

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

***EFEITO IN VITRO DE ANTIOXIDANTES SOBRE O DANO AO
DNA EM PACIENTES PORTADORES DE
ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AO CROMOSSOMO X***

DESIRÉE PADILHA MARCHETTI

Orientador: Prof^a. Dr^a. Carmen Regla Vargas

Porto Alegre, 2015.

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

***EFEITO IN VITRO DE ANTIOXIDANTES SOBRE O DANO AO
DNA EM PACIENTES PORTADORES DE
ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AO CROMOSSOMO X***

DESIRÉE PADILHA MARCHETTI

Orientador: Prof^a. Dr^a. Carmen Regla Vargas

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

Porto Alegre, 2015.

CIP - Catalogação na Publicação

Padilha Marchetti, Desirêe

Efeito in vitro de antioxidantes sobre o dano ao DNA em pacientes portadores de Adrenoleucodistrofia Ligada ao cromossomo X / Desirêe Padilha Marchetti.

-- 2015.

118 f.

Orientadora: Carmen Regla Vargas.

Dissertação (Mestrado) -- 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, 2015.

1. adrenoleucodistrofia ligada ao X. 2. N-acetil-L-cisteína. 3. trolox. 4. rosuvastatina. 5. dano ao DNA. I. Regla Vargas, Carmen, orient. II. 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, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela confiança que depositou em mim, por me auxiliar sempre.

Gostaria de agradecer aos meus queridos colegas do Laboratório de Análises de Metabólitos: Caroline Mescka, Carlos Jacques, Carlos Wayhs, Giovana Biancini, Gilian Gerreiro, Graziela Ribas, Jéssica Lambert, Tatiane Hammerschmidt, Marion Deon, pela ajuda, força e risadas, mas principalmente pela amizade.

À minha colega de mestrado e 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, amizade que construímos ao longo destes quase nove anos, por estar sempre presente, tanto em momentos maravilhosos quanto em momentos não tão bons assim.

Ao laboratório de Genética Toxicológica da UFCSPA, principalmente à Dinara, Paula e Helen, pelo conhecimento compartilhado, pela colaboração e pelo empréstimo de material.

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 namorado 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 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

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE TABELAS	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Erros Inatos do Metabolismo.....	12
1.2 Peroxissomos.....	13
1.3 Doenças Peroxissomais.....	13
1.4 Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X	14
1.4.1 Tratamento da X-ALD.....	20
1.5 Radicais livres e Estresse Oxidativo	23
1.5.1 Dano ao DNA.....	27
1.6 Estresse Oxidativo na X-ALD e estudos com antioxidantes.....	28
2. OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo geral	33
2.2 Objetivos específicos	33
3. RESULTADOS	35
3.1 Cap. 1- Artigo 1: <i>Protective effect of antioxidants on DNA damage in leukocytes from X-linked adrenoleukodystrophy patients</i>	36
3.2 Cap. 2- Artigo 2: <i>The in vitro effect of N-acetyl-L-cysteine on glutathione and sulfhydryl levels in X-linked adrenoleukodystrophy patients</i>	61
4. DISCUSSÃO GERAL	76
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	91
6. PERSPECTIVAS.....	93
7. REFERÊNCIAS.....	94

8. ANEXOS	110
8.1 Carta de aprovação do Comitê de Ética do HCPA.....	110
8.2 Ficha de dados dos pacientes.....	111
8.3 Ficha de dados de indivíduos controle	113
8.4 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: pacientes com Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X	115
8.5 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: indivíduos controle.....	117

RESUMO

Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (X-ALD) é um Erro Inato do Metabolismo dos peroxissomos, que se caracteriza pelo acúmulo de ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA) em fluidos e tecidos corporais. 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 e o estresse oxidativo podem estar relacionados com a fisiopatologia da doença. Considerando que ainda não foi reportado dano ao DNA em pacientes X-ALD, e que muitos estudos vêm investigando as propriedades antioxidantes de N-acetil-L-cisteína (NAC), rosuvastatina (RSV) e trolox (TRO), os objetivos deste trabalho foram avaliar o dano ao DNA em HTZ e pacientes sintomáticos portadores de X-ALD, verificar o efeito *in vitro* de NAC, TRO e RSV sobre o dano ao DNA nestes pacientes, estudar associações entre o dano ao DNA e a peroxidação lipídica e, por fim, investigar a capacidade da NAC em aumentar, *in vitro*, os níveis de glutathiona (GSH) e sulfidrilas nos pacientes X-ALD. Não foi verificada diferença significativa no dano ao DNA em mulheres HTZ, quando comparado a controles. Em contraste, pacientes sintomáticos apresentaram um maior índice de dano ao DNA comparado às HTZ e ao grupo controle. No ensaio *in vitro*, foi observado que os antioxidantes NAC (1 e 2,5 mM), TRO (25 e 75 μ M) e RSV (0,5; 2 e 5 μ M) foram capazes de reduzir o dano ao DNA em pacientes sintomáticos a níveis de controle. Além disso, observamos uma correlação positiva entre o dano ao DNA e o nível de isoprostanos urinários (biomarcador de dano a lipídios), o que nos permite inferir que o dano ao DNA poderia estar sendo causado por processos oxidativos em pacientes sintomáticos. Verificou-se também que os conteúdos de glutathiona eritrocitária e sulfidrilas plasmáticas estavam diminuídos em pacientes X-ALD (independentemente do fenótipo) e que 5 mM de NAC, *in vitro*, foi capaz de aumentar estes parâmetros a níveis de controle saudáveis. O presente trabalho fornece evidências experimentais de que há dano ao DNA em pacientes X-ALD, os quais possuem níveis diminuídos de GSH e sulfidrilas, e que a administração dos antioxidantes NAC, TRO e RSV poderia ser considerada uma terapia adjuvante no tratamento da X-ALD.

ABSTRACT

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is an inborn error of peroxisome metabolism which is characterized by the accumulation of very long chain fatty acids (VLCFA) in tissue and body fluids. It is caused by mutations in the ABCD1 gene, which encodes a protein responsible for transporting VLCFA from cytosol to peroxisomes to be oxidized. Although the mechanisms underlying tissue damage are still poor understood, studies have been shown that the accumulation of toxic metabolites and oxidative stress may be related to the pathophysiology of X-ALD. Considering that DNA damage was not reported in X-ALD patients yet, and that former studies have been investigated the antioxidant properties of N-acetyl-L-cistein (NAC), rosuvastatin (RSV) and trolox (TRO), the aims of this study were to evaluate DNA damage in HTZ and symptomatic X-ALD patients, to study the in vitro effect of NAC, TRO and RSV on DNA damage in these patients, to look for associations between DNA damage and lipid peroxidation and to verify the ability of NAC in increasing, in vitro, glutathione (GSH) and sulfhydryl levels on X-ALD patients. It was verified no significant difference on DNA damage in HTZ women when compared to controls. In contrast, symptomatic patients presented higher DNA damage levels, compared to HTZ and control group. In the vitro assay, it was observed that the antioxidants NAC (1 e 2,5 mM), TRO (25 e 75 μ M) and RSV (0,5; 2 e 5 μ M) were able to reduce DNA damage in symptomatic patients until control levels. Likewise, our results showed positive correlation between DNA damage and urinary isoprostanes (biomarker of lipid damage), allowing us to hypothesize that DNA damage might be caused by oxidative processes in symptomatic patients. It was also verified that the plasmatic sulfhydryl content and erythrocyte glutathione levels were decreased in X-ALD patients (regardless of the phenotype) and that 5mM of NAC in vitro was able to increase these parameters until control levels. The present work yields experimental evidence that DNA damage occurs in X-ALD patients, which have GSH and sulfhydryl levels reduced and that the administration of the NAC, TRO and RSV antioxidants might be considered as an adjuvant therapy for X-ALD.

LISTA DE ABREVIATURAS

4-HNE – 4-hidroxinonenal
ABC – do inglês *ATP-binding cassette*
ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico
ALDP – Proteína transmembrana peroxissomal
AMN – Adrenomieloneuropatia
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
CCER – do inglês *Childhood cerebral form*
CEL – Carboxietil - lisina
CML – Carboximetil - lisina
CuZn-SOD – Superóxido Dismutase Cobre e Zinco
DBP – Doença da Biogênese do Peroxissomo
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EC-SOD – Superóxido Dismutase Extracelular
EIM – Erros Inatos do Metabolismo
eNOS – Óxido Nítrico Sintase endotelial
ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
GPx – Glutathiona Peroxidase
GSH – Glutathiona Reduzida
GSSG – Glutathiona Oxidada
GTE – Glicerol trierucato
GTO – Glicerol trioleato
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HTZ – Heterozigotas
IL1 β – Interleucina 1 β

IL6 – Interleucina 6
iNOS – Óxido Nítrico Sintase induzível
MDA – Malondialdeído
MDAL – Malondialdeído - lisina
Mn-SOD – Superóxido Dismutase Manganês
mtDNA – DNA mitocondrial
NAC – N-acetil-L-cisteína
NO[•] – Óxido nítrico
O₂^{•-} – Ânion superóxido
OH[•] – Radical hidroxila
OL – Óleo de Lorenzo
ONOO[•] – Peroxinitrito
RL – Radical livre
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RNA – Ácido ribonucleico
RSV – Rosuvastatina
SAAA – Semialdeído aminoadípico
SAG – Semialdeído glutâmico
SNC – Sistema Nervoso Central
SOD – Superóxido Dismutase
TAR – Reatividade Antioxidante Total
TAS – Status Antioxidante Total
TBA-RS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF α – Fator de Necrose Tumoral alfa
TRO – Trolox
VLCFA – do inglês *Very Long Chain Fatty Acids*
X-ALD – Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fenótipos clínicos masculinos em X-ALD.....	17
Tabela 2: Fenótipos clínicos em mulheres HTZ para X-ALD.....	18
Tabela 3: Valores referenciais de VLCFA para o plasma em $\mu\text{mol/L}$	19

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 Peroxissomos

Peroxissomos são organelas com diâmetro de 0,2 a 1 μM , 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 β -oxidação de ácidos graxos, especialmente ácidos graxos de cadeia muito longa (*do inglês Very Long Chain Fatty Acid - VLCFA*), a síntese de fosfolipídios e ácidos biliares em mamíferos. Para que estas rotas metabólicas ocorram, é necessário o transporte de metabólitos para fora ou para dentro do peroxissomo. Atualmente, 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 ABCD1) (Wanders et al., 2006; Islinger et al., 2010; Morita e Imanaka, 2012).

1.3 Doenças Peroxissomais

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 hiperpípecólica 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 β -oxidação (como a deficiência da acil-CoA oxidase, proteína bifuncional e tiolase) e acatalasemia (deficiência de catalase).

1.4 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 normal, 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).

A 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 (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).

Este Erro Inato do Metabolismo 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 α - TNF α , interleucinas - IL1 β 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 para 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 progressiva e inflamatória rapidamente, 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. 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 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 (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%). A forma assintomática inclui indivíduos com anormalidades bioquímicas e genéticas, entretanto sem manifestações adrenais ou envolvimento cerebral (Berger et al., 2006; Moser et al., 2005).

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.

Fenótipo	Descrição	Frequência relativa
Cerebral infantil (cALD)	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%
Cerebral juvenil	Idade inicial: 11-20 anos. Semelhante a cALD. Insuficiência adrenal.	4-7%
Cerebral adulta	Sintomas cerebrais sem envolvimento de medula espinhal. Insuficiência adrenal.	2-3%
Adrenomieloneuropatia (AMN) AMN puro	Idade inicial: 20-29 anos. Envolvimento da medula espinhal e nervos periféricos. Lenta progressão. Insuficiência adrenal.	25-30%

AMN cerebral	“AMN” com envolvimento inflamatório cerebral.	10-12%
Olivo-ponto cerebelar	Envolvimento cerebelar (Ataxia cerebelar) (1 caso infantil; 7 adultos).	1-2%
“Addison-only”	Insuficiência adrenal primária. Sem evidência de anormalidade cerebral.	Variável com a idade. Mais de 50% na infância.
Assintomático	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

Fenótipo	Descrição	Frequência relativa
Forma assintomática	Sem evidência de anormalidade neurológica ou adrenal	Diminui com a idade. Maioria das mulheres < 30 anos sem envolvimento neurológico
Mieloneuropatia Branda Moderada à severa	AMN mais tardio e brando	Aumenta com o avançar da idade (> 40 anos) 50% 15%
Cerebral	Raramente visto na infância. Pouco mais comum na meia-idade.	2%
Insuficiência Adrenal	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, é necessário avaliar a concentração plasmática do ácido hexacosanóico (C26:0), 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). 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 dos VLCFA (C22:0, C24:0 e 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.

Indivíduos (n=30)	C_{22:0}	C_{24:0}	C_{26:0}	C_{24:0}/C_{22:0}	C_{26:0}/C_{22:0}
Controles					
Média	79,8	53,8	1,16	0,72	0,02
Limite 5%-95%	40,7-118,9	31-76,5	0,78-1,54	0,6-0,84	0,01-0,03
HTZ (♀)					
Média	28,2	19,1	1,42	0,50	0,05
Limite 5%-95%	6,7-49,8	0-39,7	0,66-2,20	0,32-0,68	0,04-0,06

X-ALD (♂)					
Média	57,2	71,6	4,32	1,31	0,08
Limite 5%-95%	29,9-84,5	35,6-107,6	1,62-7,02	0,89-1,73	0,04-0,12

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

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).

1.4.1 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 diminuição do processo de desmielinização no cérebro (Moser et al., 2001).

Caso a insuficiência adrenal não seja tratada, as concentrações baixas de cortisol e do ACTH podem ser letais. Quando os níveis destes hormônios 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., 2008a). 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).

1.5 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 (Giuvili 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 glutathione 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 Cu e Zn 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 glutathione reduzida (GSH) como co-substrato. A redução de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos se dá através da GSH para formar glutathione 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 aminoacidopatias, acidemias orgânicas, e doenças peroxissomais (Barschak et al., 2006; Sitta et al., 2009a; Vargas et al., 2004). 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).

1.5.1 Dano ao DNA

Singh e col. (1988) descreveram uma técnica conhecida como ensaio cometa alcalino, cujo objetivo consiste em medir o dano ao DNA resultante da sua fragmentação. Os fragmentos de DNA migram para fora do núcleo, formando uma espécie de cauda de cometa, a qual é proporcional ao dano. Células que não apresentam lesões no DNA permanecem com o núcleo intacto. Em comparação com outras técnicas, o teste do cometa tem vantagens, especialmente em termos de tamanho e processamento de amostras e tem sido utilizado em estudos *in vitro* e estudos de intervenção dietética em humanos (Moller et al., 2004; Pool-Zobel et al., 1997; Ravanat et al., 2004).

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). O OH^{\cdot} é considerado o mais danoso dos RLs e pode produzir mais de vinte diferentes produtos quando ataca as bases do DNA (Cooke et al., 2006). 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). Em diversas patologias já foram identificados danos ao DNA, incluindo Erros Inatos do Metabolismo (Filippon et al., 2011; Negretto et al., 2014; Sitta et al., 2009b).

1.6 Estresse Oxidativo na X-ALD e estudos com antioxidantes

O estresse oxidativo em pacientes X-ALD vem sendo, há anos, 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, 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; Rockenbach et al., 2012; Vargas et al., 2004).

A reatividade antioxidante total (TAR), 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 (TAS – 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., 2008b; Vargas et al., 2004).

Os marcadores de oxidação proteica mais específicos são representados pelo semialdeído glutâmico (SAG) e semialdeído aminoadípico (SAAA) (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 SAG, SAAA, 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 NO[•] e o ONOO[•] são RLs capazes de inibir a respiração mitocondrial e o sistema enzimático antioxidante, induzir a peroxidação lipídica e inibir a β -oxidação de VLCFA em células gliais. Assim, Gilg e col. (2000) verificaram que a enzima formadora de NO[•], a Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS) está expressa ao redor de áreas desmielinizadas em cérebro de pacientes X-ALD. Corroborando com este achado, Powers e col. (2005), verificaram um aumento da expressão da iNOS em astrócitos e macrófagos juntamente com proteínas nitrosiladas nas lesões desmielinizantes. Este estudo também demonstrou evidências de estresse oxidativo, através da superexpressão das enzimas antioxidantes Mn-SOD e hemoxigenase-1 e aumento de MDA e de 4-hidroxinonenal (4-HNE), que são produtos de lipoperoxidação, em córtex adrenal e cérebro de pacientes com X-ALD.

Importantes enzimas de defesa antioxidantes se mostraram alteradas em estudos envolvendo pacientes X-ALD. A atividade da enzima GPx aumentou moderadamente, enquanto que as enzimas CAT e SOD apresentaram um aumento bastante acentuado em eritrócitos de pacientes com fenótipo cALD. A alteração da atividade destas enzimas provavelmente

seja em resposta ao alto nível de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ que estariam sendo formados (Vargas et al., 2004). Em outro estudo, entretanto, estes achados não foram corroborados, uma vez que a atividade da GPx e da SOD em pacientes X-ALD se mostraram similares à de controles sadios (Petrillo et al., 2013).

Neste contexto, Petrillo e col. (2013) também analisaram a desregulação da homeostase redox em sangue de pacientes X-ALD, com particular foco no sistema da GSH, a qual fornece a principal defesa celular contra o dano oxidativo. O estudo verificou uma significativa diminuição na concentração de GSH, e um significativo aumento tanto na concentração da forma oxidada GSSG quanto na razão GSSG/GSH em pacientes AMN, confirmando o desbalanço oxidativo nestes pacientes.

Brose e col. (2012) verificaram que uma redução de função da variante do gene da SOD2 está associada com a desmielinização em pacientes com o fenótipo cerebral. Portanto, considerando que pacientes com acometimento cerebral apresentam redução da atividade da SOD2, a genotipagem desta enzima ou ensaios enzimáticos poderiam ser usados como medida preditiva no desenvolvimento cerebral da doença.

No que concerne ao tratamento, 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, bem como uma redução da concentração plasmática de C26:0 (ácido hexacosanóico). Este estudo, portanto, reforça a ideia de que o transplante de medula óssea, quando bem sucedido e sob recomendação, deve ser considerado uma possível estratégia terapêutica para pacientes X-ALD. Além disso, cabe salientar que o transplante

de medula óssea estabiliza os sintomas neurológicos em pacientes ainda assintomáticos (Tolar et al., 2007).

Visto que os tratamentos atualmente preconizados não são totalmente satisfatórios e também não estão direcionados para os aspectos neuroinflamatórios da doença, há necessidade da emergência de outras estratégias terapêuticas. Estudos anteriores mostraram que a rosuvastatina (RSV), inibidora da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase, atenuou o estresse oxidativo mediante supressão da enzima NADPH oxidase, superexpressão da enzima SOD e diminuição de biomarcadores de estresse oxidativo, acompanhado da redução do colesterol (Resch et al., 2006; Verreth et al., 2007). Adicionalmente, também foi verificado que a RSV preveniu, *in vitro*, o dano ao DNA induzido por peróxido via upregulação da síntese da GSH (Schupp et al., 2008).

Tolar e col. (2007) mostraram que o antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC), quando administrado antes e após o transplante de medula óssea, 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 transplante de medula óssea. Adicionalmente, pesquisas verificaram que a NAC demonstrou capacidade de inibir a formação de radicais livres, como $O_2^{\cdot-}$, em células gliais enriquecidas com C26:0. Além da NAC, outra possível terapia para X-ALD seria a administração de vitamina E, uma vez que o trolox (TRO) (análogo

hidrossolúvel da vitamina E) reverteu, *in vitro*, lesões oxidativas em fibroblastos de pacientes X-ALD (Di Biase et al., 2005; Fourcade et al., 2008).

Ainda que a fisiopatologia da X-ALD não esteja muito bem esclarecida, os dados sobre marcadores de estresse oxidativo apresentados acima são indicativos de que o desbalanço redox esteja envolvido na X-ALD, sugerindo que o mesmo possa explicar, pelo menos em parte, o comprometimento neurológico dos pacientes nesta doença. Além disso, a administração de antioxidantes poderia ser considerada uma terapia adjuvante no tratamento destes pacientes.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Considerando as evidências do envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia da X-ALD e a falta de dados na literatura reportando o dano ao DNA nestes pacientes, o objetivo geral do trabalho foi verificar o dano ao DNA em mulheres HTZ e pacientes sintomáticos, avaliar o efeito *in vitro* de NAC, RSV e alfa-tocoferol (na forma de seu análogo hidrossolúvel – TRO) sobre o dano ao DNA nos leucócitos destes pacientes, procurar por associações entre o dano ao DNA e a peroxidação lipídica e verificar, também, o efeito *in vitro* da NAC sobre os conteúdos de GSH e sulfidrina nos pacientes X-ALD.

2.2 *Objetivos específicos*

- a) Avaliar o dano ao DNA em mulheres HTZ e pacientes sintomáticos, através do ensaio cometa em leucócitos;
- b) Verificar o efeito *in vitro* da NAC sobre dano ao DNA, nas concentrações de 1 e 2,5 mM;
- c) Verificar o efeito *in vitro* de TRO sobre dano ao DNA, nas concentrações de 25 e 75 μ M;
- d) Verificar o efeito *in vitro* da RSV sobre dano ao DNA, nas concentrações de 0,5, 2 e 5 μ M;
- e) Determinar os níveis de isoprostanos urinários;
- f) Correlacionar o dano ao DNA com os níveis de isoprostanos urinários;
- g) Dosar o conteúdo de glutathiona eritrocitária e sulfidrina plasmática em pacientes X-ALD;

h) Verificar o efeito *in vitro* da NAC sobre o conteúdo de glutathiona e sulfidril, nas concentrações de 2,5 mM e 5 mM.

3. RESULTADOS

Os resultados desta dissertação de mestrado serão apresentados na forma de capítulos, referentes a artigos científicos.

3.1 Capítulo 1- Artigo 1: *Protective effect of antioxidants on DNA damage in leukocytes from X-linked adrenoleukodystrophy patients*

Este artigo científico foi submetido ao periódico *International Journal of Developmental Neuroscience*

Title: Protective effect of antioxidants on DNA damage in leukocytes from X-linked adrenoleukodystrophy patients

Authors: Desirée P. Marchetti ^{a*}, Bruna Donida ^b, Helen T. da Rosa ^c, Paula R. Manini ^c, Dinara J. Moura ^c, Jenifer Saffi ^c, Marion Deon ^{b,d}, Caroline P. Mescka ^a, Daniella M. Coelho ^d, Laura B. Jardim ^d, Carmen R. Vargas ^{a,b,d*}.

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Bioquímica, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Av. Ipiranga, 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Universidade Federal de Ciências de Saúde de Porto Alegre, UFSPA, Rua Sarmiento Leite, 245, CEP 90050170, Porto Alegre, RS, Brazil.

^d Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Authors e-mails: desireepmarchetti@gmail.com, donida.bruna@gmail.com; htdarosa@gmail.com; maninipaula@gmail.com; dinjamoura@gmail.com; jenifer.saffi@gmail.com; marion_deon@yahoo.com.br, carolmescka@yahoo.com.br, dcoelho@hcpa.ufrgs.br, ljardim@hcpa.ufrgs.br, crvargas@hcpa.ufrgs.br.

***Correspondence:**

Corresponding authors 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:

crvargas@hcpa.ufrgs.br (Prof^a. Dr^a. Carmen Regla Vargas)
desireepmarchetti@gmail.com (Desirée Padilha Marchetti)

Abbreviations: AMN: Adrenomieloneuropathy; C22:0: Docosanoic acid; C24:0: Tetracosanoic acid; C26:0: Hexacosanoic acid; CCER: Childhood cerebral form; IEM: Inborn Error of Metabolism; NAC: N-acetyl-L-cysteine; PBS: Phosphate Buffer Saline; RSV: Rosuvastatin; TAR: Total Antioxidant Reactive; TAS: Total Antioxidant atus; TBA-RS: Thiobarbituric acid-reactive substances; TRO: Trolox; VLCFA: very long chain fatty acids; X-ALD: X-Linked Adrenoleukodystrophy.

Abstract

Toxic metabolites accumulation and oxidative stress have been associated to the pathophysiology of X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD), an inborn error of peroxisome metabolism. Parameters of oxidative damage to proteins and lipids in X-ALD patients were already described in literature; however, DNA injuries were not studied yet. Considering that, the aims were to investigate DNA damage by comet assay in heterozygotes and symptomatic X-ALD patients, to look for associations between DNA damage and lipid peroxidation as measured by urinary 15-F2t-isoprostane; and to evaluate the *in vitro* effect of N-acetyl-L-cysteine (NAC), trolox (TRO) and rosuvastatin (RSV) on DNA damage in leukocytes from symptomatic patients. Symptomatic patients presented higher DNA damage levels than those found in heterozygotes and controls; heterozygotes and controls showed similar results. In order to investigate the *in vitro* antioxidant effect on DNA damage, whole blood cells from symptomatic patients were incubated with NAC (1 and 2.5 mM), TRO (25 and 75 μ M) and RSV (0.5, 2 and 5 μ M) before DNA damage analysis. NAC, TRO and RSV, at all tested concentrations, were all capable to reduce DNA damage in symptomatic X-ALD patients until control levels. Finally, DNA damage correlated with urinary isoprostanes, allowing to hypothesize that DNA damage might be induced by lipid peroxidation in symptomatic patients. The present work yields experimental evidence that NAC, TRO and RSV reduce the *in vitro* DNA injury in symptomatic X-ALD patients, what may suggest that the administration of these antioxidants might be considered as an adjuvant therapy for X-ALD.

Keywords

X- linked adrenoleukodystrophy; N-acetyl-L-cysteine; Trolox; Rosuvastatin; DNA damage.

1. Introduction

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is the most frequent inherited peroxisomal disease, with an estimated incidence of 1:21,000 for hemizygotes men and of 1:14,000 for heterozygotes women (Bezman et al., 2001). This disorder is caused by mutations in *ABCD1* gene (located at chromosome Xq28) which encodes the peroxisomal ATP-binding cassette (ABC) transporter, ABCD1 protein (formerly adrenoleukodystrophy protein, ALDP) responsible for transporting very long chain fatty acids (VLCFA) into the peroxisomes for degradation by β -oxidation (Moser 1997; Moser et al., 2001, 2005). This inborn error of metabolism (IEM) is characterized by progressive demyelination of the white matter, adrenal insufficiency and VLCFA accumulation, mainly hexacosanoic (C26:0) and tetracosanoic acids (C24:0), in body fluids and tissues (Moser et al., 1999, 2001, 2005).

X-ALD is a clinically heterogeneous disease with a wide phenotypic variety that manifests in different age groups (Moser, 1997). There is no clear pattern of genotype-phenotype correlation since several phenotypes may occur in the same family, ranging from severe and rapidly progressive forms (i.e. childhood cerebral form – CCER) which progress to death within a few years, until slowly progressive paraparesis compatible with life. Seven phenotypes have been described in male patients (i.e., 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) (Moser et al., 2001).

Recent reports have shown that neurological impairments were present in 63 to 87% of heterozygotes. The most prominent findings were involvement of corticospinal and sensory ascendant tracts, and a peripheral neuropathy, all clearly related to ageing (Engelen et al., 2014; Habekost et al., 2014; Horn et al., 2013). Otherwise, cerebral involvement and adrenal insufficiency are rare.

The reasons for patients develop different clinical forms might be environmental, genetic or both (Berger and Gärtner 2006; Moser et al., 2005). Currently, the diagnosis of X-ALD hemizygotes and female carriers 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 (Moser and Moser, 1991). However, it is important to emphasize that the mutation analysis is considered the best method to establish the carrier status in women, whereas false negative results may occur in 15–20% of the VLCFA determinations for heterozygotes individuals (Maier et al., 2002; Moser et al., 1999).

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 (specially unsaturated fatty acids) and catecholamines, which are highly susceptible to free radical attack (Halliwell and Gutteridge, 2007). Although mechanisms underlying tissue damage in X-ALD are poorly known, a number of researches have demonstrated the role of oxidative damage to lipid and proteins in the pathophysiology of this disorder (Deon et al., 2007, 2008a, 2008b; Vargas et al., 2004).

It is well-known that free radicals may cause DNA damage by interaction with transition metals in the Haber-Weiss reaction, engendering several classes of products (single- and double-strand breaks), inter/intra-strand cross-links, DNA-proteins cross-links and sugar fragmentation products (Halliwell and Gutteridge, 2007). Whether cellular repair mechanisms fail, deleterious consequences may occur, like mutations, deletions, cancer and even cell death (Cooke et al., 2006; Marnett et al., 2000). Recently, DNA damage has been described in some IEM (Filippon et al., 2011; Negretto et al., 2014; Sitta et al., 2009), but no one study investigated DNA damage in X-ALD.

Several studies involving diet modification, use of drugs and bone marrow transplantation have been developed to achieve the main goals of a successful treatment, but there is not any satisfactory therapy for X-ALD yet. Since *in vitro* and *in vivo* trials using antioxidants have been conducted in order to elucidate the role of these compounds on X-ALD treatment (Di Biase et al., 2005;

Fourcade et al., 2008; Schupp et al., 2008; Tolar et al., 2007), in this work we sought to investigate the DNA damage in X-ALD patients, the *in vitro* effect of N-acetyl-L-cysteine (NAC), rosuvastatin (RSV), and alpha-tocopherol on DNA damage, and to look for associations between DNA damage and lipid peroxidation in these patients.

2. Materials and Methods

2.1 Subjects

A total of five heterozygotes with ages varying between 26-44 years and six symptomatic patients (three CCER and three AMN) with ages varying between 8-27 years were included in this study. X-ALD patients had their diagnosis confirmed by VLCFA determination and mutation analysis. The control group consisted of eight healthy subjects with ages varying between 19-23 years. This research was approved by the Ethics Committee of *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, RS, Brazil (number 13-0247), and all the subjects or parents gave informed written consent.

2.2 Samples collection and preparation

Venous blood was collected under sterile conditions in heparinized vials. Immediately, aliquots of whole blood cells were submitted to comet assay or the *in vitro* study protocol with the antioxidants NAC, RSV and alpha-tocopherol (in the form of its hydrosoluble analogue trolox - TRO). Occasional urine samples were collected in sterile flasks, aliquoted and frozen at - 80°C until isoprostanes analysis.

2.3 In vitro effect of antioxidants on DNA damage

All antioxidants solutions were diluted with phosphate buffered saline (PBS buffer) immediately prior to use. Whole blood from each subject was incubated with NAC (1 and 2.5 mM), TRO (25 and 75 µM), and RSV (0.5, 2 and 5 µM) for 6 hours at 37°C, following the comet assay protocol (Abt et al., 1997; Cemeli et al., 2009; Schupp et al., 2008). The proportion of blood and antioxidants solutions diluted in PBS buffer used was 1:3 (Hartmann et al., 2003; Tice et al., 2000).

2.4 DNA damage by comet assay

The alkaline comet assay, that measures single and double DNA strand breaks, was performed as described by Singh et al. (1988) in accordance with general guidelines for use of the comet assay (Tice et al., 2000). Aliquots of 10 μL freshly collected whole blood were mixed with 90 μL low melting point agarose (0.7% in phosphate buffer) and added to microscope slides precoated with 1.5% agarose. Slides were placed in ice-cold lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris pH 10.0-10.5 with 10% DMSO and 1% Triton X-100) to remove cell proteins, leaving DNA as “nucleoids”. After the lysis-buffer procedure, the slides were covered with fresh buffer (300mM NaOH and 1mM EDTA, pH>13) for 15 minutes to allow DNA unwinding and then, electrophoresis was performed for 15 minutes (25 V; 300mA; 0.9 V/cm). Slides were neutralized with 0.4 M Tris (pH 7.5), washed in bi-distilled water and stained using silver nitrate staining protocol (Nadin et al., 2001). For DNA damage evaluation, 100 cells per sample were analyzed by optical microscopy at 100x magnification. The cells were visually scored by measuring the DNA migration length and the amount of DNA in the tail into five classes, from undamaged –0 to maximally damaged –4, and a damage index (DI) value was calculated for each sample. International guidelines and recommendations for the comet assay consider that visual scoring of comets is a well-validated evaluation method (Collins et al., 2008; Tice et al., 2000). Damage index, thus, ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells \times 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells \times 4). The slides were analyzed under blind conditions at least by two different individuals.

2.5 Urine 15-F2t-isoprostane determination

15-F2t-isoprostane, a product of arachidonic acid metabolism and a biomarker of lipid peroxidation, was measured by a competitive enzyme-linked immunoassay (ELISA) (Oxford Biomed, EA 85), according the kit's instructions. First, the urine samples were mixed with dilution buffer. The 15-F2t-isoprostane in the urine samples competes with the 15-F2t-isoprostane conjugated to horseradish peroxidase (HRP) for the binding to a specific antibody fixed on the

microplate. The concentration of 15-F2t-isoprostane was determined by the intensity of color developed after the substrate was added (wavelength at 630 nm). Results were expressed as picograms of isoprostanes per mg of urinary creatinine.

2.6 Urinary creatinine determination

Urinary creatinine was determined by picric acid method — Creatinine K kit of Labtest® (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brazil). Urinary creatinine reacts with picric acid under alkaline conditions producing an orange color whose absorbance was determined in a spectrophotometer at 492 nm. The results were expressed in mg/dL.

2.7 Statistical analysis

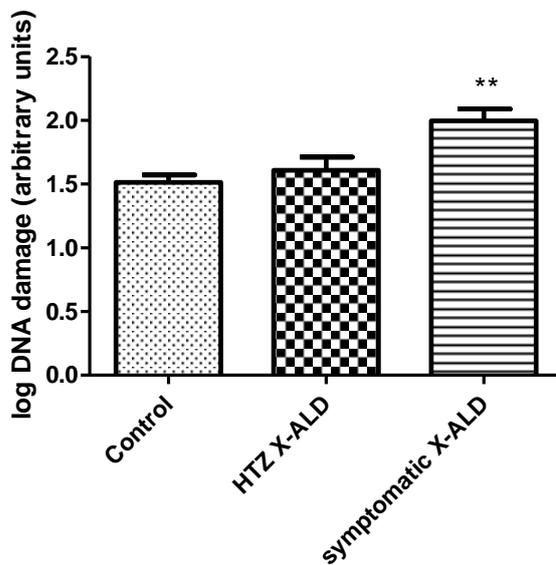
Data were expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). Normal distribution was tested by Shapiro-Wilk test. Logarithmic (log) transformation was done in data not normally distributed (heterozygotes data) in order to transform them in parametric. Comparisons between means were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan. Correlations were performed by Pearson's correlation coefficient. Differences were considered statistically significant when p value was lower than 0.05. Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, USA — SPSS version 19.0) software, and graphics were constructed in GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA — version 5.0) software.

3. Results

3.1 DNA damage evaluation

In this work, we evaluated DNA damage in heterozygotes and symptomatic X-ALD patients. It is important to emphasize that it was not observed a significant difference between the phenotypes included in the symptomatic group (CCER and AMN patients) in what concern DNA damage. Figure 1 shows no significant difference between DNA damage in heterozygotes and controls, however, DNA damage was significantly increased in symptomatic X-ALD patients [$F(2, 16)=10.15$, $P<0.01$].

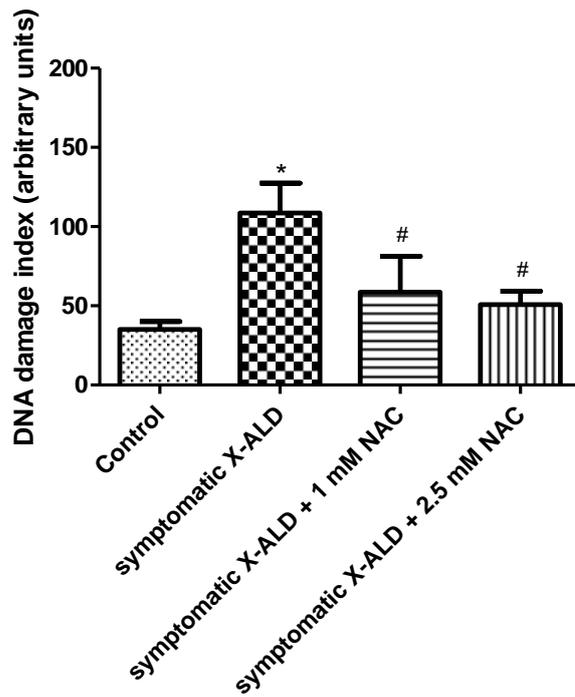
Figure 1



3.2 *In vitro* effect of NAC

Figure 2 shows the *in vitro* effect of NAC (1 and 2.5 mM) on DNA damage in symptomatic X-ALD patients. We observed that the two NAC concentrations were able to reduce DNA damage in symptomatic X-ALD patients, equaling to control levels [$F(3, 22)=4.87$, $P<0.05$].

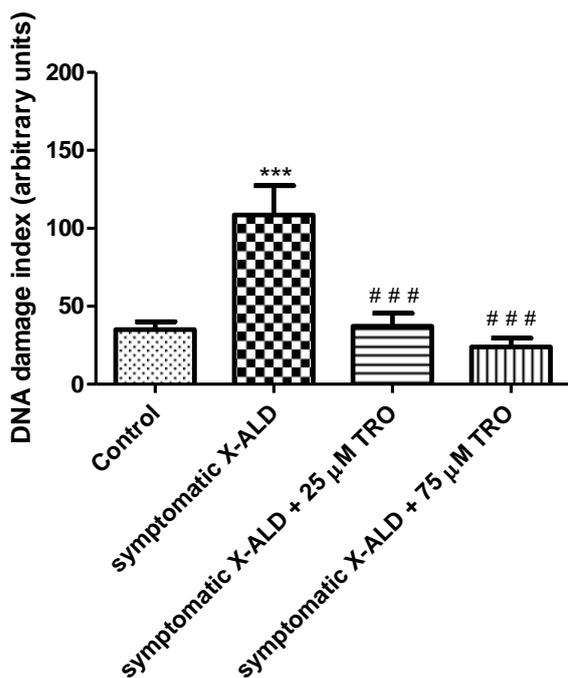
Figure 2



3.3 *In vitro* effect of TRO

It was assessed the *in vitro* effect of TRO (25 and 75 μ M) on DNA damage in symptomatic X-ALD patients. We verified that the two TRO concentrations diminished the DNA damage present by symptomatic X-ALD patients, equaling to control levels (Figure 3) [$F(3, 22)=13.36$, $P<0.001$].

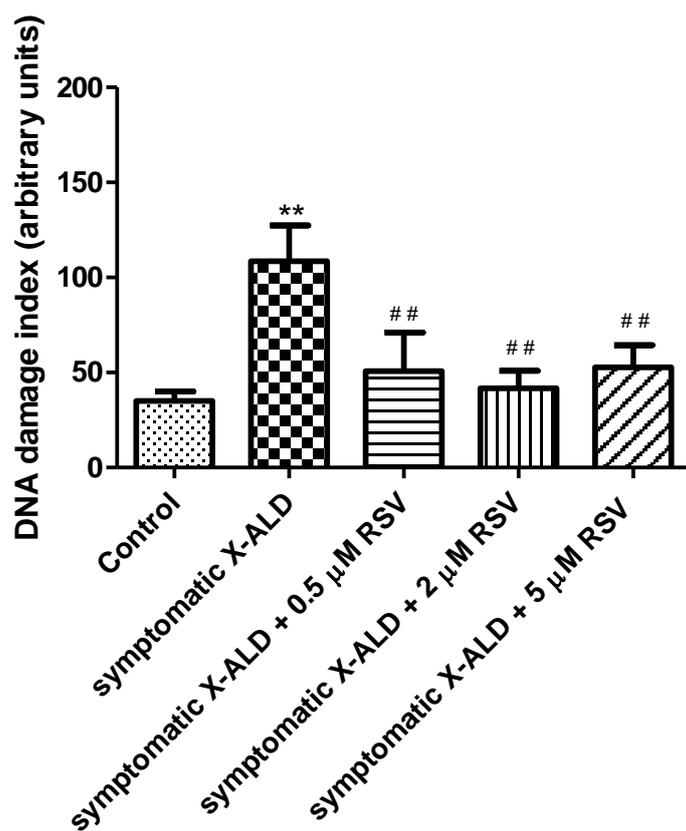
Figure 3



3.4 In vitro effect of RSV

Figure 4 shows that RSV, at the three concentrations (0.5, 2 and 5 μM), was able to reverse the DNA damage in symptomatic X-ALD patients until the control levels [F(4, 27)=4.68, P<0.01].

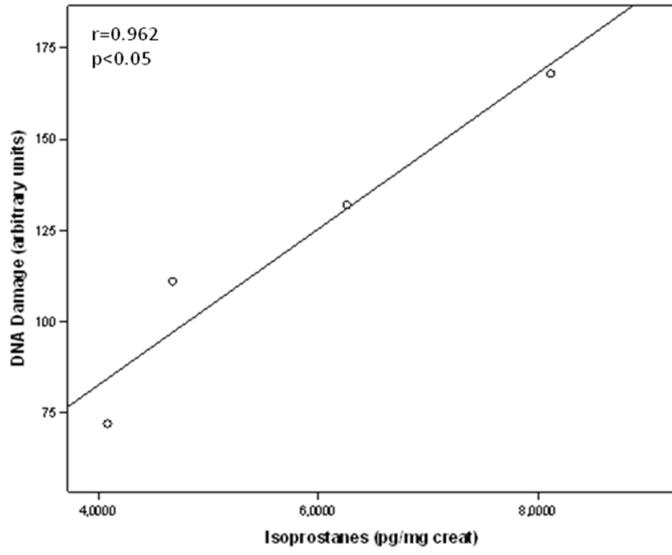
Figure 4



3.5 Correlation between DNA damage and urinary isoprostanes levels

The urinary excretion of isoprostanes, a product of arachidonic acid metabolism, represents oxidative damage to lipids. Despite this parameter did not show significant difference between heterozygotes, symptomatic patients and control group (data not shown), it was observed a strong significantly positive correlation between DNA damage and urine isoprostanes levels in symptomatic X-ALD patients (Figure 5) ($r=0.962$; $p<0.05$).

Figure 5



4. Discussion

X-ALD is an inborn error of peroxisome metabolism, characterized by progressive demyelination of the white matter and adrenal insufficiency. This disorder is caused by genetic defects in the *ABCD1* gene that encodes peroxisomal membrane protein (ALDP), which is responsible for the transport of VLCFA into peroxisomes to be oxidized. Although the mechanisms associated with tissue damage are poorly understood, it is believed that oxidative stress may contribute, at least in part, to pathophysiology of this disease (López-Erauskin et al., 2011; Moser 1997; Moser et al., 2001; Vargas et al., 2004).

Free radicals can cause damage to biomolecules such as proteins, lipids and DNA (Halliwell and Gutteridge, 2007). Hydrogen peroxide and superoxide radical may initiate DNA damage by interaction with transition metal, in particular iron and copper, in the metal-catalysed Haber–Weiss reaction, producing hydroxyl radical, which is the most frequently considered of damaging species (Halliwell and Gutteridge, 2007). Cells have evolved several mechanisms for protecting DNA molecules from damage, either by direct damage-removal or by providing enzymes as an aid in cell-tolerance. Whether these mechanisms fail, serious consequences may occur in the genome, like as mutations, microsatellite instability, loss of heterozygosity, chromosomal aberrations or neoplastic growth (Cooke et al., 2006; Moraes et al., 2012).

DNA damage has been associated with a number of pathologies, including neurodegenerative disorders like Parkinson and Alzheimer disease, and in some IEM (Filippon et al., 2011; Mecocci et al., 2002; Negretto et al., 2014; Sanders et al., 2014; Sitta et al., 2009). Considering that DNA injuries were not yet studied in X-ALD, in this work we aimed to investigate DNA damage in heterozygotes and symptomatic X-ALD patients by comet assay, which is a widely used method, extremely sensitive for detecting low levels of DNA damage, inexpensive and quick (Liao et al., 2009).

According to our results, heterozygotes showed similar DNA damage to control group. Other works have observed high formation of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), which is an indirect marker of lipid peroxidation and a

decrease of total antioxidant reactivity (TAR) in asymptomatic heterozygotes (Deon et al., 2008b). Considering the above, it may be assumed that heterozygotes women present oxidative imbalance and lipid damage but not DNA damage.

Our results showed higher DNA damage levels in symptomatic X-ALD patients compared to heterozygotes and controls. These data are in agreement with previous findings that shown induced oxidative stress in symptomatic X-ALD patients, in which it was verified a reduction of sulfhydryl content, an increased production of carbonyls and TBARS formation and a reduction of total antioxidant status (TAS) and TAR measurement, at the last ones represent the quantity and the quality of the tissue antioxidants, respectively (Deon et al., 2007; Vargas et al., 2004).

In order to verify whether different compounds could be able to reduce DNA damage in symptomatic X-ALD patients, we performed the *in vitro* comet assay, using NAC, TRO and RSV in different concentrations. First, whole blood cells from symptomatic X-ALD patients were incubated with 1 and 2.5 mM of NAC for 6h at 37°C and, then, DNA damage was assessed using comet assay. We observed that these two NAC concentrations were capable to reduce DNA damage in these patients, equaling to control levels.

NAC is an agent with antioxidant properties that stimulates glutathione synthesis, scavenges free radicals and it has been hypothesized to provide neuroprotective capacity (Ferrari et al., 1995; Harvey et al., 2008; Henderson et al., 1996). Several decades of toxicity data established that NAC administration is safe (even with long-term use) (Walson and Groth, 1993). Tolar et al. (2007) reported that peri-transplant administration of NAC was protective from fulminant demyelination in advanced symptomatic X-ALD patients. Abt et al. (1997) have verified that NAC seemed to be of limited value as a radioprotective agent against X-ray-induced DNA damage in human lymphocytes. Besides, there are experimental data available showing a protective effect of NAC against the damaging effects of UV-B irradiation on skin and epidermal DNA (Van den Broeke and Beijersbergen van Henegouwen,

1994) and against ionizing radiation-induced DNA damage in yeast cells (Reliene et al., 2009).

Some *in vitro* models studied the NAC role for X-ALD. A pre-treatment with arginine and NAC inhibited not only nitrite but also superoxide production in glial cells enriched with C26:0 (Di Biase et al., 2005). In the same context, López-Erauskin et al. (2012) have provided evidence that oxidative stress induced under galactose conditions led to mitochondrial damage in the form of mitochondrial inner membrane potential dissipation, ATP drop and necrotic cell death, together with increased levels of oxidative modifications in cyclophilin D protein in fibroblasts of X-ALD patients. Among the mitochondrial permeability transition pore components, cyclophilin D is the most studied and has been found increased under pathological conditions. NAC *in vitro* treatment rescued mitochondrial damage markers in fibroblasts from patients with X-ALD, including cyclophilin D oxidative modifications. Furthermore, a research using animal model for X-ALD showed that NAC, in combination with lipoic acid and TRO, reversed oxidative damage and energetic failure, together with the reversion of axonal degeneration and locomotor impairment (López-Erauskin et al., 2011).

TRO is a well-known analog of alpha-tocopherol (Halliwell and Gutteridge, 1996), which acts on lipid peroxy groups inside membrane bilayers, reducing them to hydroperoxides and thus inhibiting the propagation of the peroxidative chain reaction. TRO breaks the chain reaction but is itself converted to a radical during the process. The oxidized form can be recycled back to its reduced form by ascorbate or ubiquinone (coenzyme Q) (Sies and Stahl, 1995; Wang and Quinn, 1999). TRO displayed a protective effect against H₂O₂ in a modified comet assay with buccal cells (Szeto et al., 2005) and vitamin E exerted a protective action on DNA damage in human colonic mucosa cells induced by bleomycin (Wozniak et al., 2004). An *in vitro* study using cultured human fibroblasts enriched with high doses of C26:0 and TRO has demonstrated that this antioxidant prevented the induction of superoxide dismutase enzyme upon C26:0 treatment. In addition, TRO was able to induce reversion of oxidative lesions in X-ALD fibroblasts (Fourcade et al., 2008). Given its mechanism of

action, we presumed that TRO could be of help in reducing DNA damage in symptomatic X-ALD patients. We verified that TRO, at two tested concentrations (25 and 75 μ M), reduced DNA damage in symptomatic X-ALD patients, equaling to control levels. As previously mentioned, TRO in association with NAC reversed oxidative damage in an animal model of X-ALD (López-Erauskin et al., 2011).

The *in vitro* comet assay was also performed using RSV and, as observed for NAC and TRO, all RSV concentrations were able to reduce, until control levels, the DNA damage presented by symptomatic X-ALD patients. *In vitro* studies using RSV incubation have shown protective effects of this compound on DNA damage induced by hydrogen peroxide (Ajith et al., 2008; Schupp et al., 2008). 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, researchers have verified anti-inflammatory, antioxidant and antithrombotic effects of RSV (Athiros et al., 2009; Blum and Shamburek, 2009) as well as an effective capacity to reduce malondialdehyde (MDA) (lipid peroxidation biomarker) and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine (biomarker of DNA oxidative damage) in patients with diabetic nephropathy (Abe et al., 2011). Moreover, Mahalwar and coworkers (2013) have observed antioxidant effects of RSV by reducing NADPH-dependent production of reactive oxygen species, suppression of endothelial nitric oxide synthase and upregulation of antioxidant defense mechanisms.

Lipid peroxidation can be described generally as a process under which free radicals or nonradical species attack lipids, especially polyunsaturated fatty acids and engender a complex variety of reactive products (Yin et al., 2011). Isoprostanes are products derived from the non-enzymatic peroxidation of arachidonic acid and are considered to be reliable biomarkers of oxidant stress in the human body (Halliwell and Gutteridge, 2007). Former studies described the involvement of lipid peroxidation in X-ALD (Deon et al., 2007, 2008b; Vargas et al., 2004). Our results showed positive correlation between DNA damage and isoprostanes, suggesting that DNA damage might be caused by lipid peroxidation in symptomatic X-ALD patients. This interpretation is

supported by previous evidence showing that MDA can attack DNA to form adducts to deoxyguanosine and deoxyadenosine (Marnett, 1999).

Finally, in what concern to the underlying mechanisms by which NAC, TRO and RSV reduce DNA damage induced in X-ALD patients, it is possible to assume that NAC, TRO and RSV (three compounds that have antioxidants capabilities), may diminish DNA damage by reduction reactive species formation. Previous works, performed by our group and others, allow us to reinforce this hypothesis, since it has already been described lipid and protein oxidative damage by free radicals attack in X-ALD patients (Deon et al., 2007, 2008a, 2008b; Petrillo et al., 2013; Vargas et al., 2004).

In conclusion, our data show, for the first time in literature, high DNA damage levels in X-ALD patients and the *in vitro* protective effect of NAC, TRO and RSV on DNA damage. Moreover, this damage, is, presumably, oxidative and may be caused by lipid peroxidation. The ability of NAC, TRO and RSV to exert antioxidant effects *in vitro*, reducing DNA damage even in low concentrations, might be of relevance as an adjuvant treatment for X-ALD, since there is still not any satisfactory therapy for this disease. Nevertheless, the present *in vitro* results should be interpreted with caution and more experiments are necessary to elucidate this issue and to confirm the oxidative damage origin.

Conflict of interest disclosure

Desirée P. Marchetti, Bruna Donida, Helen T. da Rosa, Paula R. Manini, Dinara J. Moura, Jennifer Saffi, Marion Deon, Caroline P. Mescka, Daniella M. Coelho, Laura B. Jardim and Carmen R. Vargas 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*. Carmen R. Vargas and Laura B. Jardim are supported by CNPq.

References

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

Abt G, Vaghef H, Gebhart E, Dahlgren CV, Hellman B. The role of N acetylcysteine as a putative radioprotective agent on X-ray-induced DNA damage as evaluated by alkaline single-cell gel electrophoresis. *Mutat Res* 1997;384:55-64.

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

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

Berger J, Gärtner J. X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, biochemical and pathogenetics aspects. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763:1721-1732.

Bezman L, Moser AB, Raymond GV, Rinaldo P, Watkins PA, Smith KD, et al. Adrenoleukodystrophy: incidence, new mutation rate, and results o extended family screening. *Ann Neurol* 2001;49:512-517.

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

Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants and the Comet assay. *Mutat Res* 2009;681:51-67.

Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 2008;23(3):143-151.

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

Deon M, Sitta A, Barschak AG, Coelho D, Pigatto M, Schimitt G, et al. Introduction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Int J Devl Neurosci* 2007;25:441-444.

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

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

Di Biase A, Benedetto R, Salvati S, Attorri L, Leonardi F, Pietraforte D. 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* 2005;30(2):215-223.

Engelen M, Barbier M, Dijkstra IM, Schür R, de Bie RM, Verhamme C, et al. X-linked adrenoleukodystrophy in women: a cross-sectional cohort study. *Brain* 2014;137:693-706.

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

Filippon L, Vargas CR, Schwartz IGV, Giugliani R, Manfredini V, Wayhs CA, et al. DNA damage in leukocytes from pretreatment mucopolysaccharidosis type II patients; protective effect of enzyme replacement therapy. *Mutat Res* 2011;721:206-210.

Fourcade S, López-Erauskin J, Galino J, Duval C, Naudi A, Jove M, et al. Early oxidative damage underlying neurodegeneration in X-adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet* 2008;17:1762-1773.

Habekost CT, Schestatsky P, Torres VF, de Coelho DM, Vargas CR, Torrez V, 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.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford, UK: Clarendon Press; 1996. p. 188-266.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2007.

Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, et al. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. *Mutagenesis* 2003;18:45-51.

Harvey BH, Joubert C, du Preez JL, Berk M. 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* 2008;33:508-517.

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

Horn MA, Retterstøl L, Abdelnoor M, Skjeldal OH, Tallaksen CM. Adrenoleukodystrophy in Norway: high rate of de novo mutations and age-dependent penetrance. *Pediatr Neurol* 2013;48(3):212-219.

Liao W, McNutt MA, Zhu WG. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* 2009;48:46-53.

López-Erauskin J, Fourcade S, Galino J, Ruiz M, Schlüter A, Naudi A, et al. Antioxidants Halt Axonal Degeneration in a Mouse Model of X-Adrenoleukodystrophy. *Ann Neurol* 2011;70:84-92.

López-Erauskin J, Galino J, Bianchi P, Fourcade S, Andreu AL, Ferrer I, et al. Oxidative stress modulates mitochondrial failure and cyclophilin D function in X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain* 2012;135:3584-3598.

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

Mahalwar R, Khanna D. Pleiotropic antioxidant potential of rosuvastatin in preventing cardiovascular disorders. *Eur J Pharmacol* 2013;711:57-62.

Maier EM, Kammerer S, Muntau AC, Wichers M, Braun A, Roscher AA. Symptoms in carriers of Adrenoleukodystrophy relate to skewed X inactivation. *Ann Neurol* 2002;52(suppl 5):683-688.

Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 1999;424:83-95.

Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000;21:361–370.

Mecocci P, Polidori MC, Cherubini A, Ingegneri T, Mattioli P, Catani M, et al. Lymphocyte oxidative DNA damage and plasma antioxidants in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2002;59(5):794-798.

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

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

Moser HW. Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain* 1997;120:1485-1508.

Moser AB, Kreiter N, Bezman L, Lu S, Raymond GV, Naidu S, et al. Plasma very long chain fatty acids in 3,000 peroxisome disease patients and 29,000 controls. *Ann Neurol* 1999;45 (1):100-110.

Moser HW, Smith KD, Watkins PA, Powers J, Moser AB. X-linked adrenoleukodystrophy. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill Inc; 2001. p. 3257-3301.

Moser HW, Raymond GV, Dubey P. Adrenoleukodystrophy - new approaches to a neurodegenerative disease, JAMA 2005;294:3131-3134.

Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR. A silver staining method for single-cell gel assay. J Histochem Cytochem 2001;49(9):1183-1186.

Negretto GW, Deon M, Burinb M, Biancini GB, Ribas G, Garcia SC, et al. *In vitro* effect of genistein on DNA damage in leukocytes from mucopolysaccharidosis IVA patients. Mol Genet Metab 2014;111:205-208.

Petrillo S, Piemonte F, Pastore A, Tozzi T, Aiello C, Pujol A, et al. Glutathione imbalance in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. Mol Genet Metab 2013;109:366-370.

Reliene R, Pollard JM, Sobol Z, Trouiller B, Gatti RA, Schiestl RH. N-acetyl cysteine protects against ionizing radiation-induced DNA damage but not against cell killing in yeast and mammals. Mutat Res 2009 665:37-43.

Sanders LH, McCoy J, Hu X, Mastroberardino PG, Dickinson BC, Chang CJ, et al. Mitochondrial DNA damage: molecular marker of vulnerable nigral neurons in Parkinson's disease. Neurobiol Dis 2014;70:214-23.

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

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

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 1988;175(1):184-191.

Sitta A, Manfredinic V, Biasi L, Treméad R, Schwartzb IVD, Wajner M, et al. Evidence that DNA damage is associated to phenylalanine blood levels in leukocytes from phenylketonuric patients. Mutat Res 2009;679:13-16.

Szeto YT, Benzie IF, Collins AR, Choi SW, Cheng CY, Yow CM, et al. A buccal cell model comet assay: development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies, *Mutat. Res* 2005;578:371-381.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000;35:206-221.

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

Van den Broeke LT, Beijersbergen van Henegouwen GMJ. UV radiation protecting efficacy of cysteine derivatives, studies with UVA-induced binding of 8-MOP and CPZ to rat epidermal biomacromolecules *in vivo*. *Int J Radiat Biol* 1994;67:411-420.

Vargas CR, Wajner M, Sirtori LR, Goulart L, Chiochetta M, Coelho D, et al. Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim Biophys Acta* 2004;1688:26-32.

Walson PD, Groth Jr JF. Acetaminophen hepatotoxicity after a prolonged ingestion. *Pediatrics* 1993; 91:1021-1022.

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

Wozniak K, Arabski M, Malecka-Panas E, Drzewoski J, Blasiak J. DNA damage in human colonic mucosa cells induced by bleomycin and the protective action of vitamin E. *Cell Mol Biol Lett* 2004;9:31-45.

Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev* 2011;111(10):5944-5972.

Figure Captions

Fig. 1. DNA damage (comet assay) in leukocytes from heterozygotes (HTZ) (n=5) and symptomatic X-ALD patients (n=6). Data represent mean \pm SEM. ** $p < 0.01$ compared to HTZ and control group (n=8) (one-way analysis of variance - ANOVA, followed by Duncan multiple range test).

Fig. 2. *In vitro* effect of N-acetyl-L-cysteine (NAC) (1 and 2.5 mM) on DNA damage (comet assay) in leukocytes from symptomatic X-ALD patients (n=6). Data represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$ compared to control group (n=8) and # $p < 0.05$ compared to symptomatic X-ALD patients group (one-way analysis of variance - ANOVA, followed by Duncan multiple range test).

Fig. 3. *In vitro* effect of trolox (TRO) (25 and 75 μ M) on DNA damage (comet assay) in leukocytes from symptomatic X-ALD patients (n=6). Data represent mean \pm SEM. *** $p < 0.001$ compared to control group (n=8) and ### $p < 0.001$ compared to symptomatic X-ALD patients group (one-way analysis of variance - ANOVA, followed by Duncan multiple range test).

Fig. 4. *In vitro* effect of rosuvastatin (RSV) (0.5, 2 and 5 μ M) on DNA damage (comet assay) in leukocytes from symptomatic X-ALD patients (n=6). Data represent mean \pm SEM. ** $p < 0.01$ compared to control group (n=8) and ## $p < 0.01$ compared to symptomatic X-ALD patients group (one-way analysis of variance - ANOVA, followed by Duncan multiple range test).

Fig. 5. Correlation between DNA damage and urinary isoprostanes levels in symptomatic X-ALD patients (Pearson's correlation) ($r = 0.962$; $p < 0.05$).

3.2 Capítulo 2- Artigo 2: *The in vitro effect of N-acetyl-L-cysteine on glutathione and sulfhydryl levels in X-linked adrenoleukodystrophy patients*

Este artigo científico foi submetido ao periódico *Metabolic Brain Disease*

Title: The *in vitro* effect of N-acetyl-L-cysteine on glutathione and sulfhydryl levels in X-linked Adrenoleukodystrophy patients

Authors: Desirée P. Marchetti ^{a*}, Bruna Donida ^b, Marion Deon ^{b,c}, Carlos Eduardo Jacques ^b, Jéssica L. Faverzani ^c, Laura B. Jardim ^c, Carmen R. Vargas ^{a,b,c*}.

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Bioquímica, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Av. Ipiranga, 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Authors e-mails: desireepmarchetti@gmail.com, donida.bruna@gmail.com; marion_deon@yahoo.com.br, carloseduardo.jacques@hotmail.com, jelamberty@hotmail.com, ljardim@hcpa.ufrgs.br, crvargas@hcpa.ufrgs.br

***Correspondence:**

Corresponding authors 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:

crvargas@hcpa.ufrgs.br (Prof^a. Dr^a. Carmen Regla Vargas)
desireepmarchetti@gmail.com (Desirée Padilha Marchetti)

Abstract

Recent evidence shows that oxidative stress seems to be related with pathophysiology of X-linked adrenoleukodystrophy, a neurodegenerative disorder. In the present work we evaluated the *in vitro* effect of N-acetyl-L-cysteine (NAC) on glutathione (GSH) and sulfhydryl levels in X-ALD patients. It was observed a significant reduction of GSH and sulfhydryl content in X-ALD patients, compared to control group, and it was verified that 5 mM of NAC, *in vitro*, had capabilities to increase GSH content and sulfhydryl groups in these patients. Our data strongly reinforce the idea of an adjuvant therapy with the antioxidant NAC to improve oxidative imbalance presented by X-ALD patients.

Keywords

X- linked adrenoleukodystrophy; N-acetyl-L-cysteine; glutathione; sulfhydryl.

Abbreviations

C24:0: Tetracosanoic acid; C26:0: Hexacosanoic acid; CCER: Childhood cerebral form; GSH: Glutathione; GSSG: Oxidized glutathione; NAC: N-acetyl-L-cysteine; PBS: Phosphate Buffer Saline; X-ALD: X-Linked Adrenoleukodystrophy.

1. Introduction

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is a peroxisomal disorder that occurs in at least 1 out of 17,000 males (Moser et al. 2001). The phenotypic variability is remarkable, ranging from severe and rapidly progressive forms (i.e. childhood cerebral form - CCER) until slowly progressive paraparesis compatible with life (Moser et al. 2001).

The major accumulated saturated fatty acids are hexacosanoic acid (C26:0) and tetracosanoic acid (C24:0) in tissues and body fluids (Moser et al. 2001). The exact mechanisms underlying the brain damage in X-ALD are poorly elucidated. Some researchers have proposed that oxidative stress represents a hallmark in the pathogenesis of X-ALD (Berger et al. 2014; Galea et al. 2013; Vargas et al. 2004).

Glutathione (GSH) deficiency is associated with numerous pathological conditions, since the glutathione system provides the principal cellular protection against oxidative damage (Kasielski et al. 2001; Petrillo et al. 2013). Cellular redox balance is assured by equilibrated ratios among the glutathione forms, therefore, a decrease of GSH or an increase of the oxidized form (GSSG) reflects an oxidative perturbation in cell metabolism (Schaffer et al. 2001).

The antioxidant capacity of NAC has been proposed based on data from *in vitro* studies, where this compound has been shown to reduce oxidant-induced cell damage, acting as cysteine prodrug and a GSH precursor (Zafarullah et al. 2003). NAC can also reduce disulphide bonds in proteins, scavenge free radicals and bind metals to form complexes (Atkuri et al. 2007). There are several *in vitro* and *in vivo* studies involving NAC action on X-ALD treatment (Di Biase et al. 2005; Galino et al. 2011; Lopez-Erauskin et al. 2011; Tolar et al. 2007). Considering that NAC has been proposed as a GSH precursor, the purpose of this work was to analyze the *in vitro* effect of NAC on GSH and sulfhydryl levels in X-ALD patients.

2. Materials and Methods

2.1 Subjects

A total of eight X-ALD patients (4 heterozygotes, 1 Addison-only and 3 CCER) with ages varying between 9-50 years were included in this study. These patients had their diagnosis confirmed by very long chain fatty acids determination and mutation analysis. The control group consisted of eight healthy subjects with similar ages to the patients. This research was approved by the Ethics Committee of *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, RS, Brazil (number 13-0247), and all the subjects or parents gave informed written consent.

2.2 Samples collection and the in vitro assay

Venous blood was collected under sterile conditions in heparinized vials. Immediately, aliquots of whole blood cells were incubated with NAC (2.5 and 5 mM), for 6 hours at 37°C (Abt et al. 1997; Di Biase et al. 2005). After, whole blood was centrifuged at 1000 xg for 10 min and plasma was removed by aspiration, aliquoted and frozen at -80°C until sulfhydryl determination. Erythrocytes were washed three times with cold saline solution, lysated with water and frozen at -80°C until GSH analysis. NAC was diluted with phosphate buffered saline (PBS buffer) on the day of use. The proportion of blood and antioxidant solutions diluted in PBS buffer used was 1:3.

2.3 Reduced glutathione (GSH) content in erythrocytes

In order to measure GSH levels, lysates of erythrocytes were processed as described by Browne and Armstrong (1998). Results were expressed as nmol/mg protein.

2.4 Total plasmatic level of sulfhydryl groups

The plasmatic concentration of sulfhydryl groups was determined as described by Aksenov and Markesbery (2001). The sulfhydryl content is inversely correlated to oxidative damage to proteins. Results were reported as $\mu\text{mol TNB/mg protein}$.

2.5 Protein determination

Plasma and erythrocyte protein concentrations were determined, respectively, by Biuret method — using the commercial kit of Labtest® (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brazil) — and by the method of Lowry et al (1951).

2.6 Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). Comparisons between means were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan. Differences were considered statistically significant when p value was lower than 0.05. Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, USA — SPSS version 19.0) software, and graphics were constructed in GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA — version 5.0) software.

3. Results

3.1 *In vitro* effect of NAC on GSH content

Figure 1 shows GSH erythrocytes levels and the *in vitro* effect of NAC (2.5 and 5 mM) on GSH content in X-ALD patients (HTZ, CCER and Addison-only). It is important to highlight that there was no significantly difference on GSH content between the different phenotypes included in the study (data not shown). GSH concentration was significantly decreased in patients and 5mM of NAC was able to increase these levels, equaling to control values [F(3, 19)=10.41, P<0.001].

3.2 *In vitro* effect of NAC on sulfhydryl content

Figure 2 shows sulfhydryl plasma levels and the *in vitro* effect of NAC (2.5 and 5 mM) on sulfhydryl content in X-ALD patients (HTZ, CCER and Addison-only). It is important to stress that there was no significantly difference on sulfhydryl content between the different phenotypes included in the study (data not shown). Sulfhydryl content was significantly diminished in patients and 5mM of NAC was able to increase these levels until control values [F(3,18)=13.55, P<0.001].

4. Discussion

Several works have shown that oxidative stress is induced in X-ALD patients, including oxidative damage to protein, lipids, and reduction of antioxidant capacity (Deon et al. 2007, 2008a, 2008b; Petrillo et al. 2013; Vargas et al. 2004). Previous works have verified a reduction in GSH and sulfhydryl content in X-ALD patients (Petrillo et al. 2013; Rockenbach et al. 2014). Interestingly, low levels of GSH have also been reported in an animal model for X-ALD (Galino et al. 2011). In the present work we verified that X-ALD patients had lower GSH and sulphhydryl levels, compared to control group, which corroborate with literature. Besides, we showed that 5 mM of NAC, *in vitro*, was able to increase GSH content and sulfhydryl groups in these patients.

GSH plays a wide variety of physiological roles and its antioxidant effects depend on the presence of the free sulfhydryl group as a ready source of reducing equivalents to quench radical species. GSH also acts as “scavenger” of free radicals (Halliwell and Gutteridge 2007). The limiting step of the GSH synthesis involves conjugation of cysteine with L-glutamate, while L-glycine is added in a subsequent synthetic step by GSH synthase (McPherson and Hardy 2012). GSH depletion is a feature of a wide range of neuropsychiatric disorders, including Alzheimer and Parkinson diseases, and in some inborn error of metabolism (Johnson et al. 2012; Petrillo et al. 2013).

Adjuvant therapies with antioxidant have been studied in several disease-associated oxidative stress. NAC is a cysteine prodrug with an antioxidant activity attributed to its sulfhydryl group that provides protection against oxidative and metabolic processes (Atkuri et al. 2007). NAC supplies the cysteine necessary for GSH synthesis and has proven to be effective in treating disease-associated oxidative stress (Sehn 1997).

It has been shown that NAC crosses the blood-brain barrier, accumulated in the brain, and reverses memory impairment and brain oxidative stress in aged mice (Farr et al. 2003). Additionally, in some murine models of Alzheimer disease, the administration of NAC buffered oxidative damage (Tchantchou et al. 2005). In an animal model of Duchenne Muscular Dystrophy, the treatment

with NAC significantly decreased the oxidation of GSH and protein thiols, and enhanced muscle protein thiol content (Terrill et al. 2012).

In a clinical trial with Gaucher and Parkinson's patients, NAC increased whole blood GSH/GSSG ratio and GSH concentration in brain (Holmay et al. 2013). Rushworth and coworkers (2014) suggested that NAC might be useful, not only by promoting GSH depletion, but also because NAC-derived cysteine has the potential to lead to an increase in the release of glutamate from astrocytes resulting in activation of neuronal glutamate receptors.

Regarding studies involving NAC effect on X-ALD, Tolar et al (2007) reported that peri-transplant administration of NAC was protective from fulminant demyelination in advanced symptomatic X-ALD patients. It was also seen that a pre-treatment with arginine and NAC inhibited nitrite and superoxide production in glial cells enriched with C26:0 (Di Biase et al. 2005). Additionally, NAC in combination with other antioxidants reversed oxidative damage and energetic failure in an animal model for X-ALD (López-Erauskin et al. 2011).

In what concern to the underlying mechanisms by which NAC increase sulfhydryl and GSH levels, it is possible to assume that the action is, probably, due to stimulation of enzymes related to the GSH synthesis or also by non-enzymatic mechanisms related to scavenger properties of free radicals.

Finally, the present results confirm former reports showing the role of oxidative stress on X-ALD and displayed, for the first time in literature, the *in vitro* protective effect of NAC on GSH and sulfhydryl content in this disease. Therefore, this work underscores the pertinence of using antioxidants as an adjuvant therapy for X-ALD to improve oxidative imbalance presented by X-ALD patients. However, the present *in vitro* study should be interpreted with caution and more *in vivo* experiments are necessary to elucidate this issue.

Conflict of interest disclosure

All 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*. Carmen R. Vargas and Laura B. Jardim are supported by CNPq.

5. References

Abt G, Vaghef H, Gebhart E, Dahlgren CV, Hellman B (1997) The role of N acetylcysteine as a putative radioprotective agent on X-ray-induced DNA damage as evaluated by alkaline single-cell gel electrophoresis. *Mutat Res* 384:55-64.

Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302:141-145.

Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg Leonore A (2007) N-Acetylcysteine: a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr Opin Pharmacol* 7:355-359.

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

Browne RW, Armstrong D (1998) Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* 108:347-352.

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

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.

Farr SA, Poon HF, Dogrukol-Ak D et al (2003) The antioxidants alpha-lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice. *J Neurochem* 84:1173-1183.

Galea E, Launay N, Portero-Otin M et al (2012) Oxidative stress underlying axonal degeneration in adrenoleukodystrophy: A paradigm for multifactorial neurodegenerative diseases? *Biochim Biophys Acta* 1822:1475-1488.

Galino J, Ruiz M, Fourcade S et al (2011) Oxidative damage compromises energy metabolism in the axonal degeneration mouse model of X-adrenoleukodystrophy. *Antioxid Redox Signal* 15(8): 2095-2107.

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

Holmay MJ, Terpstra M, Coles LD, Mishra U, Ahlskog M, Öz G (2013) N-acetylcysteine Boosts Brain and Blood Glutathione in Gaucher and Parkinson's Diseases. *Clin Neuropharmacol* 36(4):103-106.

Johnson WM, Wilson-Delfosse AL, Mieyal JJ (2012) Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. *Nutrients* 4:1399-1440.

Kasielski M, Nowak D (2001) Long-term administration of N-acetylcysteine decreases hydrogen peroxide exhalation in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 95:448-456.

López-Erauskin J, Fourcade S, Galino J et al (2011) Antioxidants Halt Axonal Degeneration in a Mouse Model of X-Adrenoleukodystrophy. *Ann Neurol* 70:84-92.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

McPherson RA, Hardy G (2012) Cysteine: the Fun-Ke nutraceutical. *Nutrition* 2012; 28:336-337.

Moser HW, Smith KD, Watkins PA, Powers J, Moser AB (2001) X-linked adrenoleukodystrophy. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (editors)

The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill Inc, New York, pp 3257-3301.

Moser HW, Mahmood A, Raymond GV (2007) X-linked adrenoleukodystrophy. *Nat Clin Pract Neurol* 3:140-151.

Petrillo S, Piemonte F, Pastore A et al (2013) Glutathione imbalance in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol Genet Metab*, 109:366-370.

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.

Rushworth GF, Megson IL (2014) Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacology & Therapeutics* 141:150-159.

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.

Sehn CK (1997) Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *J Nutr Biochem* 8:660-672.

Terrill JR, Radley-Crabb HG, Grounds MD, Arthur PG (2012) N-Acetylcysteine treatment of dystrophic mdx mice results in protein thiol modifications and inhibition of exercise induced myofibre necrosis. *Neuromuscul Disord* 22(5):427-434.

Tchantchou F, Graves M, Rogers E, Ortiz D, Shea TB (2005) N-acetyl-cysteine alleviates oxidative damage to central nervous system of ApoE-deficient mice following folate and vitamin E-deficiency. *J Alzheimers Dis* 7:135-138.

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.

Vargas CR, Wajner M, Sirtori LR et al (2004) Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim Biophys Acta* 1688:26-32.

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

Figure 1

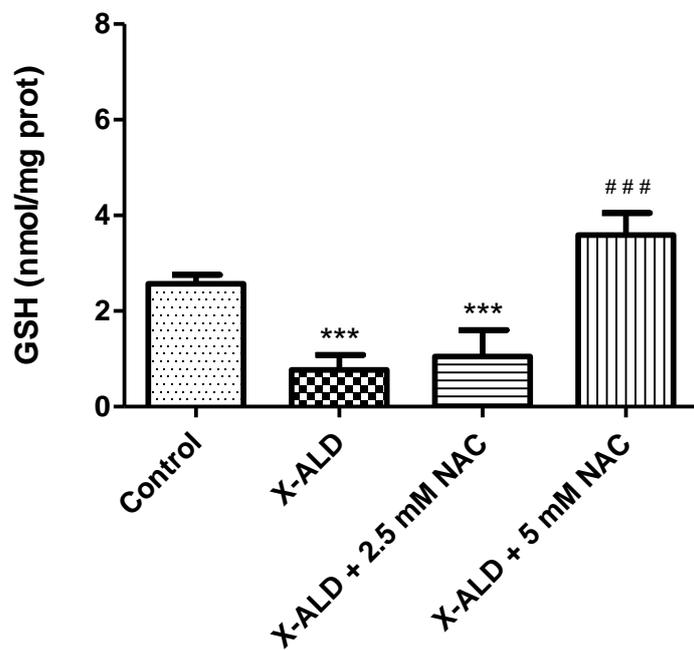


Figure 2

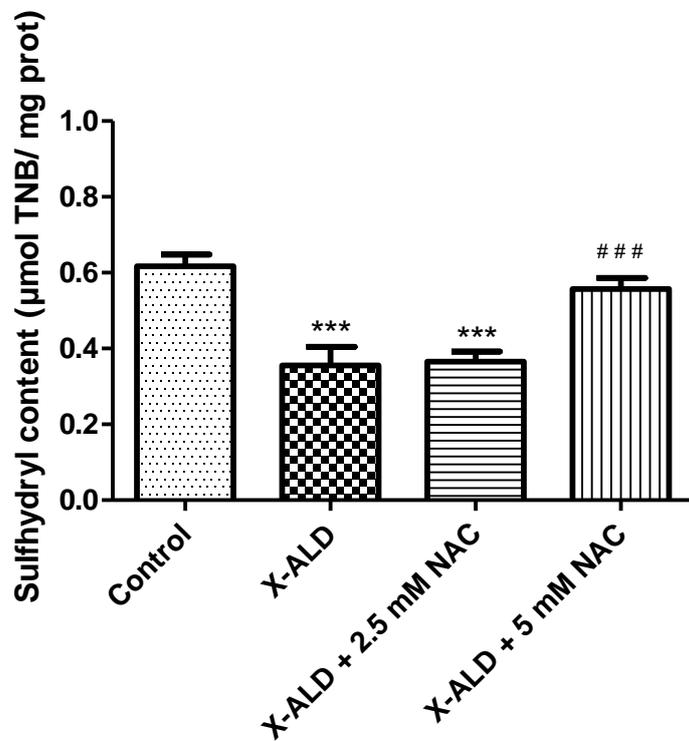


Figure captions

Fig.1. *In vitro* effect of N-acetyl-L-cysteine (NAC) (2.5 and 5 mM) on GSH levels in erythrocytes from X-ALD patients (n=4-6). Data represent the mean \pm SEM. ***p<0.001 compared to control group (n=7) and ###p<0.001 compared to X-ALD patients with NAC 2.5 mM and X-ALD patients (One-way analysis of variance - ANOVA, followed by Duncan multiple range test).

Fig.2. *In vitro* effect of N-acetyl-L-cysteine (NAC) (2.5 and 5 mM) on sulfhydryl content in plasma from X-ALD patients (n=4-6). Data represent the mean \pm SEM. ***p<0.001 compared to control group (n=7) and ###p<0.001 compared to X-ALD patients with NAC 2.5 mM and X-ALD patients (One-way analysis of variance - ANOVA, followed by Duncan multiple range test).

4. DISCUSSÃO GERAL

A X-ALD, distúrbio mais frequente dentre as doenças peroxissomais, pode se manifestar em diferentes faixas etárias e possui uma ampla variedade fenotípica. 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.

Apesar das pesquisas e dos esforços em andamento, o tratamento para X-ALD é ainda considerado experimental. O transplante de medula óssea é a terapia mais efetiva somente 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), entretanto, para pacientes AMN e HTZ ainda não há nenhum tratamento satisfatório. A maioria dos pacientes X-ALD, especialmente os fenótipos AMN e HTZ, necessitam dos cuidados de uma equipe multiprofissional que inclui fisioterapia, consulta urológica para a disfunção erétil e sistema urinário prejudicado, prevenção e tratamento de infecções urinárias, consulta endocrinológica para a detecção e tratamento da insuficiência adrenal e aconselhamento psicológico (Engelen et al., 2012; Moser et al., 2001; Moser, 2006). Terapias emergentes para X-ALD têm sido utilizadas na tentativa de atingir os três principais objetivos de um tratamento bem sucedido: estabilizar a insuficiência adrenal, diminuir a concentração de VLCFA no plasma e diminuir a desmielinização no cérebro (Moser et al., 2001).

Ultimamente, o papel do estresse oxidativo em doenças neurodegenerativas tem recebido muita atenção, visto que o cérebro é

extremamente suscetível ao ataque de espécies reativas. Este órgão 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; Valko et al., 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 (Halliwell e Gutteridge, 2007; Valko et al., 2007; Zheng e Storz, 2000). Adicionalmente, o NO^{*} possui papel crucial na vasorregulação, na adesão leucocitária, na agregação plaquetária, na angiogênese e na neurotransmissão (Halliwell e Gutteridge, 2007; Tarpey e Fridovich, 2001).

Em contrapartida, a superprodução de radicais livres é deletéria para os organismos vivos, podendo lesar biomoléculas, como lipídios, proteínas e o

DNA. O H_2O_2 e o $\text{O}_2^{\cdot-}$, por exemplo, podem causar dano ao DNA, através da interação com metais de transição, como ferro e cobre, na reação Haber-Weiss, produzindo o OH^{\cdot} . Este radical é considerado o mais danoso, e pode produzir mais de vinte diferentes produtos quando ataca as bases do DNA, formando, por exemplo: 8-hidroxiadenina, 8-hidroxi guanina, 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimina, e lesões com abertura de anel (4,6-diamino-5-formamidopirimidina e 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina) (Cooke et al., 2006). Outro potente oxidante capaz de lesar o DNA é o ONOO^{\cdot} , produto do acoplamento do NO^{\cdot} e $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Marnett, 2000).

A superprodução de espécies reativas também pode causar danos no DNA mitocondrial (mtDNA), o qual é mais sensível ao ataque de espécies reativas comparado ao DNA nuclear, visto que está mais próximo da formação de EROs decorrente da cadeia transportadora de elétrons e também porque não possui histonas protetoras (Halliwell e Gutteridge, 2007; Pamplona et al., 2007). Modificações oxidativas tanto no mtDNA quanto em proteínas podem resultar em uma falha metabólica caracterizada por um aumento da taxa NAD^+/NADH . Esta razão possui um papel regulatório em vias metabólicas fundamentais, incluindo glicólise, ciclo de Krebs, fosforilação oxidativa e tem potencial para reduzir os níveis de ATP (Ying et al., 2008).

Para que o conteúdo informacional do DNA seja preservado e corretamente transmitido é indispensável que haja fidelidade na replicação e que existam mecanismos capazes de reparar modificações estruturais produzidas no material genético por produtos tóxicos, visto que, no ambiente celular, o DNA está constantemente exposto a estes agentes nocivos. Os mecanismos de reparação do DNA são, em geral, dependentes dos produtos

de diversos genes e se caracterizam por possuírem várias etapas, possibilitando vias alternativas, muitas vezes coexistentes e competitivas. Alguns tipos de lesões podem ser revertidos diretamente, mediante a ação de uma única enzima, que desfaz a lesão produzida, restaurando a integridade da molécula de DNA. Entretanto, caso ocorra uma falha nos mecanismos celulares de reparo, sérias consequências poderão ocorrer, incluindo indução de mutações, perda de heterozigose, aberrações cromossômicas, alteração da expressão gênica, citotoxicidade, neoplasias e até morte celular (Cooke et al., 2006; Moraes et al., 2012).

Diversos parâmetros de estresse oxidativo já foram descritos em pacientes portadores de X-ALD, como por exemplo, dano a lipídios, proteínas e redução da capacidade antioxidante tecidual (Deon et al., 2007; Deon et al., 2008a; Deon et al., 2008b; Vargas et al., 2004), entretanto, danos no DNA ainda não foram reportadas. Por isto, neste trabalho, nós avaliamos o dano ao DNA em mulheres heterozigotas e pacientes sintomáticos para X-ALD, através do ensaio cometa, que é um método sensível para detecção de dano, econômico e rápido. Após, nós verificamos o efeito, *in vitro*, de NAC, TRO e RSV sobre o dano ao DNA em pacientes sintomáticos, uma vez que estes compostos vêm sendo estudados como potenciais antioxidantes em diversas patologias.

De acordo com nossos resultados, as HTZ não apresentaram dano ao DNA. Em outros trabalhos já foram observados parâmetros de estresse oxidativo alterados neste fenótipo, como o aumento da formação de TBA-RS, o qual é um marcador indireto de peroxidação lipídica e a diminuição de TAR (Deon et al., 2008b). Dessa forma, podemos assumir que as HTZ apresentam

um desequilíbrio oxidativo em nível de lipídios, mas não em nível de DNA. Por outro lado, nossos resultados mostraram índices aumentados de dano ao DNA em pacientes sintomáticos, quando comparados às HTZ e ao grupo controle. Estes achados estão de acordo com a literatura no que se refere ao dano a biomoléculas, uma vez que trabalhos anteriores já descreveram dano oxidativo a lipídios, pelo aumento de TBA-RS e quimioluminescência, proteínas, pelo aumento de carbonilas e diminuição de sulfidrilas e redução de TAR e TAS, os quais representam a quantidade e qualidade, respectivamente, dos antioxidantes teciduais (Deon et al., 2007; Petrillo et al., 2013; Vargas et al., 2004).

Ainda, com o propósito de verificar se diferentes compostos poderiam ser capazes de reduzir o dano ao DNA apresentado pelos pacientes sintomáticos, nós realizamos o ensaio cometa *in vitro*, utilizando NAC, TRO e RSV em diferentes concentrações. Primeiramente, o sangue total destes pacientes foi incubado com NAC nas concentrações de 1 e 2,5 mM, por 6 horas a 37°C, e após o dano ao DNA foi avaliado pelo ensaio cometa. Nós observamos que as duas concentrações de NAC foram hábeis em reduzir o dano ao DNA em pacientes sintomáticos, igualando a níveis de controle.

A NAC é um agente com propriedades antioxidantes, 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. Além disso, trabalhos hipotetizam que este composto possui potenciais capacidades neuroprotetoras (Ferrari et al., 1995; Harvey et al., 2008; Henderson et al., 1996). Muitas décadas de estudos de toxicidade estabeleceram que a administração da NAC é segura, mesmo em usos a

longo-prazo (Walson e Groth, 1993). Neste contexto, Tolar e col. (2007) mostraram que NAC, quando administrada antes e após o transplante de medula óssea, foi capaz de estabilizar os estados neurológicos e achados radiográficos cerebrais de três meninos com a forma cerebral da X-ALD em estágio avançado. Eles concluíram que a NAC merece maior investigação como estratégia terapêutica para pacientes com o fenótipo avançado, pois tem potencial de mudar a condição de doença letal para uma condição que pode ser corrigida através do transplante de medula óssea. Administrada oralmente, a NAC é rapidamente absorvida e a cisteína atinge o pico plasmático dentro de 120 minutos (Borgstrom et al., 1986; Borgstrom e Kageda, 1990; Olsson et al., 1988). A NAC atravessa a BHE (Farr et al., 2003) e, no cérebro, a cisteína pode ser usada como precursora da GSH. Estudos em modelos animais têm verificado que a administração sistêmica da NAC protege o cérebro contra a depleção da GSH (Aydin et al., 2002; Ercal et al., 1996; Fu et al., 2006; Kamboj et al., 2006).

Existem diversos estudos reportando os efeitos antimutagênicos, anticlastogênicos e anticarcinogênicos da NAC após vários tipos de exposição a produtos químicos em diferentes sistemas experimentais (De Flora et al., 1995; van Zandwijk et al., 1995; Waters et al., 1996). Abt e col. (1997) verificaram que a NAC pareceu ter um papel como agente radioprotetor contra o dano ao DNA induzido por raio-X em linfócitos humanos. Adicionalmente, experimentos demonstraram um efeito protetor da NAC contra efeitos danosos da radiação UV-B sobre o DNA epidérmico (Van den Broeke and Beijersbergen van Henegouwen, 1994) e contra o dano ao DNA induzido pela radiação ionizante (raio- γ) em células de levedura (Reliene et al., 2009).

No que concerne a modelos *in vitro* para X-ALD, já foi reportado que um pré-tratamento com arginina e NAC inibiu não somente a produção de nitrito, mas também a produção de superóxido, em células gliais enriquecidas com C26:0 (Di Biase et al., 2005). No mesmo contexto, Lopez-Erauskin et al (2012) forneceram evidências que o estresse oxidativo levou ao dano mitocondrial, através da dissipação do potencial da membrana interna mitocondrial e morte celular necrótica, juntamente com modificações oxidativas na proteína ciclofilina D em fibroblastos de pacientes X-ALD. Dentre as proteínas constituintes dos poros de transição de permeabilidade, a ciclofilina D é a mais estudada e se encontra aumentada em situações patológicas. O tratamento *in vitro* com a NAC restaurou os marcadores de dano mitocondrial encontrados nos fibroblastos dos pacientes X-ALD, incluindo as modificações oxidativas na ciclofilina D.

Além disso, trolox, NAC ou ácido lipóico, 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 (Lopez-Erauskin et al. 2011). Galino e col. (2011), utilizando também um modelo animal nocaute verificaram que a NAC e o ácido lipóico 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.

Resultados demonstrando que a terapia antioxidante melhora ou previne a degeneração axonal, levaram a um ensaio clínico de fase II com um coquetel de antioxidantes (NCT01495260) em pacientes AMN (Galea et al., 2012;

Fourcade et al., 2014). A eficácia deste teste clínico será monitorada por uma avaliação longitudinal de lesões oxidativas em células sanguíneas e de sintomas clínicos (Galea et al., 2012).

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). Dados na literatura demonstram que o TRO apresentou efeito protetor contra o dano ao DNA induzido por H₂O₂ em um ensaio cometa modificado, realizado em células bucais (Szeto et al., 2005). Já foi reportado, também, que a vitamina E exerceu uma ação protetora contra o dano ao DNA induzido por bleomicina (medicamento antineoplásico) em células humanas da mucosa colônica (Wozniak et al., 2004), e induzido por ciprofloxacina (antibiótico quinolona) em cultura primária de astrócitos de ratos (Gürbay et al., 2006).

Trabalhos vêm sugerindo que o C26:0 exerce efeitos tóxicos em cultura de células, principalmente por aumentar a microviscosidade das membranas com conseqüente prejuízo funcional nas células adrenocorticais (Whitcomb et al., 1988). Um estudo *in vitro* utilizando fibroblastos humanos cultivados enriquecidos com altas doses de C26:0 e TRO demonstrou que este antioxidante preveniu a indução da enzima SOD frente ao tratamento com C26:0. Adicionalmente, em fibroblastos de pacientes X-ALD, TRO foi capaz de corrigir proteínas carboniladas, diminuindo os níveis de SAAA e SAG e reverter

a glicoxidação e peroxidação lipídica, reduzindo o CML, CEL e MDAL (Fourcade et al., 2008).

Considerando o mecanismo de ação do TRO, nós hipotetizamos que ele poderia ser capaz de reduzir o dano ao DNA em pacientes X-ALD sintomáticos. Para este propósito, o sangue total destes pacientes foi incubado com duas concentrações de TRO (25 e 75 μM) após, realizou-se o ensaio cometa. Nossos resultados mostraram que as duas concentrações do composto foram hábeis em reduzir o dano ao DNA dos pacientes sintomáticos, equiparando a níveis de controle.

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). Neste trabalho, o ensaio cometa *in vitro* também foi realizado com RSV em três concentrações (0.5, 2 e 5 μM), e assim como observamos para NAC e TRO, todas as concentrações de RSV foram capazes de reduzir, a níveis de controle, o dano ao DNA apresentado pelos pacientes sintomáticos.

Corroborando com nossos achados, um estudo *in vitro* utilizando cultura de células HL-60 (células humanas da linhagem promielocítica) verificou, através do ensaio cometa, que a RSV reduziu o dano ao DNA induzido por forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) e por H_2O_2 , e também preveniu a formação de EROs provocada pelo PMA. Ainda neste estudo, foi observado que o conteúdo total de GSH aumentou significativamente em células incubadas com RSV, assim como foi verificado um aumento da expressão gênica de enzimas relacionadas à síntese da GSH, através da quantificação do mRNA de glutamilsteína sintetase, glutatona sintetase, GPx e glutatona

redutase. Dessa forma, os autores concluíram que a RSV possui efeitos antioxidantes, habilidades para prevenir o dano ao DNA e o mecanismo pelo qual ela exerce estas ações parece estar relacionado à indução de expressão de enzimas de defesa antioxidante (Schupp et al., 2008).

Ainda neste contexto, Ajith e col. (2008) 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. Sua atividade antiperoxidativa poderia ser devida, provavelmente, à capacidade de sequestro de radicais peróxil. Considerando que o H_2O_2 causa dano ao DNA, Ajith e col. (2008) observaram, também, que a RSV foi capaz de proteger o DNA plasmidial pBR322 contra os efeitos nocivos do H_2O_2 e proteger, parcialmente, a fragmentação do DNA hepático induzido pela reação de Fenton. Os autores sugerem que, devido às atividades pleiotrópicas desta estatina, ela pode ser amplamente utilizada na clínica para amenizar o estresse oxidativo induzido em doenças humanas.

Adicionalmente, pesquisas vêm demonstrando os efeitos antitrombóticos e anti-inflamatórios da RSV (Athyros 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). Gomez-García et al (2007) mostraram os efeitos anti-inflamatórios da RSV através da diminuição dos marcadores pró-inflamatórios, IL6 e TNF α . Também já foi visto que a RSV atenua o estresse oxidativo pela supressão da enzima NADPH oxidase e aumento da expressão da SOD (Verreth et al., 2007). Resch et al (2006) verificaram que a RSV diminuiu os níveis alterados

de biomarcadores de estresse oxidativo acompanhados da redução do colesterol.

A eNOS é uma enzima capaz de manter o equilíbrio redox entre as espécies reativas de nitrogênio e as de oxigênio. Piconi et al (2008) verificaram que a RSV foi capaz de restaurar a eNOS, assim como aumentar a produção de NO[•] e diminuir a produção de O₂^{•-}. Outras estatinas (lovastatina e sinvastatina) já foram testadas como drogas terapêuticas capazes de normalizar os níveis de VLCFA no plasma e fibroblastos de pele de pacientes X-ALD (Singh et al., 1998; Pai et al., 2000). Postulou-se, portanto, que as estatinas são uma estratégia terapêutica promissora no tratamento da X-ALD, não só por diminuir os níveis de VLCFA, mas também por inibir o processo neuroinflamatório nestes pacientes (Khan et al., 2008).

Lipídios são componentes essenciais das membranas que mantêm a estrutura e o controle das funções celulares. Eles são alvos primários do ataque de EROs, e a sua oxidação está associada a numerosas patologias. A peroxidação lipídica é um processo complexo, que se dá através de uma reação em cadeia, e compreende três distintos mecanismos: oxidação mediada por radical livre, oxidação não-enzimática e oxidação enzimática (Niki et al., 2005; Shichiri, 2014). O primeiro mecanismo pode ser dividido em reações de iniciação, onde um RL é formado a partir de um composto estável não-radicalar; reações de propagação, onde um RL reage com uma molécula estável, formando um outro RL e reações de terminação, onde dois RLs reagem entre si e formam um produto estável (Halliwell e Gutteridge, 2007). A oxidação lipídica por mecanismos não-enzimáticos pode ser acompanhada pelo oxigênio singlet e o ozônio. O terceiro mecanismo de oxidação, a oxidação

enzimática, é ilustrada pela ação das enzimas lipooxigenase e ciclooxigenase, as quais podem oxidar o ácido araquidônico (Shichiri, 2014). A peroxidação lipídica é um processo que leva a modificações nas estruturas das membranas, como alterações de permeabilidade, fluidez, integridade, podendo causar danos em lipoproteínas, proteínas e o DNA (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Muitos estudos anteriores já descreveram o envolvimento da peroxidação lipídica em X-ALD (Deon et al., 2007; Deon et al., 2008b; Vargas et al., 2004). Isoprostanos são produtos derivados da peroxidação não enzimática do ácido araquidônico e são considerados biomarcadores confiáveis de estresse oxidativo nos seres humanos (Halliwell e Gutteridge, 2007). Nossos resultados mostraram uma correlação positiva entre o dano ao DNA e os níveis de isoprostanos urinários nos pacientes sintomáticos, indicando que o dano ao DNA, provavelmente, possa estar sendo causado pela peroxidação lipídica, nestes pacientes. Estes achados estão de acordo com a literatura, pois se sabe que o MDA, outro parâmetro de peroxidação lipídica, pode atacar o DNA e formar adutos de deoxiguanosina e deoxiadenina (Marnett, 1999).

No que concerne aos mecanismos pelos quais NAC, TRO e RSV reduzem o dano ao DNA nos pacientes X-ALD sintomáticos, é possível assumir que NAC, TRO e RSV (três compostos com propriedades antioxidantes bem estabelecidas) podem diminuir o dano ao DNA pela redução das espécies reativas formadas. Trabalhos anteriores realizados por nosso grupo e por outros nos permitem reforçar esta hipótese, uma vez que já foi verificado dano oxidativo a lipídios e proteínas pelo ataque de radicais livres, em pacientes X-ALD (Deon et al., 2007; Deon et al., 2008b; Petrillo et al., 2013; Vargas et al., 2004).

Este trabalho também avaliou os níveis plasmáticos de sulfidril e conteúdo de glutatona em eritrócitos de pacientes portadores de X-ALD (formas clínicas: HTZ, cALD e Addison-only), os quais encontravam-se significativamente diminuídos quando comparados ao grupo controle. Cabe salientar que entre as formas clínicas estudadas não houve diferença significativa no que se refere à GSH e sulfidril. Ainda, investigou-se o efeito *in vitro* da NAC sobre estes parâmetros de estresse oxidativo. Considerando que no ensaio cometa *in vitro* com NAC não foi observado um efeito dose-dependente utilizando as concentrações de 1 e 2,5 mM do composto, para o ensaio da GSH e sulfidril buscou-se avaliar o efeito de uma concentração maior da NAC (5 mM). Pela primeira vez na literatura, nós observamos um efeito protetor *in vitro* de 5 mM de NAC em aumentar os níveis de GSH e sulfidril dos pacientes X-ALD a níveis de controles saudáveis. Estudos prévios já reportaram diminuição dos grupos sulfidril e do conteúdo de GSH em pacientes X-ALD (Petrillo et al., 2013; Rockenbach et al., 2014), assim como níveis diminuídos de GSH na medula espinhal de ratos nocaute para ABCD1 (Galino et al., 2011).

A GSH é um tripeptídeo que contém cisteína e é a principal defesa celular contra o dano oxidativo. O equilíbrio redox é assegurado pelas proporções entre suas formas reduzida e oxidada, portanto, uma diminuição da GSH ou um aumento da GSSG reflete uma perturbação oxidativa no ambiente celular (Schafer et al., 2001). Os efeitos antioxidantes de GSH dependem da presença do grupo sulfidril livre como uma fonte de equivalentes redutores para extinguir os radicais livres. A GSH também atua como sequestradora de espécies reativas (Halliwell e Gutteridge, 2007). O passo limitante da síntese

de GSH envolve a conjugação de cisteína com L-glutamato, enquanto que a L-glicina é adicionada num passo subsequente, pela GSH sintase (McPherson e Hardy, 2012). A depleção da GSH ocorre em uma ampla variedade de distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo doença de Alzheimer, de Parkinson, e em alguns EIM, como fenilcetonúria e adrenoleucodistrofia ligada ao X (Johnson et al., 2012; Petrillo et al., 2013; Sitta et al., 2009c).

A NAC atravessa a BHE e, no cérebro, a cisteína pode ser usada como precursora da GSH (Farr et al., 2003). Em um ensaio clínico com pacientes portadores de Gaucher e de Parkinson, a NAC foi capaz de aumentar a relação GSH/GSSG e a concentração de GSH no cérebro (Holmay et al., 2013). Rushworth e colaboradores (2014) sugeriram que a NAC poderia ser útil como uma terapia antioxidante não só pela sua capacidade de regenerar a GSH, mas também porque a cisteína derivada da NAC poderia provocar um aumento na liberação de glutamato dos astrócitos, culminando na ativação de receptores neuronais de glutamato.

Estudos em modelos animais têm verificado que a administração sistêmica da NAC protege o cérebro contra a depleção da GSH (Aydin et al., 2002; Ercal et al., 1996; Fu et al., 2006; Kamboj et al., 2006). Terrill et al. (2012) verificaram, em um modelo animal da distrofia muscular de Duchenne, que o tratamento com NAC reduziu significativamente a oxidação de GSH e tióis proteicos, e aumentou o teor de tióis das proteínas musculares.

Aproximadamente dois terços dos grupos sulfidrilas estão ligados às proteínas, enquanto que um terço é composto de pequenas moléculas como a GSH (Requejo et al., 2010). Uma vez ligado à proteína, os grupos sulfidrilas podem ser reversivelmente oxidados por espécies reativas e, por isso, tem sido

sugerido que estes grupos representem um pool antioxidante com potencial redox ativo na defesa celular contra o estresse oxidativo. Então, a redução no conteúdo de sulfidrilas em pacientes portadores de X-ALD pode refletir oxidação de proteínas, ou diminuição das defesas antioxidantes.

No que concerne aos mecanismos pelos quais a NAC aumenta o conteúdo de GSH e de grupamentos sulfidrila, é possível assumir que sua ação antioxidante é, provavelmente, devido à estimulação de enzimas relacionadas à síntese de GSH ou devido também a mecanismos não-enzimáticos relacionados ao sequestro de espécies reativas. Estas últimas poderiam alterar o status redox celular e levar à inativação protéica.

Em suma, nossos resultados mostram, pela primeira vez na literatura, que os pacientes X-ALD sintomáticos possuem dano ao DNA; este dano parece ter origem, provavelmente, oxidativa e pode ter sido causado por peroxidação lipídica. Além disso, NAC, TRO e RSV exerceram ações protetoras *in vitro*, reduzindo o dano ao DNA destes pacientes a níveis de controle. Nossos dados demonstram também a capacidade da NAC em aumentar os níveis de GSH e sulfidrila em pacientes X-ALD, independentemente do fenótipo. Estes resultados são de grande relevância em um tratamento adjuvante para X-ALD, visto que ainda não há nenhuma terapia satisfatória para este erro inato do metabolismo. Não obstante, os resultados *in vitro* e *in vivo* do presente trabalho devem ser interpretados com cautela e mais experimentos são necessários para elucidar este tema.

5. CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos nesta dissertação de mestrado, foi possível concluir que:

- 1) As mulheres heterozigotas para X-ALD não apresentam dano ao DNA em leucócitos;
- 2) Os pacientes X-ALD sintomáticos apresentam dano ao DNA em leucócitos;
- 3) A incubação *in vitro* com NAC (1 e 2,5 mM) foi capaz de reverter, a níveis de controle, o dano ao DNA em leucócitos de pacientes sintomáticos;
- 4) A incubação *in vitro* com TRO (25 e 75 μ M) foi capaz de reverter, a níveis de controle, o dano ao DNA em leucócitos de pacientes sintomáticos;
- 5) A incubação *in vitro* com RSV (0,5; 2 e 5 μ M) foi capaz de reverter, a níveis de controle, o dano ao DNA apresentado pelos pacientes sintomáticos;
- 6) Há correlação significativa positiva entre o dano ao DNA em leucócitos e o nível de isoprostanos urinários em pacientes sintomáticos, indicando que a origem deste dano é, provavelmente, oxidativa;
- 7) Os pacientes X-ALD (independentemente do fenótipo) possuem níveis diminuídos de GSH e sulfidrilas;

8) A incubação *in vitro* com NAC (5 mM) foi capaz de aumentar os níveis de GSH em eritrócitos e sulfidrilas plasmáticas nos pacientes X-ALD (independentemente do fenótipo).

Portanto, o presente trabalho permite concluir que há dano ao DNA, diminuição de GSH e de grupamentos sulfidrilas em pacientes X-ALD, que os antioxidantes NAC, TRO e RSV possuem capacidade, *in vitro*, para reverter o dano ao DNA, e que a NAC, *in vitro*, também tem a capacidade de aumentar os níveis de GSH e sulfidrilas nestes pacientes.

6. PERSPECTIVAS

- Analisar o dano ao DNA entre os diferentes fenótipos sintomáticos e assintomáticos para X-ALD;
- Confirmar a origem oxidativa do dano, utilizando enzimas de reparo específicas de lesão e analisando os níveis de 8-hidroxi-2'deoxiguanosina (padrão ouro) em sangue e urina dos pacientes;
- Determinar a presença de micronúcleos na mucosa oral dos pacientes, o qual é um teste é muito sensível para medir o dano citogenético;
- Avaliar o reparo celular através da indução de dano ao DNA com peróxido de hidrogênio;
- Verificar se outros antioxidantes, como por exemplo, Ácido Lipóico e Vitamina C, são capazes de reduzir o dano ao DNA nos pacientes;
- Testar o efeito *in vivo* dos antioxidantes em modelo animal;
- Testar o efeito *in vivo* da administração oral de antioxidantes em pacientes com diferentes fenótipos para X-ALD;
- Testar o efeito *in vitro* dos antioxidantes em células gliais enriquecidas com C26:0.

7. REFERÊNCIAS

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.

Abt G, Vaghef H, Gebhart E, Dahlgren CV, Hellman B (1997). The role of N acetylcysteine as a putative radioprotective agent on X-ray-induced DNA damage as evaluated by alkaline single-cell gel electrophoresis. *Mutat Res*, 384:55-64.

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.

Aydin S, Ozaras R, Uzun H et al (2002). N acetylcysteine reduced the effect of ethanol on antioxidant system in rat plasma and brain tissue. *Tohoku J Exp Med*, 198:71-77.

Barschak AG, Sitta A, Deon M, de Oliveira MH, Haeser A, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR (2006). Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis*, 21:279-286.

Berger J, Gärtner J (2006). X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, biochemical and pathogenetics aspects. *Biochim Biophys Acta*, 1763:1721-1732.

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

Blau N, Hoffmann GF, Leonard J, Clarke JTR. *Physician's guide to treatment and follow up of metabolic diseases*. Berlin: Springer-Verlag, 2006.

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

Borgstrom L, Kagedal B, Paulsen O (1986). Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. *Eur J Clin Pharmacol*, 31:217-222.

Borgstrom L, Kagedal B (1990). Dose dependent pharmacokinetics of N-acetylcysteine after oral dosing to man. *Biopharm Drug Dispos*, 11:131-136.

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 Abeta(1-42) in synaptosomes: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res*, 1044:206-215.

Brose RD, Avramopoulos D, Smith KD (2012). SOD2 as a potential modifier of X-linked adrenoleukodystrophy clinical phenotypes. *J. Neurol*, 259:1440-1447.

Browne RW, Armstrong D (1998). Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol*, 108:347-352.

Carakushansky G. (Ed) *Doenças genéticas em pediatria*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001.

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.

De Flora S, Cesarone CF, Balansky RM, Albini A, D'Agostini F, Bennicelli C, Bagnasco M, Camoirano A, Scatolini L, Roviada A, Izzotti A (1995). Chemopreventive properties and mechanisms of N-acetylcysteine. The experimental back-ground. *J Cell Biochem*, 22:33-41.

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 (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 DM, Terroso T, Schmitt GO, Wanderley HYC, Jardim LB, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR (2008b). Oxidative stress is induced in female carriers of X-linked adrenoleukodystrophy. *J Neurol Sci*, 266:79-83.

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.

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.

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.

Ercal N, Treeratphan P, Hammond TC, Matthews RH, Grannemann NH, Spitz DR (1996). *In vivo* indices of oxidative stress in lead-exposed C57BL/6 mice are reduced by treatment with meso-2,3-dimercaptosuccinic acid or N-acetylcysteine. *Free Radic Biol Med*, 21:157-161.

Farr SA, Poon HF, Dogrukol-Ak D, Drake J, Banks WA, Eyerman E, Butterfield DA, Morley JE (2003). The antioxidants alpha-lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice. *J Neurochem*, 84:1173-1183.

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

Filippon L, Wayhs CAY, Atik DM, Manfredini V, Herberb S, Carvalho, Schwartz IVD, Giugliani R, Vargas CR (2011). DNA damage in leukocytes from pretreatment mucopolysaccharidosis type II patients; protective effect of enzyme replacement therapy. *Mut Res*, 721:206-210.

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, López-Erauskin J, Ruiz M, Ferrer I, Pujol A (2014). Mitochondrial dysfunction and oxidative damage cooperatively fuel axonal degeneration in X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochimie*, 98:143-149.

Fu AL, Dong ZH, Sun MJ (2006). Protective effect of N-acetyl-l-cysteine on amyloid [beta]-peptide-induced learning and memory deficits in mice. *Brain Res*, 1109:201-206.

Galea E, Launay N, Portero-Otin M, Ruiz M, Pamplona R, Aubourg P, Ferrer I, Pujol A (2012). Oxidative stress underlying axonal degeneration in adrenoleukodystrophy: A paradigm for multifactorial neurodegenerative diseases? *Biochim Biophys Acta*, 1822:1475-1488.

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.

Gilg AG, Singh AK and Singh I (2000). Inducible Nitric Oxide Synthase in the Central Nervous System of Patients with X-Adrenoleukodystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59(12):1063-1069.

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

Gómez-García A, Martínez Torres G, Ortega-Pierres LE, Rodríguez-Ayala E, Alvarez-Aguilar C (2007). Rosuvastatin and metformin decrease inflammation and oxidative stress in patients with hypertension and dyslipidemia. *Rev Esp Cardiol*, 60:1242-1249.

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 N-acetyl 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 motor neuron degeneration in wobbler mice by N-acetyl-L-cysteine. *J Neurosci*, 16:7574-7582.

Holmay MJ, Terpstra M, Coles LD, Mishra U, Ahlskog M, Öz G (2013). N-acetylcysteine Boosts Brain and Blood Glutathione in Gaucher and Parkinson's Diseases. *Clin Neuropharmacol*, 36(4):103-106.

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

Johnson WM, Wilson-Delfosse AL, Mielay JJ (2012). Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. *Nutrients*, 4:1399-1440

Kamboj A, Kiran R, Sandhir R (2006). Carbofuran-induced neurochemical and neurobehavioral alterations in rats: attenuation by N-acetylcysteine. *Exp Brain Res*, 170:567-575.

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.

Khan M, Singh J, Singh I (2008). Plasmalogen deficiency in cerebral adrenoleukodystrophy and its modulation by lovastatin *J Neurochem*, 106(4):1766-1779.

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.

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):3584-3598.

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.

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.

Marnett LJ (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res*, 424:83-95.

Marnett LJ (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21:361-70.

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

McGuinness MC, Powers JM, Bias WB, Schmeckpeper BJ, Segal AH, Gowda VC, Wesselingh SL, Berger J, Griffin DE, Smith KD (1997). Human leukocyte antigens and cytokine expression in cerebral inflammatory demyelinating lesions of X-linked adrenoleukodystrophy and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 75:174-182.

McPherson RA, Hardy G. Cysteine: the Fun-Ke nutraceutical (2012). *Nutrition*, 28:336-337.

Moller P, Loft S, Alfthan G, Freese R (2004). Oxidative DNA damage in circulating mononuclear blood cells after ingestion of blackcurrant juice or anthocyanin-rich drink. *Mutat Res*, 551:119-126.

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 (1997). Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain*, 120:1485-1508.

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.

Negretto GW, Deon M, Burin M, , Biancini GB, Ribas G, Garcia SC, Goethel G, Fracasso R, Giugliani L, Giugliani R, Vargas CR (2014). In vitro effect of genistein on DNA damage in leukocytes from mucopolysaccharidosis IVA patients. *Mol Genet Metab*, 111:205-208.

Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N (2005). Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *BBRC*, 338(1):668-676.

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

Olsson B, Johansson M, Gabrielsson J, Bolme P (1988). Pharmacokinetics and bioavailability of reduced and oxidized N-acetylcysteine. *Eur J Clin Pharmacol*, 34:77-82.

Pai GS, Khan M, Barbosa E, Key LL, Craver JR, Curé JK, Betros R, Singh I (2000). Lovastatin therapy for X-linked adrenoleukodystrophy: clinical and biochemical observations on 12 patients. *Mol Genet Metab*, 69:312-322.

Pamplona R, Barja G (2007). Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: two key traits of longevity. *Ageing Res Rev*, 6:189–210.

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.

Piconi L, Corgnali M, Da Ros R, Assaloni R, Piliago T, Ceriello A (2008). The protective effect of rosuvastatin in human umbilical endothelial cells exposed to constant or intermittent high glucose. *J Diab Complic*, 22:38-45.

Pool-Zobel BL, Bub A, Müller H, Wollowski I, Rechkemmer G (1997). Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis*, 18(9):1847-1850.

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, Pei Z, Keinzer AK, Deering R, Moser AB, Moser HW, Watkins PA, Smith KD (2005). Adrenoleukodystrophy: 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 peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:11173-11177.

Ravanat JL, Sauvaigo S, Caillat S, Martinez GR, Medeiros MH, Di Mascio P, Favier A, Cadet J (2004). Singlet oxygen-mediated damage to cellular DNA determined by the comet assay associated with DNA repair enzymes. *Biol Chem*, 385:17-20.

Reliene R, Pollard JM, Sobol Z, Trouiller B, Gatti RA, Schiestl RH (2009). N-acetyl cysteine protects against ionizing radiation-induced DNA damage but not against cell killing in yeast and mammals. *Mutat Res*, 665:37-43.

Requejo R, Hurd TR, Costa NJ, Murphy MP (2010). Cystein residues exposed on protein surfaces are dominant intramitochondrial thiol and may protect against oxidative damage. *FEBS J*, 277:1465-1480.

Resch U, Tatzber F, Budinsky A, Sinzinger H (2006). Reduction of oxidative stress and modulation of autoantibodies against modified low-density lipoprotein after rosuvastatin therapy. *Br J Clin Pharmacol*, 61:262-74.

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.

Rushworth GF, Megson IL (2014). Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol Ther*, 141:150-159.

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^a 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^a ed. New York: Mc Graw-Hill. 2001.

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

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988). A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. *Exp Cell Res*, 175:184-191.

Singh I, Pahan K, Khan M (1998). Lovastatin and sodium phenylacetate normalize the levels of very long chain fatty acids in skin fibroblasts of X-adrenoleukodystrophy. *FEBS Lett*, 426:342-346.

Sitta A, Barschak AG, Deon M, de Mari JF, Barden AT, Vanzin CS, Biancini GB, Schwartz IV, Wajner M, Vargas CR (2009a). L-carnitine blood levels and oxidative stress in treated phenylketonuric patients. *Cell Mol Neurobiol*, 29(2):211-8.

Sitta A, Manfredinic V, Biasi L, Treméa R, Schwartz IV, Wajner M, Vargas CR (2009b). Evidence that DNA damage is associated to phenylalanine blood levels in leukocytes from phenylketonuric patients. *Mutat Res*, 679:13-16.

Sitta A, Barschak AG, Deon M, Barden AT, Biancini GB, Vargas PR, de Souza CF, Netto C, Wajner M, Vargas CR (2009c). Effect of short- and long-term

exposition to high phenylalanine blood levels on oxidative damage in phenylketonuric patients. *Int J Devl Neurosci*, 27:243-247.

Shichiri M (2014). The role of lipid peroxidation in neurological disorders. *J Clin Biochem Nutr*, 54(3):151-60.

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

Tarpey MM, Fridovich I (2001). Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res*, 89(3):224-36.

Terrill JR, Radley-Crabb HG, Grounds MD, Arthur PG (2012). N-Acetylcysteine treatment of dystrophic mdx mice results in protein thiol modifications and inhibition of exercise induced myofibre necrosis. *Neuromuscul Disord*, 22(5):427-434.

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.

Triantafyllou P, Economou M, Vlachaki E, Aggelaki M, Athanassiou-Mataxa M, Michelakaki E, Zafeiriou DI (2014). Multiple endocrine disorders associated with adrenomyeloneuropathy and a novel mutation of the ABCD1 gene. *Pediatr Neurol*, 50(6):622-624.

Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin M, Mazura M, Telser I (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(1):44-84.

Van den Broeke LT, Beijersbergen van Henegouwen GMJ (1994). UV radiation protecting efficacy of cysteine derivatives, studies with UVA-induced binding of 8-MOP and CPZ to rat epidermal biomacromolecules in vivo. *Int J Radiat Biol*, 67:411-420.

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.

Van Zandwijk N (1995). N-Acetylcysteine (NAC) and glutathione (GSH): antioxidant and chemopreventive properties with special reference to lung cancer. *J Cell Biochem*, 22:24-32.

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.

Verreth W, De Keyzer D, Davey PC, Mutus B (2007). Rosuvastatin restores superoxide dismutase expression and inhibits accumulation of oxidized LDL in the aortic arch of obese dyslipidemic mice. *Br J Pharmacol*, 15:347-55.

Walson PD, Groth Jr JF (1993). Acetaminophen hepatotoxicity after a prolonged ingestion. *Pediatrics*, 91:1021-1022.

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.

Waters MD, Stack HF, Jackson MA, Brockman HE, De Flora S (1996). Activity profiles of antimutagens: *in vitro* and *in vivo* data. *Mutat Res*, 350:109-129.

Whitcomb RW, Linehan WM, Knazek RA (1988). Effects of long-chain, saturated fatty acids on membrane microviscosity and adrenocorticotropin responsiveness of human adrenocortical cells *in vitro*. *J Clin Invest*, 81:185-188.

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

Ying W (2008). NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid Redox Signal*, 10:179-206.

Zheng M, Storz G (2000). Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem Pharmacol*, 59(1):1-6.

8. ANEXOS

8.1 Carta de aprovação do Comitê de Ética 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: 130247

Data da Versão do Projeto:

Pesquisadores:

DESIREE PADILHA MARCHETTI

LAURA BANNACH JARDIM

MARION DEON

ANDRE ANJOS DA SILVA

BRUNA DONIDA

CARMEN REGLA VARGAS

GILIAN BATISTA BALBUENO GUERREIRO

Título: Efeito in vitro de antioxidantes sobre o dano ao DNA em pacientes portadores de adrenoleucodistrofia ligada ao 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, 28 de outubro de 2013.


Prof. Eduardo Pandolfi Passera
Coordenador GPPG/HCPA

8.2 Ficha de dados dos pacientes

Nome completo do Paciente:

Data de Nascimento: ____/____/____ (DD/MM/AAAA)

Sexo: () masc. () fem () obs.

Nome do médico solicitante:

Nome de outro médico ou pessoa para contato:

Serviço de origem:

Data da solicitação: ____/____/____ (DD/MM/AAAA)

Amostras Enviadas: () urina
() plasma
() sangue heparinizado
() sangue em papel filtro
() outra (descrever)

Exames Solicitados:

Motivo principal da solicitação:

Resumo da história clínica:

Sinais e sintomas selecionados:

hepatomegalia	() não	() sim
retardo de crescimento	() não	() sim
retardo neuropsicomotor	() não	() sim
deficit cognitivo	() não	() sim
regressão neurológica	() não	() sim

vômitos	() não	() sim
dificuldade alimentação	() não	() sim
failure to thrive	() não	() sim
dismorfias	() não	() sim
convulsões	() não	() sim
hipotonia	() não	() sim
coma	() não	() sim
macrocefalia	() não	() sim
Insuficiência adrenal	() não	() sim
Outro:	() não	() sim

Principais resultados de exames relevantes anteriores:

Dados laboratoriais selecionados:

hiperamoniemia	() não	() sim :
hipoglicemia	() não	() sim :
acidose metabólica	() não	() sim
cetonúria	() não	() sim
acidemia láctica	() não	() sim

Neuroimagem :

tomografia computadorizada	() não	() sim
	() normal	() anormal
ressonância magnética	() não	() sim
	() normal	() anormal

Medicamentos em uso: () não () sim:

Dieta especial? () não () sim:

Consangüinidade entre os pais: () não () sim

Outros casos na família? () não () sim

Hipóteses diagnósticas:

Alguma informação relevante adicional?

8.3 Ficha de dados de indivíduos controle

Data da coleta:

Nome completo:

Data de nascimento: ____/____/____ (DD/MM/AAAA)

Idade:

Sexo: () masc. () fem.

Motivo da solicitação do exame:

Apresenta doenças já diagnosticadas?

diabete melito () não () sim
hipotireoidismo () não () sim
hipertireoidismo () não () sim
hipertensão arterial sistêmica (HAS) () não () sim
acidente vascular cerebral (AVC) () não () sim
cardiopatia isquêmica () não () sim
insuficiência cardíaca () não () sim
insuficiência hepática () não () sim
insuficiência renal () não () sim
insuficiência adrenal () não () sim

outras: _____

8. Está usando medicamento? () não () sim:

9. Doenças na família biológica:

dislipidemia () não () sim

hipertensão arterial sistêmica (HAS) () não () sim

cardiopatía isquêmica () não () sim

acidente vascular cerebral (AVC) () não () sim

diabete melito () não () sim

outra doença crônica: _____

10. Fuma? () não () sim

8.4 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: pacientes com Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X

Você, portador de Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X, está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado “Efeito *in vitro* de antioxidantes sobre o dano ao DNA em pacientes portadores de Adrenoleucodistrofia ligada ao X”. Este projeto tem por objetivo verificar o efeito de diferentes antioxidantes (N-acetil-L-cisteína, rosuvastatina e Vitamina E) sobre o dano ao DNA, através do Ensaio Cometa em sangue total e detecção de 8-oxoguanosina em plasma. Também serão realizadas análises de marcadores de estresse oxidativo em urina. É importante salientar que todos os ensaios serão realizados *in vitro*.

Os dados necessários para a realização do projeto serão obtidos através de entrevistas realizadas com você (portador de X-ALD) e/ou seus responsáveis legais, das consultas médicas no Ambulatório do Serviço de Genética Médica/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. É muito importante que você saiba que os dados (entrevista, dados clínicos, coleta de sangue e urina) obtidos com sua doação são de relevante importância científica para o estabelecimento de novos tratamentos para X-ALD, bem como para um melhor entendimento desta doença.

Os riscos e desconfortos causados pela coleta de material biológico para o estudo são semelhantes aos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina. O material coletado será utilizado única e exclusivamente para fins do projeto de pesquisa, sendo garantido o sigilo das informações obtidas e que o indivíduo, ou seja, você terá acesso às mesmas. Cabe salientar que a sua participação no estudo é totalmente voluntária, e que a sua desistência não trará implicações ao seu atendimento clínico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. É importante ressaltar também, 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.

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo (Profa. Dra. Carmen Regla Vargas e a mestranda 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.

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:

8.5 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: indivíduos controle

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado “Efeito *in vitro* de antioxidantes sobre o dano ao DNA em pacientes portadores de Adrenoleucodistrofia ligada ao X”. Este projeto tem por objetivo verificar o efeito de diferentes antioxidantes (N-acetil-L-cisteína, rosuvastatina e Vitamina E) sobre o dano ao DNA, através do Ensaio Cometa em sangue total e detecção de 8-oxoguanosina em plasma. Também serão realizadas análises de marcadores de estresse oxidativo em urina. É importante salientar que todos os ensaios serão realizados *in vitro*. 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. Os riscos e desconfortos causados pela coleta de material biológico para o estudo são semelhantes aos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina. 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 patologia. O material coletado será única e exclusivamente utilizado para fins do projeto de pesquisa, sendo reservado a você acesso às mesmas.

As informações individuais levantadas pela pesquisa são confidenciais. Os resultados obtidos serão agrupados e expressos através de resultados numéricos, sem qualquer referência a elementos que possam identificar as pessoas que participaram do estudo.

Todas as despesas relacionadas ao custo dos exames laboratoriais serão cobertas por verbas do próprio Projeto de Pesquisa, portanto, completamente gratuitas para você.

Caso você queira retirar-se em definitivo da pesquisa, terá total liberdade para fazê-lo, sem que isso prejudique a futuros atendimentos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O seu material (sangue ou urina) coletado será destruído e os seus dados excluídos do nosso banco de dados.

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo (Profa. Dra. Carmen Regla Vargas e a mestranda 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.

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: