRO e a RSV já provaram ser eficazes na proteção de danos em modelos animais e celulares de X-ALD (Di Biase et al. 2005; Fourcade et al. al., 2008; Marchetti et al., 2015), objetivamos estudar o efeito protetor desses três compostos em células gliais C6 expostas a C26:0, ampliando a investigação e estudando processos oxidativos (dano a lipídios e DNA), nitrativos e inflamatórios. Neste trabalho, verificamos, inicialmente, que a vesícula de lecitina com C26:0 foi eficaz em promover a absorção deste ácido hexacosanóico pelas células, uma vez que encontramos uma concentração de 0,16  $\mu\text{M}$  de C26:0 por grama de proteína em células gliais. Quando observamos os ensaios de viabilidade, foi possível concluir que o C26:0 não prejudicou o crescimento celular, pois todos os grupos estudados apresentaram uma porcentagem de viabilidade celular de

aproximadamente 70% e 85% quando comparados ao crescimento das células gliais nativas. Uma redução, não estatisticamente significativa, de células viáveis na presença de lecitina já era esperada, uma vez que a lecitina é uma mistura natural de fosfolipídios e lipídios neutros que pode penetrar nas membranas, causando assim, desestabilização celular (Taner et al., 2014).

Ao longo do processo evolutivo, as células desenvolveram vários mecanismos para proteger seu DNA frente às injúrias e danos, entretanto, se algum mecanismo falhar, sérias consequências podem ocorrer, levando até à morte celular (Cooke et al., 2006; Moraes et al., 2012). Em nosso trabalho, através do ensaio cometa, verificamos que as células gliais expostas ao C26:0 apresentaram aumento do índice de dano ao DNA, em comparação com as células controle (células gliais nativas e células incubadas com vesícula de lecitina). Além disso, as células controle tratadas apenas com a vesícula de lecitina tiveram aproximadamente 10% a mais de dano (não significativo) em comparação com as células controle nativas (grupo DMEM). Ainda, NAC, TRO e RSV, quando adicionados às células gliais, foram capazes de reduzir o dano ao DNA induzido pelo C26:0. Uma outra etapa do ensaio cometa seguiu-se com a adição da enzima endonuclease III (Endo III), que é uma enzima de reparo que remove um espectro de bases de DNA oxidadas. Assim, foi possível afirmar que o dano celular causado por C26:0 era de origem oxidativa. Além disso, apenas a NAC, em presença da Endo III, pareceu ser eficaz na redução do dano ao DNA nas células expostas ao ácido. Nossa hipótese é que o TRO e a RSV podem estar relacionados à correção de danos oxidativos a outras bases de DNA, considerando que Endo III reconhece apenas pirimidinas oxidadas (incluindo timina glicol e uracil glicol) (Moraes et al. 2012).

No que se refere ao estado redox na X-ALD, nossos resultados mostraram que as células gliais expostas ao C26:0 apresentaram maior atividade da CAT em comparação com as células controle (células gliais nativas e células enriquecidas com vesícula de lecitina). As células gliais expostas ao C26:0 não apresentaram alteração da atividade da SOD total, portanto, podemos inferir que há uma alta formação do substrato  $H_2O_2$ , a partir de diferentes rotas metabólicas, e um desequilíbrio oxidativo enzimático no ambiente celular, uma vez que o aumento da atividade da CAT pode ser devido aos altos níveis de  $H_2O_2$  e  $O_2^{\cdot-}$  que estariam sendo formados. Além disso, o tratamento com antioxidantes não afetou a atividade das enzimas nas células gliais expostas ao C26:0.

O NO é um importante regulador dos processos fisiológicos no SNC, entretanto, em níveis patológicos, pode afetar negativamente a função cerebral, levando ao estresse nitrativo (Virarkar et al., 2013). Neste trabalho, verificamos que as células gliais expostas ao C26:0 produziram níveis elevados de NO em relação às células controle (células gliais nativas e células enriquecidas com vesícula de lecitina). Ainda, NAC, TRO e RSV foram capazes de reduzir os níveis de NO nas células gliais expostas ao C26:0 para níveis abaixo dos do grupo controle. Di Biase et al. (2004) verificaram que as células gliais na presença de C26:0 e LPS produziram altos níveis de nitrito e nitrato. No entanto, nós observamos uma média de 20  $\mu M$  de NO liberado pelas células, e Di Biase e colaboradores observaram em média 9  $\mu M$  NO (na presença de LPS). Nas células, o C26:0 é convertido em C26:0 éster-metílico, e foi recentemente relatado que o éster-metílico é capaz de induzir um maior dano celular, uma vez que, por ser um éster, é capaz de atingir as células mais

rapidamente (Van de Beek et al., 2017). Além disso, fibroblastos de pacientes X-ALD, quando expostos ao C26:0 éster-metílico, sofreram lipoapoptose (Van de Beek et al., 2017). É importante notar que usamos o C26:0 éster-metílico na preparação da vesícula, ao contrário de Di Biase et al. (2004), o que poderia explicar, pelo menos em parte, o maior aumento nos níveis de NO encontrados em nosso estudo quando comparado ao de Di Biase.

Considerando que o capítulo I desta tese (artigo 1) mostrou elevados índices de IL-1 $\beta$  em plasma de pacientes X-ALD, e, que a IL-1 é uma das citonas mais estudadas devido ao seu papel na neurodegeneração, nós objetivamos investigar se o C26:0 seria capaz de induzir aumento desta citocina nas células gliais. Assim, os resultados referentes ao artigo 2 demonstraram que as células gliais expostas ao C26:0 aumentaram a produção de IL-1 $\beta$  em comparação com as células controle. Além disso, NAC, TRO e RSV foram eficazes em reduzir significativamente esses níveis na presença do ácido hexacosanóico. Di Biase et al. (2004) avaliaram citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 $\beta$ , em cultura de células gliais incubadas com C26:0, LPS e ox-LDL (lipoproteínas de baixa densidade oxidadas). Os autores não encontraram diferenças substanciais entre células tratadas e não tratadas. É importante ressaltar novamente que esses autores, diferentemente do nosso estudo, testaram C26:0 não-esterificado, que é menos tóxico (Van de Beek et al., 2017).

A peroxidação lipídica já foi descrita em plasma e fibroblastos de pacientes X-ALD (Deon et al. 2007; Fourcade et al. 2008). Os isoprostanos são compostos formados in vivo, principalmente por peroxidação do ácido araquidônico, catalisada por radicais livres, e também são biomarcadores de



dano oxidativo. Neste contexto, nossos resultados mostraram que as células gliais liberaram níveis elevados de isoprostanos quando expostas ao C26:0, em comparação com as células controle. Ainda, quando as células foram incubadas somente com vesícula de lecitina observou-se um aumento na produção de isoprostanos, em comparação com as células nativas, o que já era esperado, uma vez que a lecitina é um fosfolípido que pode sofrer oxidação. NAC, TRO e RSV, quando adicionados a células gliais expostas a C26:0, foram capazes de reduzir significativamente os níveis de isoprostanos, equiparando-se aos níveis das células gliais nativas.

Assim, os dados referentes ao artigo 2 mostram, pela primeira vez na literatura, que o C26:0, por si só, foi capaz de induzir em células gliais: dano oxidativo ao DNA, peroxidação lipídica, desequilíbrio enzimático, liberação de NO e aumento de IL-1 $\beta$ . Também, verificou-se que NAC, TRO e RSV foram capazes de atenuar alguns danos causados pelo C26:0 nas células.

Uma vez que verificamos o efeito de antioxidantes em um modelo celular (células gliais) para a X-ALD, direcionado para o aspecto central da doença, decidimos então estudar o efeito da NAC e da RSV em fibroblastos de pacientes assintomáticos, a fim de termos um entendimento sobre o aspecto periférico em pacientes que ainda não desenvolveram os sintomas. O capítulo III (artigo 3) desta tese teve por objetivo investigar os efeitos da NAC e RSV sobre o estresse oxidativo e nitrativo em fibroblastos de pacientes X-ALD assintomáticos. Verificamos que fibroblastos de pacientes X-ALD assintomáticos liberaram maiores níveis de EROs em comparação a fibroblastos controles, ainda, verificamos que a NAC e a RSV foram capazes de reduzir a formação de EROs, em comparação com fibroblastos não

tratados, entretanto, a NAC foi mais efetiva que a RSV. Nós também mostramos que os fibroblastos incubados com NAC apresentaram um aumento nas atividades enzimáticas de SOD e CAT, comparados aos fibroblastos não tratados. Em relação ao estresse nitrativo, os antioxidantes não foram capazes de diminuir a produção de NO. Considerando nossos resultados, podemos notar que a NAC, em comparação à RSV, parece ser mais potente em reduzir o estresse oxidativo nos fibroblastos de pacientes X-ALD assintomáticos.

Vargas e colaboradores em 2004 observaram um aumento significativo das atividades de CAT e SOD em fibroblastos de pacientes X-ALD em comparação aos controles. Adicionalmente, Powers et al., (2005) examinaram a expressão de Mn-SOD em fibroblastos de indivíduos normais e pacientes X-ALD e encontraram um aumento da expressão de Mn-SOD em fibroblastos X-ALD. No mesmo contexto, Fourcade et al. (2008) reportaram que fibroblastos de pacientes X-ALD (CCER e AMN) apresentaram aumento acentuado nos danos oxidativos, glicoxidativos e lipoxidativos, representados por MDAL, CEL, CML, AASA e GSA. Os autores também observaram uma resposta antioxidante ao incubar os fibroblastos X-ALD e seus controles com C26:0, uma vez que a expressão de SOD2 foi induzida na presença de C26:0. Todos os marcadores, lipoxidativos (MDAL), glicoxidativos/lipoxidativos (CEL, CML) e oxidativos de proteínas (GSA, AASA), praticamente dobraram seu nível nas amostras de fibroblastos derivados de pacientes X-ALD. Além disso, verificou-se que a TRO impediu a indução da SOD-2 em fibroblastos humanos e corrigiu os níveis de marcadores de lesão oxidativa nos fibroblastos dos pacientes (Fourcade et al., 2008). Em 2010, Fourcade e colegas relataram que o ácido

valpróico induziu a expressão do gene ABCD2 nos fibroblastos de pacientes X-ALD e reduziu o dano oxidativo às proteínas (Fourcade et al., 2010).

López-Erauskin et al., (2011) sugeriram que uma intervenção antioxidante precoce e cuidadosamente adaptada usando um coquetel poderia ser uma opção terapêutica plausível para pacientes AMN, que não apresentassem desmielinização grave. Os autores verificaram o potencial de NAC, TRO e ácido lipóico (AL) para diminuir a produção de EROs geradas por um excesso de C26:0 em fibroblastos X-ALD. Todos os 3 antioxidantes foram capazes, individualmente, de normalizar os níveis de EROs após a adição de C26:0. Ao combinar os antioxidantes em doses baixas, um efeito sinérgico foi observado, resultando em uma prevenção do acúmulo de EROs em fibroblastos X-ALD (López-Erauskin et al., 2011).

Então, os resultados do capítulo III nos mostram que há estresse oxidativo em fibroblastos de pacientes X-ALD assintomáticos, e que a NAC e RSV foram eficazes em reduzir o estresse oxidativo nestes fibroblastos.

Considerando que nosso grupo já verificou alterações no metabolismo das células gliais devido à adição de C26:0 na cultura celular (capítulo II), e que ainda não há dados na literatura descrevendo o efeito comportamental de ratos submetidos à administração de C26:0, o capítulo IV (artigo 4) desta tese investigou se uma sobrecarga de C26:0 em ratos Wistar selvagens, poderia causar alterações comportamentais nestes animais. Assim, nós apresentamos evidências de que o C26:0, administrado por via intraperitoneal, envolto por uma vesícula de lecitina, foi capaz de atingir o cérebro dos ratos, com um pico de concentração significativamente maior após 45 minutos de sacrifício, comparado aos demais grupos, principalmente em relação ao grupo cujo tempo

de sacrifício foi de 15 e 60 minutos. Além disso, podemos observar, preliminarmente, a cinética do ácido hexacosanóico, já que após uma hora de sacrifício sua concentração diminuiu novamente, sendo significativamente igual aos outros grupos. Isso provavelmente ocorreu porque o ácido graxo sofreu  $\beta$ -oxidação dentro do peroxissomo, visto que os ratos não eram modelo nocaute e não apresentavam inativação do gene ABCD1. De acordo com a literatura, os camundongos nocaute para X-ALD não apresentaram aumento plasmático de C24:0 ou C26:0, e nossos resultados corroboraram com eles (dados não mostrados) (Lu et al., 1997). Além disso, os mesmos autores relataram um aumento de 5 vezes na concentração cerebral de C26:0 em ratos nocaute, em comparação com outros tecidos (Lu et al., 1997). Os resultados apresentados no artigo 4 desta tese mostraram que os ratos Wistar que tiveram administração peritoneal de C26:0, com tempo de sacrifício de 45 minutos, tiveram uma média de 1,37  $\mu\text{mol/L}$  de C26:0, o que aproximaria aos níveis plasmáticos de pacientes X-ALD hemizigotos. Em pacientes, o diagnóstico de X-ALD é geralmente feito medindo-se os níveis plasmáticos de VLCFA (Moser e Moser, 1991). Segundo a literatura, os hemizigotos apresentam uma variação média entre 1,36-4,94  $\mu\text{mol/L}$  de C26:0, as heterozigotas variam entre 1,41-2,33  $\mu\text{mol/L}$  e indivíduos saudáveis apresentam um intervalo médio entre 0,11-0,96  $\mu\text{mol/L}$  (Marchetti et al., 2018a).

Testes comportamentais em animais são de grande importância para a literatura científica, uma vez que torna possível o estudo e avaliação fisiológica de novos fármacos em ensaios pré-clínicos, e também é possível analisar as hipóteses comportamentais e fisiopatológicas de determinadas doenças. O teste de campo aberto é um dos mais utilizados para avaliar alguns parâmetros

comportamentais em animais. É um teste rápido e relativamente fácil que fornece uma variedade de informações comportamentais que vão desde a capacidade geral de locomoção até dados sobre a emotividade do animal (Walsh e Cummins, 1976).

Realizamos um teste de campo aberto e avaliamos o número de cruzamentos (*crossings*), a frequência de levantar-se (*rearings*), o número de "groomings" (ato de coçar a face) e a latência para locomoção. Com base nos nossos resultados, verificamos que ratos Wistar selvagens submetidos à administração de C26:0 desenvolveram comprometimento agudo do SNC, com diminuição da capacidade locomotora, exploratória e redução de respostas orientadoras-investigativas, uma vez que apresentaram uma maior latência para iniciar a locomoção comparado aos outros grupos. É importante ressaltar que essas alterações foram observadas em ratos sacrificados aos 45 minutos, então esses resultados podem sugerir uma cinética de degradação do ácido, uma vez que os efeitos no tempo de sacrifício de 15 minutos não foram pronunciados. Ainda, verificamos que ratos submetidos à administração de C26:0 e sacrificados aos 45 minutos apresentaram menor número de cruzamento (*crossings*) em relação aos controles, e em relação ao grupo que foi submetido à injeção de somente lecitina, com tempo de sacrifício de 45 minutos. Analisando o tempo de latência e o número de "*crossings*", onde os ratos submetidos à injeção de C26:0 e sacrificados em 45 minutos apresentaram índices significativamente menores, comparados ao grupo que recebeu somente lecitina no mesmo tempo de sacrifício, fica claramente notável o efeito exclusivo de C26:0 sob o comportamento dos animais. Além disso, podemos também afirmar que a lecitina (componente veículo da

vesícula) não influencia o comportamento dos ratos. Em relação ao número de "rearings", foi observado que os ratos submetidos à injeção de vesícula com C26:0 e sacrificados em 45 minutos apresentaram números diminuídos comparados aos grupos vesícula de lecitina (15 e 60 minutos de sacrifício) e vesícula com C26:0 (15 minutos de sacrifício). Quando observamos os ratos submetidos à injeção de vesícula com C26:0 no tempo de 60 minutos de sacrifício, o comportamento dos animais tendeu-se a reverter em relação ao grupo que recebeu o mesmo tratamento com 45 minutos de sacrifício e, portanto, hipotetizamos que o ácido sofreu oxidação após uma hora da administração. Ainda sobre os testes comportamentais, os ratos, nos oito grupos estudados, não apresentaram diferença em um parâmetro relacionado à ansiedade, pois o número de "groomings" não se mostrou significativamente alterado entre os grupos.

O trabalho realizado por Pujol e colaboradores (2002), em animais nocaute para X-ALD, corroborou conosco no que diz respeito às alterações de comportamento. Eles mostraram que camundongos nocaute exibiram um fenótipo neurológico e comportamental anormal, começando em torno de 15 meses. Além disso, aos 20 meses de idade, os animais apresentaram severo comprometimento na capacidade de coordenação motora, verificado pelo tempo de latência, e apresentaram redução significativa de atividades exploratórias durante o teste de barras cruzadas. Os autores compararam estes efeitos comportamentais com um paciente com o fenótipo AMN, cuja manifestação clínica ocorre na vida adulta. Diferentemente de Pujol et al. (2002), os ratos utilizados em nosso trabalho eram jovens, tinham 2-3 semanas de idade. Podemos presumir que a administração de C26:0 em ratos jovens

saudáveis induziu mudanças de comportamento semelhantes às mudanças observadas em uma criança com os sintomas iniciais da doença, considerando que os primeiros sintomas do fenótipo CCER são freqüentemente disfunção cognitiva que se manifesta como distúrbios comportamentais. Diante dos resultados apresentados no capítulo IV, podemos observar que o C26:0, exclusivamente, foi capaz de induzir alterações comportamentais nos ratos Wistar jovens a nível de capacidade motora, em um tempo agudo de 45 minutos após a injeção de ácido hexacosanóico.

Em suma, os resultados apresentados nesta tese mostram, pela primeira vez na literatura, que pacientes X-ALD assintomáticos apresentam elevação dos níveis plasmáticos de citocinas pró e anti-inflamatórias, que este aumento está correlacionado com o acúmulo de VLCFA e que a dosagem destas citocinas poderia ser considerada como biomarcadores precoces de dano neurológico e progressão da doença. Também verificamos que o C26:0 na forma de vesícula de lecitina, ao ser adicionado a células gliais, foi capaz de alterar o status redox, causar peroxidação lipídica, dano oxidativo ao DNA, estresse nitrativo e inflamação. Ainda, NAC, TRO e RSV foram capazes de atenuar alguns danos nas células gliais, e NAC e RSV também foram capazes de reduzir o estresse oxidativo em fibroblastos de pacientes X-ALD assintomáticos. O C26:0 na forma de vesícula de lecitina, ao ser injetado nos ratos Wistar saudáveis, também foi capaz de alterar o comportamento dos animais, pois os ratos apresentaram dificuldades de locomoção, redução da capacidade exploratória e diminuição de respostas orientadoras-investigatórias. Dessa forma, podemos pressupor que o C26:0 é o principal causador dos danos encontrados em pacientes com X-ALD, no que se refere à

neurodegeneração, à dificuldade de locomoção, ao estresse oxidativo e nitrativo e à inflamação. Ainda, esses resultados nos permitem inferir que os antioxidantes poderiam ser considerados como um tratamento adjuvante para a X-ALD, especialmente em pacientes assintomáticos que seriam tratados precocemente, antes do início dos sintomas neurológicos.



## 5. CONCLUSÕES GERAIS

Considerando os resultados apresentados acima, podemos concluir que:

- pacientes X-ALD assintomáticos tem aumento plasmático das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4 e IL-10 comparados aos controles, indicando inflamação,

- pacientes AMN tem aumento plasmático das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4 e IL-5, comparados aos controles, indicando inflamação,

- há correlação entre o aumento plasmático de C26:0 e os níveis de citocinas em pacientes assintomáticos e AMN, sugerindo que este ácido induz inflamação na X-ALD,

- a dosagem de citocinas poderia ser considerada como um marcador de dano precoce e progressão da doença,

- células gliais expostas ao C26:0 (envolto por vesícula de lecitina) apresentaram dano oxidativo ao DNA (medido pelo ensaio cometa e endonuclease III), desequilíbrio oxidativo (elevação da atividade da CAT), estresse nitrativo (aumento dos níveis de NO), inflamação (aumento de IL-1 $\beta$ ) e peroxidação lipídica (aumento dos níveis de isoprostanos) em comparação com as células gliais nativas sem exposição ao C26:0, sugerindo que este ácido induz danos oxidativos, nitrativos, inflamatórios, e desequilíbrio redox em modelo celular da X-ALD,

- NAC, TRO e RSV foram capazes de mitigar alguns danos causados pelo C26:0 nas células gliais, sugerindo potencial antioxidante a nível central na X-ALD,

- NAC e RSV foram capazes de reduzir o estresse oxidativo em fibroblastos de pacientes X-ALD assintomáticos, sugerindo proteção antioxidante em pacientes ainda sem manifestações clínicas,

- ratos Wistar selvagens, submetidos à administração de C26:0 (envolto por vesícula de lecitina) tiveram comprometimento da locomoção, redução da capacidade exploratória e redução de respostas orientadoras-investigatórias, verificadas pelos testes "*crossings*", tempo de latência e "*rearings*", após 45 minutos da injeção do C26:0, sugerindo o envolvimento deste ácido acumulado na fisiopatologia das manifestações neurológicas apresentadas pelos pacientes X-ALD.

## 6. PERSPECTIVAS

- Realizar a cultura de fibroblastos de pacientes X-ALD com um número maior e verificar o efeito de outros compostos antioxidantes, como por exemplo trolox e ácido lipóico sob o dano oxidativo e inflamação,

- Realizar um estudo histológico no cérebro dos ratos Wistar submetidos à injeção de C26:0,

- Realizar marcadores de dano oxidativo/nitrativo e inflamação em soro dos ratos submetidos à injeção de C26:0,

- Desenvolver uma nanopartícula contendo NAC, vitamina E e/ou rosuvastatina,

- Comparar o efeito da NAC, vitamina E e/ou rosuvastatina nas suas formas livres e nanoparticuladas sob o dano oxidativo e inflamação em células gliais (enriquecidas com C26:0) e em fibroblastos de pacientes X-ALD,

- Comparar o efeito da NAC, vitamina E e/ou rosuvastatina nas suas formas livres e nanoparticuladas sob a função mitocondrial em células gliais (enriquecidas com C26:0) e em fibroblastos de pacientes X-ALD.

## 6. REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH (2003) Cellular and Molecular Immunology, 5th ed. Philadelphia: WA Saunders.

Abe M, Maruyama N, Okada K, Matsumoto S, Matsumoto K, Soma M (2011). Effects of lipid-lowering therapy with rosuvastatin on kidney function and oxidative stress in patients with diabetic nephropathy. *J Atheroscler Thromb*, 18:1018-1028.

Ajith TA, Riji T, Anu V (2008). In vitro anti-oxidant and DNA protective effects of the novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor rosuvastatin. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 35:625-629.

Athyros VG, Kakafika AI, Tziomalos K, Karagiannis A, Mikhailidis DP (2009). Pleiotropic effects of statins – clinical evidence. *Curr Pharm Des*, 15:479-489.

Bezman L, Moser AB, Raymond GV, Rinaldo P, Watkins PA, Sith KD, Kass NE, Moser HW (2001). Adrenoleukodystrophy: incidence, new mutation rate, and results o extended family screening. *Ann Neurol*, 49:512-517.

Blum A, Shamburek R (2009). The pleiotropic effects of statins on endothelial function, vascular inflammation, immunomodulation and thrombogenesis. *Atherosclerosis*, 203:325-330.

Boveris A (1998). Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina, B. Aires*, 58:350-356.

Boyd-Kimball D, Castegna A, Sultana R, Poon HF, Petroze R, Lynn BC, Klein JB, Butterfield DA (2005). Proteomic identification of proteins oxidized by Aβ(1-42) in synaptosomes: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res*, 1044:206-215.

Cooke MS, Olinski R, Evans MD (2006). Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta*, 365:30-49.

Daneshvar B, Autrup H, Dragsted LO (1997). γ-Glutamyl semialdehyde and 2-amino-adipic semialdehyde: Biomarkers of oxidative damage to proteins. *Biomarkers*, 117-123.

Dardalhon V, Korn T, Kuchroo VK, Anderson AC (2008) Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J Autoimmun* 31(3): 252-256.

de Beer M, Engelen M, van Geel BM (2014). Frequent occurrence of cerebral demyelination in adrenomyeloneuropathy. *Neurology*, 83(24):2227-31.

Deon M, Sitta A, Barschak AG, Coelho DM, Pigatto M, Schmitt GO, Jardim LB, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR (2007). Introduction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Int J Devl Neurosci*, 25:441-444.

Deon M, Garcia MP, Sitta A, Barschak AG, Coelho DM, Schmitt GO, Pigatto M, Jardim LB, Wajner M, Giugliani R, Vargas CR (2008). Hexacosanoic and docosanoic acids plasma levels in patients with cerebral childhood and asymptomatic X-linked adrenoleukodystrophy: Lorenzo's oil effect. *Metab Brain Dis*, 23:43-49.

Deon M, Marchetti DP, Donida B, Wajner M, Vargas C (2016). Oxidative Stress in Patients with X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Cell Mol Neurobiol*, 36(4):497-512

Di Biase A, Merendino N, Avellino C, Cappa M, Salvati S (2001) Th 1 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in X-linked adrenoleukodystrophy. *J Neurol Sci* 182(2): 161-165.

Di Biase A, Di Benedetto R, Fiorentini C, Travaglione S, Salvati S, Attorri L, and Pietraforte D (2004) Free radical release in C6 glial cells enriched in hexacosanoic acid: Implication for X-linked adrenoleukodystrophy pathogenesis. *Neurochem Int* 44:215–221.

Di Biase A, Benedetto R, Salvati S, Attorri L, Leonardi F, Pietraforte D (2005). Effects of L-mono methyl-arginine, N-acetyl-cysteine and diphenyliodonium on free radical release in C6 glial cells enriched in hexacosanoic acid. *Neurochem Res*, 30(2):215-223.

Donida B, Jacques CED, Mescka CP, Rodrigues DGB, Marchetti DP, Ribas G, Giugliani R, Vargas CR (2017). Oxidative damage and redox in Lysosomal Storage Disorders: Biochemical markers. *Clin Chim Acta*, 466:46-53.

Engelen M, Barbier M, Dijkstra IME, et al (2014). X-linked adrenoleukodystrophy in women: a cross-sectional cohort study. *Brain*, 137: 693-706.

Ferrari G, Yan CY, Greene LA (1995). N-acetylcysteine (D- and L-stereoisomers) prevents apoptotic death of neuronal cells. *J Neurosci*, 15:2857-2866.

Fourcade S, López-Erauskin J, Galino J, Duval C, Naudi A, Jove M, Kemp S, Villarroya F, Ferrer I, Pamplona R, Portero-Otin M, Pujol A (2008). Early oxidative damage underlying neurodegeneration in X-adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet*, 17:1762-1773.

Fourcade S, Ruiz M, Guilera C, Hahnen E, Brichta L, Naudi A, Portero-Otín M, Dacremont G, Cartier N, Wanders R, Kemp S, Mandel JL, Wirth B, Pamplona R, Aubourg P, Pujol A (2010) Valproic acid induces antioxidant effects in X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet* 19(10):2005-14.

Fung A, Vizcaychipi M, Lloyd D, Wan Y, Ma D (2012) Central nervous system inflammation in disease related conditions: mechanistic prospects. *Brain Res* 1446, 144-155.

Galic MA, Riazi K, Pittman QJ. Cytokines and brain excitability. *Front Neuroendocrinol.* 2012;33:116–125.

Galino J, Montserrat R, Fourcade S, Schlüter A, López-Erauskin J, Guilera C, Jove M, Naudi A, García-Arumí E, Andreu AL, Starkov AA, Pamplona R, Ferrer I, Portero-Otin M, Pujol A (2011). Oxidative Damage Compromises Energy Metabolism in the Axonal Degeneration Mouse Model of X-Adrenoleukodystrophy. *Antioxid Redox Signal*, 15(8):2095-2107.

Garrod AE (1902) The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. *Lancet*, 2:1616-20.

Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A (1998). Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem*, 273 (18): 11038-11043.

Glezer I, Simard AR, Rivest S (2007) Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience* 147:867–883.

Halliwell B (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence? *The Lancet*, 344:721-724.

Halliwell B (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*, 97:1634-1658.



Halliwell B and Gutteridge JMC. (Eds). Free radicals in biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford, 4. ed., 2007.

Harvey BH, Joubert C, du Preez JL, Berk M (2008). Effect of chronic Nacetyl cysteine administration on oxidative status in the presence and absence of induced oxidative stress in rat striatum. *Neurochem Res*, 33:508-517.

Hein S, Schonfeld P, Kahlert S, Reiser G (2008) Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture. *Hum Mol Genet* 17:1750–1761.

Islinger M, Cardoso MJ, Schrader M (2010). Be different - the diversity of peroxisomes in the animal kingdom, *Biochim Biophys Acta*, 1803:881-897.

Kartha RV, Zhou J, Basso L, Schröder H, Orchard PJ, Cloyd J (2015) Mechanisms of Antioxidant Induction with High-Dose N-Acetylcysteine in Childhood Cerebral Adrenoleukodystrophy. *CNS Drugs*, (12):1041-7.

Kemp S, Pujol A, Waterham HR, van Geel BM, Boehm CD, Raymond GV, Cutting GR, Wanders RJ, Moser HW (2001). ABCD1 mutations and the X-linked adrenoleukodystrophy mutation database: role in diagnosis and clinical correlations. *Hum Mutat*, 18:499-515.

Kemp S, Wanders R (2010). Biochemical Aspects of X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol*, 20(4):831-837.

Kemp S, Huffnagel IC, Linthorst GE, Wanders RJ, Engelen M (2016). Adrenoleukodystrophy - neuroendocrine pathogenesis and redefinition of natural history. *Nat Rev Endocrinol*, 12(10), 606-615.

Lannuzel A, Aubourg P, Tardieu M (1998) Excessive production of tumour necrosis factor alpha by peripheral blood mononuclear cells in X-linked adrenoleukodystrophy. *Eur J Paediatr Neurol* 1: 27-32.

Loes DJ, Hite S, Moser H, Stillman AE, Shapiro E, Lockman L, Latchaw RE, Krivit W (1994). Adrenoleukodystrophy: a scoring method for brain MR observations. *Am J Neuroradiol*, 15(9):1761-1766.

Loes DJ, Fatemi A, Melhem ER, Gupte N, Bezman L, Moser HW, Raymond GV (2003). Analysis of MRI patterns aids prediction of progression in X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurology*, 61(3):369-374.

López-Erauskin J, Foucarde S, Galino, Ruiz M, Schlüter A, Naudi A, Jove M, Portero-Otin M, Pamplona R, Ferrer I, Pujol A (2011). Antioxidants halt axonal neurodegeneration in a mouse model of X-Adrenoleukopystrophy. *Ann Neurol*, 70:84-92.

Lu JF, Lawler AM, Watkins PA, Powers JM, Moser AB, Moser HW, Smith KD (1997) A mouse model for X-linked adrenoleukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(17):9366-71.

Luvai A, Mbagaya W, Hall AS, Barth JH (2012). Rosuvastatin: a review of the pharmacology and clinical effectiveness in cardiovascular disease. *Clin MedInsights Cardiol*, 6:17-33.

Lyman M, Lloyd DG, Ji X, Vizcaychipi MP, Ma D (2014) Neuroinflammation: the role and consequences. *Neurosci Res* 79: 1-12.

Mahmood M, Dubey P, Moser HW, Moser A (2005). X-linked adrenoleukodystrophy. Therapeutic approaches to distinct phenotypes. *Pediatr Transplant*, 9:55-62.

Maier EM, Kammerer S, Muntau AC, Wichers M, Braun A, Roscher AA (2002). Symptoms in carriers of Adrenoleukodystrophy relate to skewed X inactivation. *Ann Neurol*, 52:683-688.

Marchetti DP, Donida B, da Rosa HT, Manini PR, Moura DJ, Saffi J, Deon M, Mescka CP, Coelho DM, Jardim LB, Vargas CR (2015). Protective effect of antioxidants on DNA damage in leukocytes from X-linked adrenoleukodystrophy patients. *Int J Devl Neuroscience*, 43: 8–15.

Marchetti DP, Donida B, Jacques CE, Deon M, Hauschild TC, Koehler-Santos P, de Moura Coelho D et al (2018a) Inflammatory profile in X-linked adrenoleukodystrophy patients: Understanding disease progression. *J Cell Biochem* 119(1):1223-1233.

Marchetti DP, Steffens L, Jacques CE, Guerreiro GB, Mescka CP, Deon M, de Coelho DM, Moura DJ, Viario AG, Poletto F, Coitinho AS, Jardim LB, Vargas CR (2018b) Oxidative Imbalance, Nitrate Stress, and Inflammation in C6 Glial Cells Exposed to Hexacosanoic Acid: Protective Effect of N-acetyl-L-cysteine, Trolox, and Rosuvastatin. *Cell Mol Neurobiol*, 38(8):1505-1516.

Matés JM, Perez-Gómez C, Castro IN (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*, 32(8):5595-5603.

McGuinness MC, Griffin DE, Raymond GV, Washington CA, Moser HW, Smith KD (1995). Tumor necrosis factor- $\alpha$  and X-linked adrenoleukodystrophy. *J Neuroimmunol*, 2: 61-69.

Mescka CP, Rosa AP, Schirmbeck G, da Rosa TH, Catarino F, de Souza LO, Guerreiro G, Sitta A, Vargas CR, Dutra-Filho CS (2016). L-carnitine Prevents Oxidative Stress in the Brains of Rats Subjected to a Chemically Induced Chronic Model of MSUD. *Mol Neurobiol*, 53(9):6007-6017.

Moraes MCS, Neto JBC, Menck CFM (2012). DNA repair mechanisms protect our genome from carcinogenesis. *Front Biosci*, 17:1362-1388.

Morita M, Imanaka T (2012). Peroxisomal ABC transporters: Structure, function and role in disease. *Biochim Biophys Acta*, 1822:1387-1396.

Moser HW, Moser AB, Frayer KK, Chen W, Schulman JD, O'Neill BP, Kishimoto Y (1981). Adrenoleukodystrophy: increased plasma content of saturated very long chain fatty acids. *Neurology*, 31:1241-1249.

Moser HW, Moser AB: Measurement of saturated very long chain fatty acid in plasma. In: Hommes FA (ed) *Techniques of diagnostic human biochemical genetics*. Wiley, New York, 1991a.

Moser HW, Bergin A, Naidu S, Ladenson PW (1991b). Adrenoleukodystrophy. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 20(2): 297:318.

Moser HW, Moser AB, Smith KD (1992). Adrenoleukodystrophy: phenotypic variability and implications for therapy. *J Inherit Metab Dis*, 15:645-664.

Moser HW, Smith KD, Watkins PA, Powers J, Moser AB: 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 HW, Raymond GV, Dubey P (2005). Adrenoleukodystrophy - new approaches to a neurodegenerative disease. *JAMA*, 294:3131-3134.

Moser HW (2006). Therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. *NeuroRx*, 3(2): 246-253.

Nury T, Zarrouk A, Ragot K, Debbabi M, Riedinger JM, Vejux A et al (2017) 7-Ketocholesterol is increased in the plasma of X-ALD patients and induces peroxisomal modifications in microglial cells: Potential roles of 7-ketocholesterol in the pathophysiology of X-ALD. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 169:123-136.

Oliver LM, Krisans SK (2000). Peroxisomal protein targeting and identification of peroxisomal targeting signals in cholesterol biosynthetic enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 1529:89-102.

Opal SM, DePalo VA. 2000. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 117(4):1162-72.

Opere CA, Ford K, Zhao M, Ohia SE (2008) Regulation of neurotransmitter release from ocular tissues by isoprostanes. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 30(9):697-701.

Paintlia AS, Gilg AG, Khan M, Singh AK, Barbosa E, Singh I (2003). Correlation of very long chain fatty acid accumulation and inflammatory disease progression in childhood X-ALD: implications for potential therapies. *Neurobiol Dis*, 14: 425-439.

Peters C, Charnas LR, Tan Y, Ziegler RS, Shapiro EG, DeFor T, Grewal SS, Orchard PJ, Abel SL, Goldman AI, Ramsay NK, Dusenbery KE, Loes DJ, Lockman LA, Kato S, Aubourg PR, Moser HW, Krivit W (2004). Cerebral X-

linked adrenoleukodystrophy: the international hematopoietic cell transplantation experience from 1982 to 1999. *Blood*, 104(3):881-888.

Petrillo S, Piemonte F, Pastore A, Tozzi G, Aiello C, Pujol A, Cappa M, Bertini E (2013). Glutathione imbalance in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol Genet Metab*, 109:366-370.

Petryk A, Polgreen LE, Chahla S, Miller W, Orchard PJ (2012). No evidence for the reversal of adrenal failure after hematopoietic cell transplantation in X-linked adrenoleukodystrophy, *Bone Marrow Transplant*, 47:1377-1378.

Powers JM, Schaumburg HH (1981). The testis in adreno-leukodystrophy. *Am J Pathol*, 102:90-98.

Powers JM, Liu Y, Moser AB, Moser HW (1992). The inflammatory myelinopathy of adreno-leukodystrophy: cells, effector molecules, and pathogenetic implications. *J Neuropathol Exp Neurol*, 51:630-643.

Powers JM, Moser HW (1998). Peroxisomal disorders: genotype, phenotype, major neuropathologic lesions and pathogenesis. *Brain pathology*, 8:101-120.

Powers JM (2005) Adreno-leukodystrophy: oxidative stress of mice and men. *J Neuropathol Exp Neurol*, 64(12):1067–1079.

Pryor WA, Jin X, Squadrito GL (1994). One-and-two-electron oxidations of methionine by peroxyxynitrite. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:11173-11177.

Pujol A, Hindelang C, Callizot N, Bartsch U, Schachner M, Mandel JL (2002). Late onset neurological phenotype of the X-ALD gene inactivation in mice: a mouse model for adrenomyeloneuropathy. *Hum Mol Genet* 11(5):499-505.

Rizzo WB, Watkins PA, Phillips MW, Cranin D, Campbell B, Avigan J (1986). Adrenoleukodystrophy: dietary oleic acid lowers fibroblast saturated C22-C26 fatty acids. *Neurology*, 36:357.

Rizzo WB, Phillips MW, Dammann AL, Leshner RY, Jennings SVK (1987). Adrenoleukodystrophy. Dietary oleic acid lowers hexacosanoate levels. *Ann Neurol*, 21:232.

Rockenbach FJ, Deon M, Marchese DP, Manfredini V, Mescka C, Ribas GS, Habekost CT, Castro CG Jr, Jardim LB, Vargas CR (2012). The effect of bone marrow transplantation on oxidative stress in X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol Genet Metab*, 106:231-236.

Saudubray JM, Charpentier C. Clinical phenotypes: diagnosis/algorithms. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8<sup>a</sup> edição. New York: Mc Graw-Hill. 2001.



Schafer FQ, Buettner GR (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*, 30(11):1191-1212.

Schupp N, Schmid U, Heidland A, Stopper H (2008). Rosuvastatin protects against oxidative stress and DNA damage in vitro via upregulation of glutathione synthesis. *Atherosclerosis*, 199:278-287.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8<sup>a</sup> ed. New York: Mc Graw-Hill. 2001.

Selmaj K, Raine CS (1988) Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol* 23: 339-346.

Sheng WS, Hu S, Kravitz FH, Peterson PK, Chao CC (1995) Tumor necrosis factor alpha upregulates human microglial cell production of interleukin-10 in vitro. *Clin Diagn Lab Immunol* 5: 604-608.

Sies H, Stahl W (1995). Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr*, 62 (6):1315S-1321S.

Simon HU, Cools J. 2007. Novel approaches to therapy of hypereosinophilic syndromes. *Immunol Allergy Clin North Am* 27: 519-527.

Stumpf DA, Hayward A, Haas R, Schaumburg HH (1981). Adrenoleukodystrophy. Failure of immunosuppression to prevent neurological progression. Arch Neurol, 38:48.

Taner G, Yeşilöz R, Vardar DO, Şenyiğit T, Özer O, Degen GH, Başaran N (2014) Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of lecithin/chitosan nanoparticles. J Nanopart Res 16:2220.

Tayal V, Kalra BS (2008) Cytokines and anti-cytokines as therapeutics - An update. Eur J Pharmacol 579:1-12.

Tolar J, Orchard PJ, Bjoraker KJ, Ziegler RS, Shapiro EG, Charnas L (2007). N-acetyl-L-cysteine improves outcome of advanced cerebral adrenoleukodystrophy. Bone Marrow Transplant, 39:211-215.

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.

Turk BR, Moser AB and Fatemi A (2017) Therapeutic strategies in adrenoleukodystrophy. Wien Med Wochenschr, 167(9-10):219-226.

Van de Beek MC, Ofman R, Dijkstra I, Wijburg F, Engelen M, Wanders R, Kemp S (2017). Lipid-induced endoplasmic reticulum stress in X-linked

adrenoleukodystrophy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*,1863(9):2255-2265.

Van Geel BM, Assies J, Wanders RJ, Barth PG (1997). X-linked adrenoleukodystrophy: clinical presentation, diagnosis and therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 63(1):4-14.

Van Roermund CWT, Visser WF, Ijlst L, van Cruchten A, Boek M, Kulik W, Waterham HR, Wanders RJ (2008). The human peroxisomal ABC half transporter ALDP functions as a homodimer and accepts acyl-CoA esters. *FASEB J*, 22:4201-4208.

Vargas CR, Wajner M, Sirtori LR, Goulart L, Chiochetta M, Coelho D, Latini A, Llesuy S, Bello-Klein A, Giugliani R, Deon M, Mello CF (2004). Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim Biophys Acta*, 1688:26-32.

Virarkar M, Alappat L, Bradford PG, Awad AB (2013) L-arginine and nitric oxide in CNS function and neurodegenerative diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 53(11):1157-67.

Walsh RN, Cummins RA (1976) The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull* 83(3):482-504.

Wanders RJA, Schutgens RBH, Barth PG, Tager JM, Van Den Bosch H (1993). Postnatal diagnosis of peroxisomal disorders: a biochemical approach. *Biochemie*, 75:269-279.

Wanders RJA, Schutgens RBH, Barth PG (1995). Peroxisomal Disorders: A Review. *J Neuropathol Exp Neurol*, 54(5):726-739.

Wanders RJ, Waterham HR (2006). Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem*, 75:295-332.

Wanders RJ, Ferdinandusse S (2012). Peroxisomes, peroxisomal diseases, and the hepatotoxicity induced by peroxisomal metabolites. *Curr Drug Metab*, 13(10):1401-1411.

Wang X, Quinn P (1999). Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res*, 38:309-336.

Wulf D (2001). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82:47-95.

## **7. ANEXOS**

### ***7.1 Lista de tabelas***

Tabela 1: Fenótipos clínicos masculinos em X-ALD.....	22
Tabela 2: Fenótipos clínicos em mulheres HTZ para X-ALD.....	23
Tabela 3: Valores referenciais de VLCFA para o plasma em $\mu\text{mol/L}$ .....	24

## **7.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: pacientes homens com Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X**

Projeto de Pesquisa: Investigação do efeito *in vitro* e *in vivo* de antioxidantes na Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (X-ALD):

Estamos convidando a pessoa pela qual você é responsável, que é portadora de Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X, a participar deste projeto que tem por objetivo verificar o efeito de diferentes antioxidantes (N-acetil-L-cisteína, rosuvastatina, Vitamina E, Vitamina C e ácido lipóico) sobre parâmetros bioquímicos e inflamação em sangue, urina e fibroblastos (células presentes na segunda camada da pele) em indivíduos portadores de X-ALD. Os dados necessários para a realização do projeto serão obtidos através de entrevistas realizadas com você e/ou a pessoa pela qual você é responsável, através das consultas médicas no Centro de Pesquisa Clínica - HCPA e das coletas de sangue periférico e urina, solicitadas rotineiramente pelo médico para a realização dos testes para acompanhamento clínico. Caso sejam necessários dados adicionais, estes serão obtidos no prontuário da pessoa pela qual você é responsável. Se você aceitar participar, a pessoa pela qual você é responsável irá receber gratuitamente a suplementação oral de N-acetil-L-cisteína na dose 400 mg/dia ou 800 mg/dia. Além da administração de N-acetil-L-cisteína, será coletado sangue periférico e urina em três momentos diferentes em frascos específicos (total de 10 mL, equivalente a duas colheres de chá) de cada fluido. A primeira coleta será realizada antes do início do tratamento, a segunda coleta após três meses de tratamento com N-acetil-L-cisteína e a terceira após seis meses. No momento da coleta de sangue

poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são simples. Se houver vazamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. Para a coleta de fibroblastos, a pessoa pela qual você é responsável receberá uma anestesia tópica (cremes anestésicos) e o procedimento se dá através da retirada de um pequeníssimo fragmento de pele através de uma biópsia. As coletas de sangue e fibroblastos serão realizadas por profissionais especialmente treinados para este fim, o que diminui as chances de complicações. As coletas de urina serão feitas pelo próprio paciente ou com o auxílio de profissionais treinados. Após o término do estudo os materiais biológicos que ainda estiverem armazenados poderão ser descartados ou mantidos para futuras pesquisas dentro do mesmo objetivo deste estudo, de acordo com a sua decisão de autorizar o uso futuro. Se autorizado, o material somente será utilizado para novas pesquisas mediante seu consentimento por escrito. Com relação ao uso dos materiais biológicos, ao final do estudo, você (marque com um X):

autoriza o armazenamento.

não autoriza o armazenamento, solicitando que sejam descartados.

Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em revistas científicas, mas o seu nome e/ou da pessoa pela qual você é responsável não serão revelados. Por meio deste termo, você autoriza que os pesquisadores envolvidos neste estudo pesquisem os registros médicos do paciente a fim de obter as informações clínicas necessárias para a realização desta pesquisa. Sua participação no estudo é voluntária. **Se você**

**decidir não participar do estudo, isto não afetará em nada o seu tratamento, nem da pessoa pela qual você é responsável.** A participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo (a). Em qualquer caso, não terá penalização. É importante ressaltar que nem você nem a pessoa pela qual você é responsável receberão nenhum tipo pagamento pela participação no estudo e que todas as despesas relacionadas ao custo dos exames laboratoriais serão cobertas por verbas do próprio projeto de pesquisa, portanto, serão completamente gratuitas para você. Cabe salientar, também, que os resultados desta pesquisa provavelmente não terão nenhum impacto sobre o seu tratamento e/ou seu acompanhamento médico, nem da pessoa pela qual você é responsável. Este estudo pode, entretanto, contribuir no futuro, para um tratamento mais efetivo para os pacientes com X-ALD e melhor entendimento da doença da qual a pessoa pela qual você é responsável é portador. Não existe um prazo exato ou estipulado para que você receba os resultados do estudo, mas estes lhes serão informados assim que estiverem disponíveis. Os pesquisadores responsáveis pelo estudo (Profa. Dra. Carmen Regla Vargas e a doutoranda Desirée Padilha Marchetti) estarão à disposição para o esclarecimento de qualquer dúvida durante todo o andamento da pesquisa, no serviço de Genética Médica do HCPA localizado no 3º andar, Fone: (51) 3359.8011. Ainda, para maiores informações, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, através do telefone (51) 33597640, das 8h às 17h, de segunda à sexta-feira. Este documento será elaborado em duas vias, sendo que uma delas será entregue a você, participante da pesquisa, e a outra será mantida com o nosso grupo de pesquisa.



Pelo presente consentimento, declaro que fui devidamente informado sobre o projeto de pesquisa, de forma clara e detalhada, da liberdade de não participar do estudo e tive minhas dúvidas esclarecidas.

Data:

Nome do indivíduo e assinatura:

Nome do responsável legal e assinatura:

Nome do pesquisador e assinatura:

### **7.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: pacientes mulheres (mães) com Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X**

Projeto de Pesquisa: Investigação do efeito *in vitro* e *in vivo* de antioxidantes na Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (X-ALD):

Você, portadora de Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X, está sendo convidada a participar deste projeto que tem por objetivo verificar o efeito de diferentes antioxidantes (N-acetil-L-cisteína, rosuvastatina, Vitamina E, Vitamina C e ácido lipóico) sobre parâmetros bioquímicos e inflamação em sangue, urina e fibroblastos (células presentes na segunda camada da pele) em indivíduos portadores de X-ALD. Os dados necessários para a realização do projeto serão obtidos através de entrevistas realizadas com você (portadora de X-ALD), das consultas médicas no Centro de Pesquisa Clínica - HCPA e das coletas de sangue periférico e urina, solicitadas rotineiramente pelo seu médico para a realização dos testes para o seu acompanhamento clínico. Caso sejam necessários dados adicionais, estes serão obtidos no seu prontuário do Hospital. Se você aceitar participar, irá receber gratuitamente a suplementação oral de N-acetil-L-cisteína na dose 400 mg/dia ou 800 mg/dia. Além da administração de N-acetil-L-cisteína, será coletado sangue periférico e urina em três momentos diferentes em frascos específicos (total de 10 mL, equivalente a duas colheres de chá) de cada fluido. A primeira coleta será realizada antes do início do tratamento, a segunda coleta após três meses de tratamento com N-acetil-L-cisteína e a terceira após seis meses. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são simples.

Se houver vazamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. Para a coleta de fibroblastos, você receberá uma anestesia tópica (cremes anestésicos) e o procedimento se dá através da retirada de um pequeníssimo fragmento de pele através de uma biópsia. As coletas de sangue e fibroblastos serão realizadas por profissionais especialmente treinados para este fim, o que diminui as chances de complicações. As coletas de urina serão feitas pelo próprio paciente ou com o auxílio de profissionais treinados. Após o término do estudo os materiais biológicos que ainda estiverem armazenados poderão ser descartados ou mantidos para futuras pesquisas dentro do mesmo objetivo deste estudo, de acordo com a sua decisão de autorizar o uso futuro. Se autorizado, o material somente será utilizado para novas pesquisas mediante seu consentimento por escrito. Com relação ao uso dos materiais biológicos, ao final do estudo, você (marque com um X):

autoriza o armazenamento.

não autoriza o armazenamento, solicitando que sejam descartados.

Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em revistas científicas, mas o seu nome não será revelado. Por meio deste termo, você autoriza que os pesquisadores envolvidos neste estudo pesquisem os registros médicos a fim de obter as informações clínicas necessárias para a realização desta pesquisa. Sua participação no estudo é voluntária. **Se você decidir não participar do estudo, isto não afetará em nada o seu tratamento.** A participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesma. Em qualquer caso, não terá penalização.

É importante ressaltar que você não receberá nenhum tipo pagamento pela participação no estudo e que todas as despesas relacionadas ao custo dos exames laboratoriais serão cobertas por verbas do próprio projeto de pesquisa, portanto, serão completamente gratuitas para você. Cabe salientar, também, que os resultados desta pesquisa provavelmente não terão nenhum impacto sobre o seu tratamento e/ou seu acompanhamento médico. Este estudo pode, entretanto, contribuir no futuro, para um tratamento mais efetivo para os pacientes com X-ALD e melhor entendimento da doença da qual você é portadora. Não existe um prazo exato ou estipulado para que você receba os resultados do estudo, mas estes lhes serão informados assim que estiverem disponíveis. Os pesquisadores responsáveis pelo estudo (Profa. Dra. Carmen Regla Vargas e a doutoranda Desirée Padilha Marchetti) estarão à disposição para o esclarecimento de qualquer dúvida durante todo o andamento da pesquisa, no serviço de Genética Médica do HCPA localizado no 3º andar, Fone: (51) 3359.8011. Ainda, para maiores informações, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, através do telefone (51) 33597640, das 8h às 17h, de segunda à sexta-feira. Este documento será elaborado em duas vias, sendo que uma delas será entregue a você, participante da pesquisa, e a outra será mantida com o nosso grupo de pesquisa. Pelo presente consentimento, declaro que fui devidamente informado sobre o projeto de pesquisa, de forma clara e detalhada, da liberdade de não participar do estudo e tive minhas dúvidas esclarecidas.

Data:

Nome do indivíduo e assinatura:

Nome do responsável legal e assinatura:

Nome do pesquisador e assinatura:

#### **7.4 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: indivíduos controle (crianças)**

Projeto de Pesquisa: Investigação do efeito *in vitro* e *in vivo* de antioxidantes na Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (X-ALD):

Estamos convidando a pessoa pela qual você é responsável a participar deste projeto que tem por objetivo verificar o efeito de diferentes antioxidantes (N-acetil-L-cisteína, rosuvastatina, Vitamina E, Vitamina C e ácido lipóico) sobre parâmetros bioquímicos e inflamação em sangue, urina e fibroblastos (células presentes na segunda camada da pele) em indivíduos portadores de X-ALD. Para que este estudo seja realizado, é necessária uma comparação entre um grupo de pacientes que apresentam a doença com um grupo de pacientes que não apresentam. A pessoa pela qual você é responsável, portanto, está sendo convidada a participar deste estudo como controle, ou seja, como não portador de Adrenoleucodistrofia Ligada ao X. Para participar, a pessoa pela qual você é responsável fará exames de sangue e urina, os quais serão coletados juntamente com os que serão utilizadas para os testes de acompanhamento, solicitados rotineiramente pelo médico dela. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente simples. Se houver vazamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. Para a coleta de fibroblastos, a pessoa pela qual você é responsável receberá uma anestesia tópica (cremes anestésicos) e o procedimento se dá através da retirada de um pequeníssimo fragmento de pele através de uma biópsia. As coletas de sangue e fibroblastos serão realizadas por profissionais especialmente treinados para este fim, o que

diminui as chances de complicações. As coletas de urina serão feitas pelo próprio paciente ou com o auxílio de profissionais treinados. Após o término do estudo os materiais biológicos que ainda estiverem armazenados poderão ser descartados ou mantidos para futuras pesquisas dentro do mesmo objetivo deste estudo, de acordo com a sua decisão de autorizar o uso futuro. Se autorizado, o material somente será utilizado para novas pesquisas mediante seu consentimento por escrito. Com relação ao uso dos materiais biológicos, ao final do estudo, você (marque com um X):

autoriza o armazenamento.

não autoriza o armazenamento, solicitando que sejam descartados.

Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em revistas científicas, mas o seu nome (e/ou da pessoa pela qual você é responsável) não será revelado. Sua participação no estudo é voluntária. A participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo (a). Em qualquer caso, não terá penalização.

É importante ressaltar que nem você nem a pessoa pela qual você é responsável, receberão nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo e que todas as despesas relacionadas ao custo dos exames laboratoriais serão cobertas por verbas do próprio projeto de pesquisa, portanto, serão completamente gratuitas para você. Cabe salientar, também, que os resultados desta pesquisa provavelmente não terão nenhum impacto sobre o seu tratamento e/ou seu acompanhamento médico, nem da pessoa pela qual você é responsável. A sua participação neste estudo não trará benefício direto a você, nem à pessoa pela qual você é responsável porém, os dados advindos com a sua doação são de importância científica relevante para o

estabelecimento de novos tratamentos para esta doença, bem como para o melhor entendimento desta doença. Os pesquisadores responsáveis pelo estudo (Profa. Dra. Carmen Regla Vargas e a doutoranda Desirèe Padilha Marchetti) estarão à disposição para o esclarecimento de qualquer dúvida durante todo o andamento da pesquisa, no serviço de Genética Médica do HCPA localizado no 3º andar, Fone: (51)3359.8011. Ainda, para maiores informações, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, através do telefone (51) 33597640, das 8h às 17h, de segunda à sexta-feira.

Este documento será elaborado em duas vias, sendo que uma delas será entregue a você, participante da pesquisa, e a outra será mantida com o nosso grupo de pesquisa. Pelo presente consentimento, declaro que fui devidamente informado sobre o projeto de pesquisa, de forma clara e detalhada, da liberdade de não participar do estudo e tive minhas dúvidas esclarecidas.

Data:

Nome do indivíduo e assinatura:

Nome do responsável legal e assinatura:

Nome do pesquisador e assinatura:



## **7.5 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: indivíduos controle (adultos)**

Projeto de Pesquisa: Investigação do efeito *in vitro* e *in vivo* de antioxidantes na Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (X-ALD):

Você está sendo convidado (a) a participar deste projeto que tem por objetivo verificar o efeito de diferentes antioxidantes (N-acetil-L-cisteína, rosuvastatina, Vitamina E, Vitamina C e ácido lipóico) sobre parâmetros bioquímicos e inflamação em sangue, urina e fibroblastos (células presentes na segunda camada da pele) em indivíduos portadores de X-ALD. Para que este estudo seja realizado, é necessária uma comparação entre um grupo de pacientes que apresentam a doença com um grupo de pacientes que não apresentam. Você, portanto, está sendo convidado a participar deste estudo como controle, ou seja, como não portador de Adrenoleucodistrofia Ligada ao X. Para participar, você fará exames de sangue e urina, os quais serão coletados juntamente com os que serão utilizadas para os testes de acompanhamento, solicitados rotineiramente pelo seu médico. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente simples. Se houver vazamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. Para a coleta de fibroblastos, você receberá uma anestesia tópica (cremes anestésicos) e o procedimento se dá através da retirada de um pequeníssimo fragmento de pele através de uma biópsia. As coletas de sangue e fibroblastos serão realizadas por profissionais especialmente treinados para este fim, o que diminui as chances de complicações. As coletas de urina serão feitas pelo próprio paciente ou com o

auxílio de profissionais treinados. Após o término do estudo os materiais biológicos que ainda estiverem armazenados poderão ser descartados ou mantidos para futuras pesquisas dentro do mesmo objetivo deste estudo, de acordo com a sua decisão de autorizar o uso futuro. Se autorizado, o material somente será utilizado para novas pesquisas mediante seu consentimento por escrito. Com relação ao uso dos materiais biológicos, ao final do estudo, você (marque com um X):

autoriza o armazenamento.

não autoriza o armazenamento, solicitando que sejam descartados.

Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em revistas científicas, mas o seu nome não será revelado. Sua participação no estudo é voluntária. A participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo (a). Em qualquer caso, não terá penalização. É importante ressaltar que você não receberá nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo e que todas as despesas relacionadas ao custo dos exames laboratoriais serão cobertas por verbas do próprio projeto de pesquisa, portanto, serão completamente gratuitas para você. Cabe salientar, também, que os resultados desta pesquisa provavelmente não terão nenhum impacto sobre o seu tratamento e/ou seu acompanhamento médico. A sua participação neste estudo não trará benefício direto a você, porém, os dados advindos com a sua doação são de importância científica relevante para o estabelecimento de novos tratamentos para esta doença, bem como para o melhor entendimento desta doença. Os pesquisadores responsáveis pelo estudo (Profa. Dra. Carmen Regla Vargas e a doutoranda Desirée Padilha Marchetti) estarão à disposição para o esclarecimento de qualquer dúvida

durante todo o andamento da pesquisa, no serviço de Genética Médica do HCPA localizado no 3º andar, Fone: (51)3359.8011. Ainda, para maiores informações, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, através do telefone (51) 33597640, das 8h às 17h, de segunda à sexta-feira.

Este documento será elaborado em duas vias, sendo que uma delas será entregue a você, participante da pesquisa, e a outra será mantida com o nosso grupo de pesquisa.

Pelo presente consentimento, declaro que fui devidamente informado sobre o projeto de pesquisa, de forma clara e detalhada, da liberdade de não participar do estudo e tive minhas dúvidas esclarecidas.

Data:

Nome do indivíduo e assinatura:

Nome do responsável legal e assinatura:

Nome do pesquisador e assinatura:

## 7.6 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

### COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

**Projeto:** 150487

**Data da Versão do Projeto:** 13/10/2015

**Pesquisadores:**

CARMEN REGLA VARGAS

BRUNA DONIDA

LAURA BANNACH JARDIM

MARION DEON

**Título:** Investigação do efeito in vitro e in vivo de antioxidantes na Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 16 de janeiro de 2016.

Prof. José Roberto Goldim  
Coordenador CEP/HCPA