

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AO CROMOSSOMO X E
ESTRESSE OXIDATIVO: PAPEL DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS
HEMATOPOIÉTICAS E DA INTERLEUCINA 6.**

FRANCIELI JULIANA ROCKENBACH

PORTO ALEGRE, 2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AO CROMOSSOMO X E
ESTRESSE OXIDATIVO: PAPEL DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS
HEMATOPOIÉTICAS E DA INTERLEUCINA 6.**

Dissertação apresentada por **Francieli
Juliana Rockenbach** para obtenção do GRAU
DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Regla Vargas

Co-Orientadora: Dra. Marion Deon

Porto Alegre, 2012

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30.03.2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Dra. Ângela Sitta

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Alethea Gatto Barschak

Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dr. Solange Cristina Garcia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rockenbach, Francieli Juliana
Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X e
estresse oxidativo: Papel do Transplante de Células
Hematopoiéticas e da Interleucina 6 / Francieli
Juliana Rockenbach. -- 2012.
125 f.

Orientadora: Carmen Regla Vargas.
Coorientadora: Marion Deon.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. Adrenoleucodistrofia. 2. Transplante de
Células Hematopoiéticas. 3. Estresse Oxidativo. 4.
Radicais Livres. 5. IL-6. I. Vargas, Carmen Regla,
orient. II. Deon, Marion, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

À Prof^ª. Dra. Carmen Regla Vargas, pela orientação, confiança, paciência e oportunidade.

À Dra. Marion Deon, por sua dedicação, amizade, contribuição e pelas sugestões na construção deste trabalho.

A grande amiga Daiane Péres Marchese, que como bolsista de Iniciação Científica contribuiu imensamente na realização do trabalho. Meu profundo agradecimento pela amizade, incentivo, persistência e paciência que sempre me dedicou.

A amiga Caroline Paula Mescka, pela inspiração à pesquisa, incentivo e contribuição.

Aos colegas e bolsistas do Laboratório de Análise de Metabólitos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelas sugestões e pela ajuda na realização dos experimentos.

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

A Secretaria Municipal de Saúde de Caxias do Sul, pela compreensão, flexibilidade e boa vontade que possibilitaram a continuidade deste trabalho.

Aos todos meus familiares, pelo carinho, pelos bons momentos e constante incentivo.

Aos meus pais, Marcos e Marta, pelos ensinamentos, pelo interesse e pelo apoio às minhas escolhas. Obrigada por tudo.

Às minhas irmãs, Joeli e Marieli, pela alegria e entusiasmo na família.

Ao meu esposo Fábio, pelo incentivo diário, pelo amor, companheirismo, paciência e perseverança na construção de cada conquista e principalmente nos momentos difíceis.

A Deus, pela inspiração, pela força, por Sua presença em minha vida.

“Tudo é uma questão de manter a mente quieta,

a espinha ereta

e o coração tranquilo”

(Walter Franco)

Resumo

Objetivos. Avaliar o papel do transplante de células hematopoiéticas (TCH) e da interleucina 6 (IL – 6) sobre vários parâmetros de estresse oxidativo em pacientes com Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (X-ALD). **Métodos.** A concentração de malondialdeído (MDA), o conteúdo de carbonilas e sulfidrilas e a concentração de ácido hexacosanóico (C_{26:0}) foram quantificados no plasma de pacientes X-ALD antes e após serem submetidos ao TCH. E, a concentração de MDA, a formação de carbonilas e a concentração de IL-6 foram quantificados em plasma e o conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) foi quantificado em eritrócitos de pacientes X-ALD com fenótipos cerebral infantil (cALD) ou assintomáticos no momento diagnóstico. **Resultados.** Observamos um aumento significativo na concentração de MDA em plasma de pacientes X-ALD antes e após o TCH em comparação ao grupo controle e uma redução significativa nesses valores após o transplante em comparação aos anteriores ao procedimento. Verificamos uma redução significativa no conteúdo de sulfidrilas no plasma de pacientes X-ALD antes do TCH em comparação ao grupo controle e um aumento significativo desses níveis após o TCH. Não observamos diferenças significativas no conteúdo de carbonilas no plasma de X-ALD antes e após o TCH, em comparação aos controles, apesar de observarmos uma redução significativa nesta determinação nos pacientes após o transplante em relação a antes do TCH. Os pacientes X-ALD apresentam níveis plasmáticos de C_{26:0} significativamente aumentados antes do TCH em comparação aos controles e, após o TCH, as concentrações de C_{26:0} foram reduzidas. Observamos uma correlação negativa significativa entre a medida do conteúdo de sulfidrilas e os níveis plasmáticos de C_{26:0} de indivíduos X-ALD antes do TCH. Também evidenciamos elevados níveis de MDA e da formação de carbonilas no plasma de pacientes cALD e assintomáticos em comparação ao grupo controle. Ainda, observamos redução significativa do conteúdo de GSH nos dois grupos testados comparados aos controles. A quantificação de IL-6 foi significativamente maior nos pacientes cALD, o que não foi observado nos pacientes assintomáticos, apesar destes mostrarem uma tendência de aumento da concentração de IL-6. **Conclusões.** Os

resultados obtidos a partir do plasma de pacientes X-ALD antes e após o TCH demonstram que esta terapia, quando bem indicada e bem sucedida, tem alta efetividade em reduzir a concentração plasmática de $C_{26:0}$ e é eficaz em reduzir a peroxidação lipídica e o dano oxidativo às proteínas nos pacientes X-ALD. Ainda, é possível relacionar o acúmulo de $C_{26:0}$ e o dano oxidativo na patogênese da X-ALD. Nossos dados permitem sugerir que a lipoperoxidação e o dano oxidativo às proteínas possam de alguma forma estar envolvidos na fisiopatologia da X-ALD. Além disso, podemos presumir que, nos pacientes X-ALD assintomáticos estudados, o dano oxidativo e os aspectos inflamatórios desempenham papéis importantes na evolução e nas futuras manifestações do fenótipo neuronal. Também podemos supor que a administração de antioxidantes deve ser considerada como uma terapia adjuvante potencial para os pacientes assintomáticos e sintomáticos afetados pela X-ALD, inclusive para aqueles submetidos ao TCH.

Palavras-chave: Transplante de Células Hematopoiéticas, Adrenoleucodistrofia, Estresse Oxidativo, Radicais Livres, Peroxidação Lipídica, Dano oxidativo a proteínas, IL-6, Glutathione reduzida.

Abstract

X-linked adrenoleukodystrophy and oxidative stress: role of hematopoietic stem cell transplantation and IL-6.

Objective. We aimed to evaluate the role of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) and interleukin 6 (IL – 6) on various parameters of oxidative stress in X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) patients. **Methods.** Malondialdehyde (MDA), sulfhydryl, carbonyl and hexacosanoic acid (C_{26:0}) levels were measured in plasma from X-ALD patients before and after HSCT. And, MDA, carbonyl and IL-6 levels were measured in plasma and reduced glutathione (GSH) content was measured in erythrocytes from X-ALD patients with different phenotype (asymptomatic and childhood cerebral (CCER patients) at diagnosis moment. **Results.** We observed increased levels of MDA in plasma from X-ALD before and after HSCT compared to control group, but there was a significant reduction in MDA values after transplantation compared to levels found before the procedure. We verified a significant decrease in sulfhydryl content in plasma of X-ALD patients before HSCT compared with the control group and we also verified a significant increase in the levels of sulfhydryl content after HSCT. No significant differences were observed in carbonyl content in plasma of X-ALD before and after HSCT, compared to controls. However, we observed a significant reduction of plasma carbonyl content from X-ALD patients after HSCT compared to before HSCT. X-ALD patients presented a significant increase of C_{26:0} plasma level before HSCT when compared to controls and an important reduction of C_{26:0} plasma concentration in X-ALD patients after HSCT when compared to before HSCT C_{26:0} levels. We observed an inverse significant correlation between sulfhydryl content and plasma C_{26:0} levels of X-ALD individuals before HSCT. We also evidenced high levels of MDA and carbonyl formation in plasma from CCER and asymptomatic patients compared to controls. Still, we observed a significant decrease of GSH content in both groups tested compared to controls. The quantification of IL-6 is significantly higher in CCER patients, which is not observed in asymptomatic patients, despite

*these patients show a tendency of increased concentration of IL-6. **Conclusions.** The results obtained from plasma of X-ALD patients before and after HSCT demonstrate that this therapy, when well indicated and successful, has high effectiveness in reducing C_{26:0} plasma and is effective in reducing lipid peroxidation and oxidative damage to proteins in X-ALD patients. Still, it is possible to relate the accumulation of C_{26:0} and oxidative damage in the pathogenesis of X-ALD. Our data also suggest that lipid peroxidation and protein damage may somehow be involved in the pathophysiology of X-ALD. Moreover, we can assume that in our asymptomatic X-ALD patients, oxidative damage and inflammatory issues seem to play an important role in the evolution and future manifestations of neuronal phenotype. We can also assume that the administration of antioxidants should be considered as a potential adjuvant therapy for asymptomatic and symptomatic patients affected by X-ALD, including those that are submitted to HSCT.*

Key-Words: hematopoietic stem cell transplantation, adrenoleukodystrophy, oxidative stress, free radicals, lipid peroxidation, protein damage, IL-6, reduced glutathione.

Lista de Abreviaturas

- ACTH - Hormônio Adrenocorticotrófico
- ALDP - Proteína ALD
- AGCML – Ácidos Graxos de Cadeia Muito Longa
- AMN – Adrenomieloneuropatia
- AVP - Ácido Valpróico
- BHE - Barreira Hematoencefálica
- cALD – Adrenoleucodistrofia Cerebral Infantil
- CCD – Cromatografia em Camada Delgada
- C_{22:0} - Ácido docosanóico
- C_{24:0} - Ácido Tetracosanóico
- C_{26:0} - Ácido Hexacosanóico
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- EIM - Erros Inatos do Metabolismo
- ERO - Espécies Reativas de Oxigênio
- ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio
- GSH - Glutathiona
- GTE - Glicerol Trierucato
- GTO - Glicerol Trioleato
- HLA - Complexo de Histocompatibilidade - (*“Human Leukocyte antigen”*)
- HTZ - Heterozigotas
- IL1 β – Interleucina 1 beta
- IL-6 – Interleucina 6
- KO – nocaute (*“knockout”*)
- MDA - Malondialdeído
- MDAL – Malondialdeído - Lisina
- NAC – N-Acetilcisteína
- OL – Óleo de Lorenzo

RIT – Transplante de células tronco de intensidade reduzida (“*Reduced-intensity stem cell transplantation*”)

RL - Radicais Livres

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SNC - Sistema Nervoso Central

TAR – Reatividade Antioxidante Total

TAS – *Status* Antioxidante total

TCH - Transplante de Células Hematopoiéticas

TMO- Transplante de Medula Óssea

TNF α - Fator de Necrose Tumoral α

X-ALD - Adrenoleucodistrofia ligada ao Cromossomo X

Sumário

1. Introdução.....	17
1.1 Erros Inatos do Metabolismo.....	17
1.2 Doenças Peroxissomais	19
1.3 Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X.....	21
1.3.1 Transplante de Células Hematopoiéticas.....	29
1.3.2 Radicais Livres, Antioxidantes e Estresse Oxidativo	33
1.3.3 X-ALD e estresse oxidativo.....	35
2. Objetivos.....	39
2.1 Objetivo Geral.....	39
2.2 Objetivos Específicos	39
3. Resultados.....	41
3.1 Capítulo 1- Artigo 1.....	43
3.2 Capítulo 2- Artigo 2.....	65
4. Discussão.....	83
5. Conclusões.....	95
5.1 Capítulo 1.....	95
5.2 Capítulo 2.....	97
5.3 Conclusão Geral.....	99
6. Perspectivas.....	101
7. Referências	103
8. Anexos.....	113
8.1 Carta de Aprovação do Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.....	113
8.2 Folha de Rosto para Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.....	115
8.3 Termo de consentimento – Indivíduos Controles.....	117
8.4 Termo de consentimento – Pacientes X-ALD.....	121
8.5 Comprovante de submissão do artigo intitulado “ <i>Investigation of lipid peroxidation, protein oxidative damage and inflammatory process in plasma from Asymptomatic and Childhood Cerebral X-Linked Adrenoleukodystrophy Patients</i> ” ao periódico <i>Clinical Biochemistry</i>	125

1. INTRODUÇÃO

1.1 Erros Inatos do Metabolismo

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são distúrbios hereditários causados pela deficiência total ou parcial de uma proteína, geralmente uma enzima. A ausência ou deficiência severa na atividade enzimática pode levar ao bloqueio de uma rota metabólica, o que resulta em acúmulo de substratos tóxicos e falta de produtos essenciais da rota. De acordo com a via afetada, a sintomatologia apresentada é bastante variada, sendo geralmente grave e muitas vezes letal. Individualmente são doenças raras, mas em seu conjunto atingem pelo menos um para cada mil nascimentos (Scriver et al., 2001)

Saudubray e Charpentier (2001) classificaram os EIM em três grandes grupos, de acordo com a área do metabolismo afetada:

- Grupo I: Desordens de síntese ou catabolismo de moléculas complexas, como as doenças lisossômicas de depósito e as desordens peroxissomais.
- Grupo II: Desordens do Metabolismo Intermediário, como as aminoacidopatias e as acidemias orgânicas.
- Grupo III: desordens na produção ou utilização de energia, como as doenças mitocondriais da cadeia respiratória e defeitos de oxidação dos ácidos graxos.

O presente trabalho trata de um EIM pertencente ao Grupo I da classificação supracitada, a Adrenoleucodistrofia ligada ao Cromossomo X (X-ALD), uma desordem peroxissomal.

1.2 Doenças Peroxissomais

O peroxissomo é uma suborganela da maioria das células eucarióticas que possui mais de 40 diferentes enzimas oxidativas e catalisa um grande número de reações essenciais de diferentes rotas metabólicas, desempenhando um importante papel no metabolismo intermediário (Olivier e Krisans, 2000). Um dos mais importantes processos metabólicos em que o peroxissomo está envolvido é a β -oxidação de Ácidos Graxos de Cadeia Muito Longa (AGCML) (Wanders et al., 2001).

Comprometimento neurológico grave – retardo psicomotor, hipotonia, convulsões, deficiência auditiva e comprometimento ocular – é a principal característica em 18 dos 21 distúrbios peroxissomais já descritos (Powers e Moser, 1998; Wanders et al., 2001; Baumgartner e Saudubray, 2002). No plasma de indivíduos acometidos com estas enfermidades, os AGCML, o ácido piperólico, os ácidos biliares e os ácidos pristânico e fitânico acumulam-se em graus variados (Ten Brink et al., 1993). Sua incidência ultrapassa de 1: 25000 nascidos vivos. As doenças peroxissomais estão subdivididas da seguinte forma:

- Defeito de uma única enzima peroxissomal: a estrutura peroxissomal é presente e intacta, ocorrendo defeito em uma única proteína peroxissomal, e, com isso, apenas uma via metabólica peroxissomal é afetada. Este grupo abrange pelo menos 10 doenças: X-ALD (defeito no transporte da Proteína ALD (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 (deficiências das diidroxiacetona fosfato aciltransferase e alquil diidroxiacetona fosfato sintase), doenças da β -oxidação como a deficiência da acil-CoA oxidase, proteína bifuncional e tiolase) e acatalasemia (deficiência de catalase) (Powers e Moser, 1998).
- Doenças da biogênese do peroxissomo (DBP): nestes casos a organela não é formada normalmente e várias funções peroxissomais estão deficientes. Assim, quando totalmente ausentes, esta disfunção afeta todas as vias

metabólicas do peroxissomo. São divididas em dois subtipos: Espectro Zellweger e Espectro Condrodisplasia Rizomélica Punctata (forma da condrodisplasia rizomélica punctata tipo I) (Powers e Moser, 1998).

1.3 Adrenoleucodistrofia ligada ao Cromossomo X

A Adrenoleucodistrofia ligada ao Cromossomo X (X-ALD) é o mais frequente distúrbio do metabolismo peroxissomal que ocorre em aproximadamente 1 em cada 17.000 nascidos vivos (somando-se homens (hemizigotos) e mulheres heterozigotas) (Bezman et al., 2001). Este EIM caracteriza-se por comprometer principalmente a substância branca e os axônios do sistema nervoso central (SNC), o córtex adrenal e os testículos (Bezman et al., 2001; Moser et al., 1992) e está associado ao acúmulo de AGCML, que são quase sempre saturados, sem ramificações, incluindo principalmente os de cadeia de 26 carbonos (ácido hexacosanóico, C_{26:0}) e de 24 carbonos (ácido tetracosanóico, C_{24:0}) (Moser et al., 1992; Moser, 1997; Moser et al., 2001). Os AGCML acumulam-se em fluidos biológicos e tecidos na X-ALD devido a um defeito na degradação dessas substâncias, que normalmente ocorre nos peroxissomos (Moser et al., 2001).

Em condições não patológicas, a mielina contém majoritariamente ácidos graxos de cadeia longa (C16 a C20). No cérebro de pacientes X-ALD, a mielina contém um alto teor de AGCML, o que provoca uma reação inflamatória que leva à desmielinização (Kemp e Wanders, 2010). Assim como na Esclerose Múltipla, na X-ALD ocorre ruptura na mielina, com relativa preservação dos axônios neuronais, deposição de ésteres de colesterol e resposta inflamatória perivascular que ultrapassa a Barreira Hematoencefálica (BHE) (Moser, 1997).

A disfunção adrenal na X-ALD é devida à insuficiência adrenocortical primária e a elevação dos níveis plasmáticos do hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH) é a manifestação inicial. A acumulação lipídica anormal que contém AGCML é responsável por esta disfunção (Moser, 1997).

O defeito primário da X-ALD envolve um único gene no cromossomo X que foi mapeado como Xq28 (Moser et al., 1992; Moser, 1997; Moser et al., 2001). Esse distúrbio é devido a uma mutação no gene ABCD1 (gene que codifica as proteínas transportadoras ABC – *do inglês* “ATP binding cassette”) e

resulta em defeito na beta-oxidação peroxissomal (Moser et al., 2001). A proteína codificada por este gene é denominada proteína ALD (ADLP) e é homóloga à proteína de membrana peroxissomal pertencente à família dos transportadores ABC (Mosser et al., 1993). Já foram identificadas mais de 1251 mutações do gene ABCD1, responsáveis pela ausência ou insuficiência da ADLP (Di Benedetto et al., 2009). A ausência ou a disfunção da ADLP está relacionada com a desmielinização (Moser, 1997).

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) (Powers et al., 1992; McGuinness et al., 1997; Moser et al., 2001). Através de técnicas de biologia molecular realizadas em tecido cerebral *post mortem* de um paciente X-ALD de nove anos de idade foram demonstrados níveis aumentados de diversas interleucinas, inclusive IL-1, TNF α e IL-6, tanto em regiões com lesão desmielinizante quanto em regiões aparentemente normais (Paintlia et al., 2003).

A adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X pode se apresentar em uma ampla faixa etária e com diferentes manifestações clínicas dependendo da presença e do tipo de achados neurológicos. Os fenótipos da X-ALD abrangem desde uma doença infantil (cALD), bastante severa e de rápida progressão que pode levar a um estado vegetativo e morte em dois anos a partir do primeiro sintoma, até uma paraparesia lentamente progressiva com preservação do intelecto que se manifesta na idade adulta e é compatível com a vida normal, adrenomielopatia – AMN (Moser et al., 1992). Estes dois fenótipos são os mais frequentes (Kemp et al., 1998; Dubois-Dalcq et al., 1999).

É considerável o número de mulheres heterozigotas (HTZ) para X-ALD que desenvolvem sintomas que atingem a medula espinhal como paraparesia progressiva, anormalidade do controle esfinteriano e distúrbios sensoriais, afetando principalmente os membros inferiores, sendo semelhante à forma de adrenomielopatia em homens (Moser et al., 2001).

A X-ALD é caracterizada por uma ampla variedade fenotípica (Moser et al., 2001, Stradomska e Tyłki-Szymanska, 1996). Cabe salientar que os vários fenótipos podem ocorrer dentro de uma mesma família (Fournier et al., 1994). Além disso, não há relação estabelecida entre genótipo e fenótipo (Moser et al., 2001; Fournier et al., 1994). Moser et al. (2001) descreveram 7 fenótipos clínicos para homens e 4 em mulheres HTZ. Os fenótipos 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) <i>AMN puro</i> <i>AMN cerebral</i>	Idade inicial: 20-29 anos. Envolvimento da medula espinhal e nervos periféricos. Lenta progressão. Insuficiência adrenal. “AMN” com envolvimento inflamatório cerebral.	25-30% 10-12%
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. RMN normal.	Diminui com a idade. Comum < 4 anos. Muito raro > 40 anos.

Fonte: Moser et al. (2001).

Tabela 2 Fenótipos clínicos em mulheres portadoras de X-ALD.

Fenótipo em HTZ para X-ALD.	Descrição	Frequência relativa
Forma assintomática	Sem evidência de anormalidade neurológica ou adrenal	Diminui com a idade. Maioria das mulheres < 30 anos neurologicamente não envolvidas.
Mieloneuropatia <i>branda</i> <i>moderada à severa</i>	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		1%

Fonte: Moser et al. (2001).

O diagnóstico da X-ALD pode ser sugerido pela sintomatologia clínica, corroborada pelos exames de neuroimagem e deve ser confirmado bioquimicamente pela detecção dos níveis aumentados dos AGCML no plasma dos pacientes (Moser et al., 2001).

A avaliação de exames de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) pode determinar o comprometimento do SNC. Loes et al. (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 34 é o escore máximo de lesões e danos cerebrais (Loes et al., 2003).

O diagnóstico laboratorial da X-ALD depende da apresentação de níveis anormalmente elevados de AGCML saturados em fluidos corporais como soro ou plasma e/ou em tecidos acessíveis como fibroblastos cultivados, leucócitos, eritrócitos, fígado e músculo. Pela facilidade de obtenção, inicialmente a análise de soro ou de plasma tem sido a mais utilizada na rotina. Uma grande variedade de métodos cromatográficos tem sido descritos para a determinação de AGCML (Moser et al., 2001). Muitos laboratórios utilizam o procedimento original

desenvolvido por Moser e Moser (1991), o qual envolve a preparação de um extrato de lipídios totais, o tratamento desse extrato com ácido clorídrico metanóico (produzindo metilésteres), a purificação dos metilésteres através de cromatografia de camada delgada (CCD) e a quantificação por cromatografia gasosa (Dacremont et al., 1995). Para a correta interpretação do resultado das análises, é necessário medir a concentração dos ácidos hexacosanóico ($C_{26:0}$) e tetracosanóico ($C_{24:0}$), bem como verificar as razões $C_{26:0}/C_{22:0}$ (ácido docosanóico) e $C_{24:0}/C_{22:0}$. Apesar das concentrações de AGCML em pacientes X-ALD serem menos acentuadas do que outras doenças peroxissomais, na maior parte das vezes (acima de 90%) todos os três parâmetros estão mais do que dois desvios padrões acima dos valores médios dos controles (Wanders et al., 1995).

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

Tabela 3 Valores referenciais das concentrações plasmáticas dos AGCML ($C_{22:0}$, $C_{24:0}$ e $C_{26:0}$) e das razões ($C_{26:0}/C_{22:0}$ e $C_{24:0}/C_{22:0}$) em $\mu\text{mol/L}$ para indivíduos normais (controles), heterozigotas (HTZ) para X-ALD 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.

A detecção de heterozigotas é possível na X-ALD através da análise dos AGCML no soro ou fibroblastos ou pela análise de DNA. Segundo Moser e col. (2001), 80% das heterozigotas apresentam níveis anormais de AGCML

plasmático. Tal percentagem é mais alta (95%) ao analisar os níveis de AGCML em fibroblastos, o que indica que a detecção de heterozigotas pode ser mais sensível se este tecido é analisado (Wanders et al., 1993). Apenas as novas metodologias moleculares de diagnóstico são capazes de identificar a mutação responsável pela X-ALD (gene Xq28) no afetado, permitindo, deste modo, a identificação precisa da mulher portadora (Migeon et al., 1981; Aubourg et al., 1987; Moser et al., 2001).

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

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

Rizzo e col. (1987) demonstraram que a administração de glicerol trioleato (GTO) juntamente com glicerol trierucato (GTE) diminui acentuadamente os AGCML no plasma. A mistura 4:1 de GTO e GTE, chamada de “Óleo de Lorenzo” (OL), normalizou os níveis de C_{26:0} no plasma da maioria dos pacientes em quatro semanas de tratamento. Sendo assim, a terapêutica para a X-ALD consiste na administração da mistura Óleo de Lorenzo, associada com uma dieta

pobre em AGCML, que produz a diminuição dos AGCML nos tecidos. Este tratamento é controverso, pois não parece haver melhora clínica significativa nos pacientes sintomáticos tratados, pois não há regressão dos sintomas, principalmente os neurológicos, já instalados (Moser et al., 2001). Entretanto, o OL mostrou-se eficaz em pacientes assintomáticos, como verificado em estudo colaborativo com 89 indivíduos assintomáticos para X-ALD tratados com OL e acompanhados em média por 7 anos, em que foi evidenciado que a redução do C_{26:0} estava associada a um menor risco de desenvolver alterações na RMN (Moser et al., 2005). Deon et al. (2008a) observaram que os níveis de C_{26:0} reduziram significativamente em pacientes assintomáticos para X-ALD tratados com OL, atingindo valores na faixa da normalidade.

A terapia gênica poderá ser o passo fundamental para a possibilidade de cura da X-ALD. Estudos demonstraram a correção da beta-oxidação peroxissomal depois de uma transferência viral de cDNA em fibroblastos e células hematopoiéticas (Unterrainer et al., 2000; Cartier, 2001). Em estudo pré-clínico, foi demonstrada a viabilidade de um Transplante Autólogo de células-tronco modificadas geneticamente por vetor lentiviral derivado de HIV1 (Cartier et al., 2009). Resultados promissores, semelhantes aos de um TCH, estão sendo demonstrados em estudo clínico realizado em dois pacientes submetidos a terapia gênica cuja desmilenização cerebral foi contida. (Cartier et al., 2012)

Além das modificações na dieta, utilização de fármacos para manejar a insuficiência adrenal e da expectativa pela terapia gênica, a mais importante alternativa terapêutica para X-ALD tem sido o transplante de células hematopoiéticas (Moser et al., 2001).

1.3.1 Transplante de Células Hematopoiéticas

O transplante de células hematopoiéticas (TCH), também chamado transplante de medula óssea (TMO) é o método mais efetivo atualmente para a terapia de cALD, nos casos em que a forma cerebral for detectada em estágios iniciais da doença, sendo o único método que melhora a desmielinização cerebral (Moser et al., 2001). O primeiro TCH ocorreu em 1984 em um menino de 12 anos de idade, já com comprometimento neurológico importante. Suas anormalidades cerebrais não melhoraram após o transplante e ele morreu 141 dias após a cirurgia (Moser et al., 2001). Estudos subsequentes afirmaram que TCH em pacientes com maior incapacidade neurológica não melhorava o estado neurológico e poderia até acelerar a deterioração. O primeiro TCH bem sucedido ocorreu em 1990 em um menino de oito anos de idade com anormalidades leves na função psicométrica, na função motora, no estado neurológico e na imagem de RMN. Após o procedimento, as manifestações neurológicas regrediram e houve melhora das funções cognitivas, apesar do leve aumento nos níveis de AGCML (Aubourg et al., 1990). Shapiro et al. (2000) em estudo de acompanhamento de 12 pacientes cALD submetidos a TCH mostraram que essa intervenção pode interromper ou até reverter a desmielinização em pacientes pouco sintomáticos, pode manter os parâmetros neuropsicológicos em níveis normais e também pode diminuir em 55% as concentrações dos AGCML, deixando-os pouco acima dos níveis normais. Peters et al. (2004) relataram a experiência do transplante em 94 pacientes cALD entre os anos de 1982-1999 e concluíram que os resultados de TCH em pacientes com leve envolvimento neurológico eram bastante animadores e apresentavam muitos benefícios, enquanto que os meninos X-ALD com avançado grau de comprometimento neurológico não seriam candidatos ao TCH e sim a terapias experimentais. Baumann et al. (2003) avaliaram os dados de 12 meninos submetidos a TCH por 5 anos e meio após o procedimento, a fim de elucidar fatores prognósticos. Demonstraram que o TCH pode cessar o processo de desmielinização quando realizado em um estágio crítico no início da

doença e que o prognóstico de curso clínico após o transplante em geral depende do estado prévio do paciente, embora possam ocorrer circunstâncias inesperadas.

O tratamento seria indicado, então, para pacientes com alterações sutis nos exames neurológicos, neuropsicológicos e de imagem, como RMN cerebral. Para outros fenótipos sem envolvimento inflamatório, como AMN “puro” ou mulheres HTZ para X-ALD, e casos de avançado acometimento cerebral, esse tratamento não parece recomendável (Mahmood et al., 2005). Ainda, há uma necessidade urgente de marcadores biológicos que possam auxiliar neurologistas e hematologistas na seleção de pacientes que poderiam ser bons candidatos ao procedimento (Cartier e Aubourg, 2010).

Os mecanismos de ação dos efeitos benéficos do TCH ainda não estão completamente compreendidos. Acredita-se que os seguintes fatores estejam envolvidos: a) o suprimento de enzimas normais ao cérebro através de células derivadas do TCH (microglia); b) imunossupressão associada com o transplante; c) a 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 ao SNC do afetado, onde seriam capazes de metabolizar os AGCML acumulados diretamente no SNC. Ainda, acredita-se que o mecanismo esteja relacionado à interrupção do processo inflamatório no SNC associado ao dano à mielina. Devido a seus altos riscos e à necessidade de se ter um doador imunologicamente compatível, a indicação desse procedimento deve ser cuidadosamente analisada (Moser et al., 2001; Peters et al., 2004; Mahmood et al., 2005).

Apesar dos importantes avanços na área do TCH e da disponibilidade de sangue de cordão umbilical como fonte de células hematopoiéticas, importantes limitações ainda são encontradas. O TCH pode resultar em severa Doença do Enxerto Versus Hospedeiro e prolongada deficiência imunológica. Para alguns dos meninos que sobrevivem a estas complicações, as lesões cerebrais desmielinizantes podem continuar progredindo significativamente, fazendo com

que os pacientes permaneçam com significativos déficits motor, visual, cognitivo e auditivo por longo período, resultando em má qualidade de vida. Ainda, o risco de mortalidade de TCH realizado com células de doador não relacionado (com razoável compatibilidade HLA) ou com células de cordão umbilical permanece entre 15 a 20 % em crianças e 30 a 40 % em adultos, quando realizada completa mielossupressão com ciclofosfamida e bussulfan, o mais comum regime de condicionamento utilizado até o momento na X-ALD (Cartier e Aubourg, 2010).

Segundo Resnick et al. (2005), a redução da toxicidade, morbidade e mortalidade associadas ao transplante é uma forma importante de melhorar o tratamento da X-ALD. Com este objetivo, os autores utilizaram um protocolo denominado RIT (*do inglês – Reduced-intensity stem cell transplantation*) adaptado a pacientes pediátricos, para induzir tolerância a Doença do Enxerto Versus Hospedeiro e os acompanharam por 3 a 5 anos após o procedimento, demonstrando que não houve deterioração clínica nem neurológica nos pacientes acompanhados.

Na ausência de uma estratégia terapêutica definitiva para a X-ALD, a identificação de mulheres heterozigotas em tempo hábil e o aconselhamento genético são imperativos. Métodos de triagem neonatal estão sendo estudados e com sua futura implementação será possível viabilizar aos pacientes terapias antes que seu sistema nervoso tenha sido afetado.

1.3.2 Radicais Livres, Antioxidantes e Estresse Oxidativo

O termo radical livre (RL) refere-se a um átomo ou a uma molécula altamente reativos, que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Os radicais livres são formados em um cenário de reações de oxido-redução. Devido a esta característica, os radicais livres são altamente reativos, interagindo rapidamente com proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Em nosso organismo são produzidos radicais livres de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio, mas os que ganham mais destaque devido à reatividade e aos danos que podem causar são os radicais derivados do oxigênio como superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e oxigênio *singlet* (O'_2) (Halliwell e Gutteridge, 2007). O termo espécies reativas do oxigênio (ERO) inclui não somente radicais livres, mas também espécies não radicalares derivadas do oxigênio, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) capaz de levar à formação do radical hidroxila (HO^{\bullet}) (Halliwell e Gutteridge, 2007; Halliwell e Chirico, 1993; Boveris, 1998). As ERO e outros radicais livres podem ser produzidos por fontes exógenas ou endógenas (Halliwell e Gutteridge, 2007; Harris, 1992).

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes oxido-redutores (como as ERO) e o sistema de defesa antioxidante. Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas: agentes oxidantes enzimáticos e não enzimáticos. A primeira atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão, sendo constituída principalmente por, superóxido-dismutase (SOD), catalase e glutathione-peroxidase (GSH-Px). A segunda tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, glutathione (GSH), carotenóides entre outros (Halliwell e Gutteridge, 2007; Harris, 1992).

A Tabela 4 apresenta exemplos das principais defesas antioxidantes: enzimas antioxidantes, antioxidantes não enzimáticos e antioxidantes que podem ser obtidos através da dieta.

Tabela 4: Exemplos de defesas antioxidantes.

ENZIMAS ANTIOXIDANTES	ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS	ANTIOXIDANTES DA DIETA
Superóxido dismutase (SOD)	Glutathione (GSH)	Vitamina C
Catalase	Ácido Úrico	Vitamina E (alfatocoferol)
Glutathione Peroxidase	Albumina	Carotenóides
Enzimas que repõem NADPH	Ceruloplasmina	N-Acetilcisteína (NAC)
Enzimas que sintetizam Glutathione (GSH)	Metalotioneína	Flavonóides Polifenóis
Enzimas que reciclam GSH		Carnitina
Proteínas tióis		Selênio
Enzimas de reparo		Ácido Lipóico

Quando ocorre um desequilíbrio entre a formação dos compostos oxidantes e antioxidantes do organismo, estabelece-se uma condição denominada de estresse oxidativo, onde os RL em excesso começam a produzir danos às macromoléculas biológicas como lipídios (lipoperoxidação), proteínas e DNA (Halliwell e Gutteridge, 2007; Halliwell e Chirico, 1993; Boveris, 1998; Harris, 1992; Wulf, 2001). Estudos demonstraram que os radicais livres participam do mecanismo de instalação de inúmeras doenças, entre elas: diabetes, doença de Parkinson e de Alzheimer, esclerose múltipla, distrofia muscular, catarata e retinopatias, aterosclerose, infarto do miocárdio, enfisema pulmonar, cirrose hepática e vários tipos de câncer, bem como em alguns erros inatos do metabolismo (Halliwell e Gutteridge, 2007; Latini et al., 2002, Vargas et al., 2004, Deon et al., 2006; Barschak et al., 2006; Sirtori et al., 2005; Sitta et al., 2006). A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (Halliwell e Gutteridge, 2007; Halliwell e Chirico, 1993; Wulf, 2001).

1.3.3 X-ALD e estresse oxidativo

A X-ALD é uma doença endócrino-neurodegenerativa, caracterizada bioquimicamente pelo acúmulo de AGCML em tecidos e fluidos corporais e por uma desmilenização progressiva. Muito pouco se sabe sobre a patologia e os mecanismos envolvidos no dano tecidual que ocorre nesta doença (Moser et al., 2001).

Sabe-se que o cérebro é particularmente suscetível ao estresse oxidativo, principalmente devido ao seu alto conteúdo lipídico em relação aos outros tecidos, a sua modesta defesa antioxidante e a sua alta taxa de consumo de oxigênio. Além disso, os RL parecem estar envolvidos em um grande número de enfermidades como nas doenças neurodegenerativas, nas doenças crônico-inflamatórias, nas doenças vasculares, no câncer e nos erros inatos do metabolismo. O estresse oxidativo e/ou nitrativo pode danificar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos das células e das mitocôndrias, causando assim morte celular. Evidências para existência de danos oxidativos e nitrativos dentro de lesões desmielinizantes incluem tanto a presença de peróxidos lipídicos e protéicos bem como de nitrotirosinas, um marcador de formação de peroxinitrito (Halliwell e Gutteridge, 2007; Reznick & Parker, 1993; Smith et al., 1999).

Vargas et al. (2004) verificaram que vários parâmetros de estresse oxidativo estão alterados em plasma, eritrócitos e fibroblastos de pacientes com X-ALD. O aumento da lipoperoxidação e a diminuição da reatividade antioxidante total são indicativos de que o estresse oxidativo esteja envolvido na X-ALD e sugerem que o mesmo possa explicar, ao menos em parte, o comprometimento neurológico dos pacientes nesta doença.

Aumento de produtos de ácido nítrico (nitritos e nitratos) e ânion superóxido foi encontrado em células gliais enriquecidas com C_{26:0}, principal AGCML encontrado aumentado na X-ALD. Segundo os autores, a liberação desses produtos oxidativos indica que os radicais livres têm papel importante na patogênese da resposta neuroinflamatória na X-ALD (Di Biase et al., 2004).

Além disso, Di Biase et al. (2005) observaram que L-mono metil-arginina e N-acetilcisteína (NAC), um conhecido agente antioxidante, inibiram não só nitritos, mas também a produção de superóxido em células gliais adicionadas de C_{26:0}. Sendo assim, ao considerarem adição de C_{26:0} em células gliais de ratos um modelo viável *in vitro* para X-ALD, os autores acreditam que as células gliais dos pacientes X-ALD são muito mais suscetíveis a agentes oxidativos o que resultaria num aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e a depleção da glutathione.

Estudos *post mortem* em córtex adrenal e cérebro de pacientes com X-ALD demonstraram evidências de estresse oxidativo. O estresse oxidativo foi evidenciado através do aumento da expressão de vários parâmetros como manganês-superóxido dismutase e hemoxigenase-1, pertencentes ao sistema antioxidante. O dano oxidativo foi observado através do aumento da lipoperoxidação detectado pelo aumento da produção de malondialdeído e de 4-hidróxinonal, e a presença de proteínas nitrosiladas nas lesões desmielinizantes evidenciam a participação do peroxinitrito, uma das moléculas mais danosas das espécies reativas do nitrogênio (Powers et al., 2005).

Deon et al. (2006) observaram que o tratamento com óleo de Lorenzo não protege ou atenua a produção de radicais livres em pacientes X-ALD sintomáticos e assintomáticos. Em estudos subsequentes, foi verificado um aumento significativo da lipoperoxidação na X-ALD, independentemente dos fenótipos e da manifestação de sintomas, pois até mesmo os assintomáticos e as HTZ (assintomáticas) já apresentam lipoperoxidação induzida no plasma (Deon et al., 2008b). Além disso, foram observadas uma diminuição da reatividade antioxidante total (TAR), indicando uma capacidade deficiente em rapidamente combater um aumento das espécies reativas, em plasma de pacientes sintomáticos e de heterozigotas e também uma diminuição do status antioxidante total (TAS), que representa a quantidade de antioxidante não enzimático tecidual, em plasma de pacientes sintomáticos (cALD e AMN) (Deon et al., 2007; Deon et al., 2008b).

Ainda, Yanagisawa et al. (2008) observaram em macrófagos de camundongos knockout (KO) para X-ALD aumento dos níveis de AGCML, da produção de nitrato, de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e de citocinas pró-inflamatórias. Estes resultados sugerem que o aumento de AGCML em macrófagos pode contribuir na patogênese inflamatória da doença através do aumento das respostas inflamatórias e oxidativas. Estudo semelhante em linfoblastos de pacientes X-ALD foi realizado por Uto e colaboradores (2008) onde foi observado que estas células produzem altos níveis de óxido nítrico e citocinas e também geram elevadas quantidades de ERO.

Evidências que malondialdeído-lisina (MDAL), um produto do dano lipoxidativo a proteínas, se acumula na medula espinhal dos camundongos KO ABCD1 e em fibroblastos de pacientes X-ALD foram demonstradas. Foi também observado que trolox, um análogo da vitamina E, reverte essas lesões oxidativas *in vitro*, tornando-se, portanto uma possível estratégia terapêutica para X-ALD (Fourcade et al., 2008).

Tolar e colaboradores (2007) sugeriram que administração de NAC durante o processo de transplante de células hematopoiéticas protegeria os pacientes X-ALD com sintomatologia neurológica avançada de uma fulminante desmielinização e de um mau prognóstico pós-transplante devido as suas propriedades antioxidantes. Essa boa resposta ao antioxidante corrobora com várias evidências de que a fisiopatologia da X-ALD é caracterizada, pelo menos em parte, pelo dano oxidativo.

Neste particular, Foucarde et al. (2010) demonstraram que o ácido valpróico (AVP) induz efeitos antioxidantes na X-ALD, prevenindo dano oxidativo tanto em modelo animal para X-ALD, quanto em paciente submetido a 6 meses de tratamento com AVP. Também foi demonstrado que uma combinação de substâncias antioxidantes (NAC, alfa-tocoferol e ácido lipóico) foi capaz de reduzir a produção de ERO *in vitro* e normalizar lesões oxidativas em medula espinhal dos camundongos KO ABCD1 (Lopez-Erauskin et al., 2011). Do mesmo modo, o tratamento com antioxidantes (NAC e ácido lipóico)

preveniu dano oxidativo a proteíνας e preservou os níveis de glutathione em ratos ABCD⁻¹ (Galino et al., 2011).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o papel da IL – 6 e do transplante de células hematopoiéticas sobre vários parâmetros de estresse oxidativo em pacientes com adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X.

2.2 Específicos

2.1.1 Capítulo 1:

- Avaliar o estresse oxidativo em pacientes X-ALD antes e após TCH ou TMO, através dos seguintes parâmetros:
 - ✓ Avaliação do dano oxidativo às proteínas através da quantificação de carbonilas em plasma e da quantificação de tióis totais (conteúdo de sulfidrilas) em plasma antes e após o TCH.
 - ✓ Avaliação do dano oxidativo a lipídios (lipoperoxidação) através da quantificação do malondialdeído (MDA) em plasma antes e após o TCH.
- Determinar a concentração plasmática de C_{26:0} em pacientes X-ALD antes e após TCH ou TMO.
- Correlacionar a concentração plasmática de C_{26:0} e os parâmetros de estresse oxidativo estudados antes e após TCH/TMO.

2.1.2 Capítulo 2:

- Avaliar o estresse oxidativo em pacientes X-ALD com diferentes formas clínicas (assintomáticos e cALD), através dos seguintes parâmetros:
 - ✓ Avaliação do dano oxidativo às proteínas através da quantificação de carbonilas em plasma.

- ✓ Avaliação do dano oxidativo a lipídios (lipoperoxidação) através da quantificação do malondialdeído (MDA) em plasma.
- ✓ Determinação de glutathione (GSH) em eritrócitos.
- Determinar as concentrações de IL - 6 em plasma de pacientes X-ALD com diferentes formas clínicas.

3. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na forma de capítulos referentes a artigos científicos:

- Capítulo 1- Artigo 1: *The effect of Bone Marrow Transplantation on oxidative stress in X-linked adrenoleukodystrophy.*

Este artigo científico foi aceito pelo periódico *Molecular Genetics and Metabolism*.

- Capítulo 2- Artigo 2: *Investigation of lipid peroxidation, protein oxidative damage and inflammatory process in plasma from asymptomatic and childhood cerebral X-ALD patients.*

Este artigo científico foi submetido ao periódico *Clinical Biochemistry*.

3.1 Capítulo 1 – artigo 01

The effect of Bone Marrow Transplantation on oxidative stress in X-linked adrenoleukodystrophy.

Francieli J. Rockenbach^a, Marion Deon^{a,b*}, Daiane P. Marchese^b, Vanusa Manfredini^e, Caroline Mescka^d, Graziela S. Ribas^{a,b}, Clarissa T. Habekost^b, Claudio G. Castro Jr.^c, Laura B. Jardim^b, Carmen R. Vargas^{a,b,d*}.

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

^b Serviço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, RS, Brasil.

^c Serviço de Oncologia Pediátrica, HCPA, Porto Alegre, RS, Brasil.

^d Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

^e Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, UNIPAMPA, Uruguaiana, RS, Brasil.

Key words: Bone marrow transplantation, adrenoleukodystrophy, oxidative stress, free radicals, lipid peroxidation, protein damage.

***Correspondence:**

Corresponding authors at:

Serviço de Genética Médica, HCPA,

Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP 90.035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Telephone: +55 51 33598011

Telefax: +55 51 33598010

E-mail addresses:

crvargas@hcpa.ufrgs.br (Dr Carmen Regla Vargas)

marion_deon@yahoo.com.br (Dr Marion Deon)

Abstract

Oxidative stress plays an important role in the pathophysiology of neurodegenerative diseases, including X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD). In the present work, we evaluated lipid (malondialdehyde [MDA] content) and protein (sulfhydryl and carbonyl contents) oxidative damage parameters in plasma from X-ALD patients before and after bone marrow transplant (BMT), in order to verify if this treatment is capable to alter the oxidative parameters studied. We also evaluated the plasma concentration of hexacosanoic acid (C26:0) from X-ALD patients and correlated it with the oxidative damage parameters investigated. We observed that MDA content was significantly increased in plasma of X-ALD patients before BMT and after BMT when compared to controls, and that it was significantly reduced in plasma of X-ALD after BMT when compared to the before BMT group. These results indicate that lipid peroxidation is stimulated in X-ALD patients but there is a significant reduction of lipid peroxidation after BMT. Next, we observed a significant reduction of sulfhydryl content in plasma of X-ALD patients before BMT compared to controls indicating protein oxidative damage and that this measurement was increased in these patients after BMT as compared to before BMT. We found no significant differences in plasma carbonyl content in X-ALD patients before and after BMT as compared to controls. However, we observed a significant reduction in this parameter in X-ALD patients after BMT compared to before BMT. Finally, C26:0 plasma concentration was significantly reduced in X-ALD patients after BMT when compared to before BMT. We found no significant correlations between MDA and carbonyl values with C26:0 levels of the patients before BMT and after BMT, but a significant inverse correlation between sulfhydryl content and C26:0 levels was detected. In conclusion, the present study reinforces the hypothesis that lipid peroxidation and protein damage are induced in plasma of X-ALD patients and, in addition, demonstrates that BMT treatment is capable to reduce this pathogenic process. Taken together, the data obtained from plasma of X-ALD patients before and after BMT showing induction and protection, respectively, of oxidative stress, allowed to suggest that BMT, when well succeeded and under the recommendations, is effective to reduce C26:0 plasma levels and the increased lipid and protein oxidative damage in X-ALD.

1. Introduction

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is the most frequent peroxisomal disorder with an estimated frequency of 1:21 000 males that involves mainly the white matter and axons of the central nervous system (CNS), the adrenal cortex and testis [1,2]. Biochemically, this disease is characterized by the accumulation of fatty acids (VLCFA) particularly hexacosanoic acid (C26:0) and tetracosanoic acid (C24:0) in tissues and body fluids [3-4].

X-ALD presents a wide range of phenotypic variability sharing the same defective gene ABCD1 located within the Xq28 region that belongs to ATP-binding cassette (ABC) superfamily of transmembrane transporters and encodes the ALD protein (ALDP) which is located in the peroxisomal membrane [2 5,6]. It is a heterogeneous disease with seven different phenotypes in male patients being that the childhood cerebral form (CCER) and the adrenomyeloneuropathy (AMN) are the most prevalents and with five phenotypes in female carriers - heterozygotes [2,7].

The CCER form manifests symptoms usually from age 4 to 8 years, including visual and auditory disturbances, decreased school performance, adrenal insufficiency, walking difficulties, demyelination and leukodystrophy, which seem to be associated with a strong inflammatory reaction in the CNS, particularly in the white matter. The disease progresses rapidly and patients usually die approximately 2 to 5 years after symptom onset [7].

Current treatment options for X-ALD is limited on three modes of therapy and can change as the phenotypes evolve: adrenal hormone replacement, Lorenzo's Oil (LO) therapy and bone marrow transplant (BMT) or hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) [7-9].

So far, bone marrow transplant (BMT) or hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) have been the only known method to halt cerebral demyelination [2,7,9]. The first successful transplant took place in 1990 on an eight-year-old boy reversing his neurological and neuroradiological manifestations and restoring his cognitive functions to normal despite mildly raised levels of VLCFA [5]. In general, it is only recommended

for individuals with mild evidence of brain involvement by magnetic resonance imaging (MRI) but minimal neuropsychological findings (performance Intelligence Quotient (IQ) >80) and normal clinical neurologic examination, because lower IQ levels are related with BMT complications and early death. Further, boys with few neurological findings (MRI Loes Score <10) have a survival probability of 92% after HSCT and seem to have a better long-term neurological outcome [10-12]. The methods is an option for boys and adolescents who are in early stage of cerebral involvement and can provide long-term stabilization and even reversal of symptoms. BMT is not recommended for individuals with severe neurologic and neuropsychological dysfunction (i.e., performance IQ <80) [10,11,13-16].

The lack of effective and curative treatment for X-ALD may probably reflect the fact that the pathophysiology of the brain injury in this disorder is poorly known. In this context, oxidative stress is believed to be an important mediator of neurodegeneration since the CNS is highly susceptible to oxidative damage due to the relatively low activity of antioxidant defenses, high iron content, high lipid content, specially unsaturated fatty acids, and high oxygen consumption [17]. Preliminary results from our laboratory showed a significant increase in lipid peroxidation and a decreased antioxidant defense in symptomatic and asymptomatic X-ALD patients [18-21]. These results are in accordance with some studies *in vitro* and in animal models of X-ALD (knockout mice ABCD1) in which increased oxidative stress has been reported [22-24]. In addition, it has been reported that antioxidants (like vitamin E) reverses the oxidative damage in fibroblasts from X-ALD patients [24].

In the present work, we aimed to evaluate lipid (malondialdehyde content) and protein (sulfhydryl and carbonyl contents) oxidative damage parameters in plasma from X-ALD patients before and after BMT, in order to verify if this treatment is capable to alter the oxidative parameters studied. We also evaluated the plasma concentration of C26:0 from X-ALD patients before and after BMT and correlated plasma C26:0 levels with the oxidative damage parameters investigated.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and controls

In the present study we evaluated different parameters of oxidative stress in plasma from 4 X-ALD patients before BMT (at a “basal time”: diagnosis moment or without any treatment for X-ALD) and after BMT (6 months to 4 years after BMT). The ages and main clinical features of X-ALD patients before and after BMT, as well as other characteristics (donor type, outcome, MRI findings) are presented in Table 1.

The diagnosis of X-ALD was established when increased concentrations of very long chain fatty acids (VLCFA), such as hexacosanoic acid (C26:0), tetracosanoic acid (C24:0) and the ratio C26:0/C22:0 and C24:0/C22:0 were found in plasma [3,25]. The measurements of VLCFA plasma levels at diagnosis and after BMT were performed by gas chromatography in Medical Genetics Service of the Clinical Hospital of Porto Alegre, RS, Brazil [25]. The control group consisted of healthy male individuals with similar ages to the patients (6.33 ± 1.87 years-old, range 4 to 9 years old).

The study was conducted according to the recommendations of the Ethics Committee of the Clinical Hospital of Porto Alegre. Parents of all patients and controls gave informed written consent to participate in the investigation.

2.2. Preparation of plasma

Plasma was separated from whole blood samples obtained from controls (healthy individuals) and from X-ALD patients before and after BMT by venous puncture with heparinized vials. Whole blood was centrifuged at 3000 rpm, plasma was rapidly removed by aspiration and frozen at -80°C until analysis.

2.3. Malondialdehyde (MDA) determination

MDA was measured by high performance liquid chromatography (HPLC) following the method described by Esterbauer and Cheeseman [26], with some modifications. Briefly, 600 μL of trichloroacetic acid 28% and 1.4 mL of distilled water were added to 100 μL of human plasma. Addition of trichloroacetic acid was necessary to precipitate proteins and release the MDA bound to the amino groups of proteins and other amino

compounds. Samples then were centrifugated at 1500 x g for 5 min. After centrifugation, the supernatant was removed and MDA was separated by HPLC, using an amino-phase column analysis with mobile phase acetonitrile, 30mMTris buffer, pH 7.4 (1:9; v/v). The flow rate was 0.5 mL/min and the eluate was monitored at 267nm, the absorption maximum of the enolate anion form of free MDA. The system was calibrated with a standard solution of MDA, which was used for quantification. Results were expressed in μM of MDA.

2.4. Sulphydryl content

This assay is based on the reduction of 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, which in turn become oxidized (disulfide), generating a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm, according to the method described by Aksenov and Markesbery [27]. The sulphydryl content is inversely correlated to oxidative damage to proteins. Results were reported as nmol TNB/mg protein.

2.5. Carbonyl content

Oxidatively modified proteins present an enhancement of carbonyl content [28]. In this paper, carbonyl content was assayed according to the method described by Levine et al. [29] based on the reaction of protein carbonyls with dinitrophenylhydrazine forming dinitrophenylhydrazone, a yellow compound, measured spectrophotometrically at 370 nm. The carbonyl content was calculated using a millimolar absorption coefficient of the hydrazone ($21,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Values of carbonyl content were expressed as nmol carbonyl/ mg protein.

2.6. Plasma C22:0, C24:0 and C26:0 quantification

Plasma docosanoic acid (C22:0), tetracosanoic acid (C24:0) and hexacosanoic acid (C26:0) were analyzed according to the technique of Moser and Moser that use gas chromatography [25]. This laboratorial procedure consisted of the preparation of total lipid extract and after a treatment of this extract with methanolic HCl (3 N) for the formation of fatty acid methyl esters, which were then purified by thin-layer

chromatography. The fatty acid methyl esters purified were extracted with hexane and analyzed by gas chromatography. A Varian gas chromatographer with an HP-5 column (5% methylphenyl silicone, 0.33 μm film thickness, 0.2 mm inner diameter and 25 m in length), a flame ionization detector, a split/splitless injector, and helium as the mobile phase were utilized. C26:0 (hexacosanoic acid) concentration expressed in $\mu\text{mol/L}$ was determined. Heptacosanoic acid (C27:0) was used as internal standard.

2.7. Protein determination

Plasma protein concentrations were measured by the Biuret method [30] from Labtest kit (Labtest Diagnóstica, MG, Brazil) using bovine serum albumin as standard.

2.8. Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard deviation. For the statistical analysis, non-paired Student's *t* test was used to compare results from control and X-ALD before and after BMT and Paired Student's *t* test was used to compare results from X-ALD before and after BMT. Correlations were carried out using the Pearson correlation coefficient. A *p* value of less than 0.05 was considered to be significant. All analysis were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible.

3. Results

In this work we evaluated oxidative stress parameters in plasma of X-ALD patients before and after BMT. The parameters of lipid (MDA content) and protein (sulfhydryl and carbonyl contents) oxidative damage were compared to controls with similar age and same gender.

MDA values, a parameter of lipid peroxidation, were determined in plasma of X-ALD patients before BMT (at a "basal time": diagnosis moment or without any treatment for X-ALD) and after BMT and in plasma of control individuals. Fig. 1 shows that MDA content was significantly increased (321%) in plasma of X-ALD patients before BMT [$t(16) = -5.458$, $p < 0.05$] and 184% after BMT [$t(16) = -3.552$, $p < 0.05$] when compared to controls. It is also observed in Fig. 1 that MDA measurement was significantly reduced

(32%) in plasma of X-ALD after BMT when compared to before BMT group [$t(3)=22.008$; $p < 0.01$]. These results indicate that lipid peroxidation is stimulated in X-ALD patients even after BMT when compared to control group. However, we can observe a significant reduction of MDA levels after BMT when compared to the basal group. We found no significant correlation between MDA values and C26:0 levels in plasma of X-ALD individuals before BMT [$r= -0.381$, $p>0.05$] and after BMT [$r= -0.368$, $p>0.05$].

Next, we evaluated sulfhydryl content, which is a measure of protein oxidative damage. Sulfhydryl content was determined in plasma of X-ALD patients before and after BMT and in plasma of controls subjects. We observed a significant reduction of sulfhydryl content (56%) in plasma of X-ALD patients before BMT compared to controls [$t(8)= 2.518$, $p<0.05$] indicating protein oxidative damage (Fig.2). Fig.2 also showed that this measurement was increased (122%) in plasma of these patients after BMT as compared to the basal group [$t(3)= -11.281$; $p < 0.01$]. We observed a significant inverse correlation between sulfhydryl content measurement and C26:0 levels in plasma of X-ALD individuals at basal time [$r= -0.991$, $p< 0.01$] (Fig. 3) and no correlation between sulfhydryl content measurement and C26:0 in plasma of X-ALD individuals after BMT [$r=0.808$, $p>0.05$].

We also examined the plasma carbonyl content from X-ALD patients before and after BMT and controls (Fig. 4). In contrast, we found no significant differences in this parameter from X-ALD patients before [$t(8)= -2.011$, $p>0.05$] and after BMT [$t(8)= 0.578$, $p>0.05$] as compared to controls. However, we observed a significant reduction of carbonyl content in plasma of X-ALD patients after BMT compared to the before BMT group [$t(3)= 3.481$, $p<0.05$]. We found no significant correlation between carbonyl values and C26:0 levels in plasma of X-ALD individuals before BMT [$r= -0.718$, $p>0.05$] and after BMT [$r= -0.295$, $p>0.05$].

Finally, Fig. 5 illustrates the plasma concentration of C26:0 from X-ALD patients before and after BMT and controls. It can be observed that before BMT there was a significant increase of C_{26:0} plasma levels (279%) [$t(32)= -3.786$; $p < 0.05$] when compared to controls. Fig. 5 shows also no significant difference between C26:0 plasma levels after BMT [$t(32)= -1.640$; $p > 0.05$] and controls. An important reduction

of hexacosanoic acid plasma concentration (46%) was verified in X-ALD patients after BMT when compared to before BMT C26:0 levels.

4. Discussion

X-ALD is a neurodegenerative and endocrine disorder caused by genetic defects in the ABCD1 gene that encodes a peroxisomal membrane protein (ALDP) [2]. Affected patients accumulate VLCFA in tissues and body fluids [2,3]. Neurological symptoms and brain abnormalities are characteristic of patients with X-ALD [2]. At the present moment, there is no satisfactory and effective therapy for X-ALD [31]. Current treatment options for X-ALD is limited being that bone marrow transplant (BMT) or hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is considered the most efficacious [7,9].

Although very little is known about the pathomechanisms involved in the tissue damage of this disorder, it is feasible that accumulation of these fatty acids may contribute to the pathogenesis of X-ALD [2]. As it was assumed that the excess of VLCFAs was toxic to myelin and to adrenal cortex and testis, several attempts were made to lower the plasma concentrations of VLCFAs [2]. Dietary treatment with a 4:1 mixture of glyceroltrioleate and glyceroltrierucate (LO) lowers and almost normalizes plasma VLCFA concentrations (particularly the C26:0 levels), but did not ameliorate or alter the rate of the rapid progression of neurological symptoms in the cerebral variants of X-ALD [7]. So far, bone marrow transplant (BMT) or hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) have been the only known method to halt cerebral demyelination of X-ALD in boys and results in long-term and good quality of life, provided that the procedure is performed at an early stage of the condition. The mechanism by which BMT is able to halt the demyelinating process is not known [7,9,11].

Oxidative damage is a common feature of neurodegenerative disease, with a proven role in the pathology of diseases, such as amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease [17,32,33]. Evidence of the contribution of oxidative damage to the neurodegenerative cascade of X-ALD has been reported in post-mortem brain from patients with cerebral clinical forms of the disease [34]. Vargas et al. in 2004 found

that various parameters of oxidative stress are altered in plasma, erythrocytes and fibroblasts from patients with X-ALD [18]. Deon et al. in 2006 found that treatment with Lorenzo's oil does not protect or attenuate the production of free radicals in X-ALD patients with and without symptoms [19]. In subsequent studies, it was observed that there was an increase in lipid peroxidation, a decrease in total antioxidant reactivity (TAR) and total antioxidant status (TAS) in different groups of symptomatic and asymptomatic X-ALD patients [20,21]. A study using non-stimulated X-ALD-derived lymphoblasts indicated that these cells accumulated VLCFA and synthesized higher levels of free radicals (NADPH oxidase activity) and that oxidative imbalance induces changes in the X-ALD cell membrane functions/properties [35].

The absence of effective treatment for X-ALD may probably reflect the fact that the pathophysiology of the brain injury in this disorder is poorly known. It is important to emphasize that oxidative stress is believed to play an important role in the neuropathology and is an important mediator of neurodegeneration. So, in the present study, we aimed to investigate lipid and protein oxidative damage in X-ALD patients before and after BMT in order to evaluate whether this treatment is able to alter oxidative stress in this disease.

We first observed a marked increase of MDA, an end product of membrane fatty acid peroxidation [17] in both groups of X-ALD patients studied, but particularly before BMT. Lipid peroxidation is capable to induce changes of integrity, fluidity, permeability and functional loss of biomembranes generating potentially toxic products [17]. These results are in accordance with previous studies showing the involvement of lipid peroxidation in the pathophysiology of X-ALD [18,20,21,34]. Furthermore, although plasma MDA concentration in X-ALD after BMT was significantly higher than in controls, the MDA levels were lower than in before BMT, indicating that lipid peroxidation is induced in X-ALD and that BMT attenuated this potentially pathologic process.

In this study, we also investigate the parameters of protein oxidative damage: carbonyl formation and sulfhydryl oxidation. The decrease in sulfhydryl (SH) content reflects the existence of oxidative damage to proteins since thiol/ sulfhydryl group is a

physiological free radical scavenger in cells and biological fluids and may scavenge oxidants which initiate peroxidation, thus sparing lipids from attack [27,36]. It should be stressed that most cellular sulfhydryl groups are protein-bound and that oxidation of these groups from specific cysteine residues to form disulfide, potentially alters the redox state of proteins, leading to their inactivation [27]. Furthermore, alterations of protein structure by oxidants may affect the function of receptors, enzymes and transport proteins, resulting in a partial or complete loss of protein functionality [29,37]. Carbonyl groups are produced by oxidation of protein side chains, especially proline, arginine, lysine and threonine [28]. So these different measurements reflect different mechanisms of protein oxidation.

We observed, in the present work, a significant decrease in sulfhydryl content in plasma of X-ALD patients before BMT compared to the control group. We also verified a significant increase in the levels of sulfhydryl content after BMT, indicating that BMT could reverse this protein oxidative damage process. In contrast, we observed no significant differences in carbonyl content in plasma from X-ALD patients before and after BMT as compared to controls. However, we observed that plasma carbonyl formation were 47% increased before BMT and 18% reduced after BMT, respectively, when compared to control group. Besides, we observed a significant reduction of carbonyl content in plasma of X-ALD patients after BMT compared to the moment before BMT. Finally, despite that sulfhydryl content and carbonyl formation reflect different mechanisms of protein oxidation, these results are in accordance at least in part with Fourcade et al. [24] that verified that oxidative damage to proteins occurs in X-ALD fibroblasts.

Approximately, two thirds of sulfhydryl groups are bound to proteins, whereas one third is a component of small molecules such as glutathione [38]. On the other hand, since protein-bound sulfhydryl groups can be reversibly oxidized by reactive species, it has been suggested that these groups represent a potential active redox antioxidant pool in the cellular defense against oxidative stress. So reduction of sulfhydryl content in X-ALD patients may reflect protein oxidation, or otherwise a diminution of antioxidant defenses, which was restored in X-ALD patients after BMT.

The importance of normalizing fasting plasma C26:0 levels in boys with cerebral X-ALD after BMT remains questionable, since there were no apparent relationships between plasma VLCFA levels and neurologic, neuropsychological, disability, and neuroradiologic outcomes [2,13]. Shapiro et al. in 2000 observed an increase in plasma C26:0 levels immediately after BMT and that decreased within 2 years to reach the mean level of the heterozygote. These authors verified that plasma C26:0 levels remained essentially unchanged afterwards [13]. In our study, the 4 X-ALD patients presented significant high plasma C26:0 levels before BMT compared to controls and, after BMT, these concentrations were strongly reduced in the patients (46%) compared to before BMT. Therefore, plasma C26:0 levels were drastically reduced in our X-ALD patients after BMT, indicating the occurrence of this favorable biochemical response, in average achieving heterozygote C26:0 levels (heterozygote levels: 0.66 to 2.20 $\mu\text{mol/L}$).

We correlated C26:0 plasma levels from X-ALD patients with the oxidative stress parameters examined before and after BMT. We observed a significant negative correlation between sulfhydryl content measurement, a biomarker of protein damage and of antioxidant status, and C26:0 in plasma of X-ALD individuals before BMT. Interestingly, we did not find any significant correlation between oxidative damage parameters (MDA content and carbonyl content) and C26:0 plasma levels before and after BMT. These data, allied to other studies that evidenced that C26:0 accumulation results in lipid and protein oxidative damage [24, 34], suggest a potential link between C26:0 accumulation and oxidative stress and pathogenesis of X-ALD.

Taken together, the data obtained from plasma of X-ALD patients before and after BMT showing induction and protection, respectively, of oxidative stress, allowed to suggest that BMT, when well succeeded and under the recommendations, is effective to reduce the increased lipid peroxidation and protein oxidative damage in these patients which were in an early stage of brain involvement with minimal neurological findings and have presented a stable outcome (table 1). It is important to emphasize that to our knowledge, this is the first study to investigate lipid (malondialdehyde content) and protein (sulfhydryl and carbonyl content) oxidative damage parameters

in plasma of transplanted X-ALD patients.

So far, bone marrow transplant (BMT) or hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) have been the only known method to halt cerebral demyelination [2,7,9]. It should be emphasized that hematopoietic stem cell gene therapy could be a potential future therapy for X-ALD [39]. The indication of BMT in X-ALD remains difficult, given that the prediction of disease evolution still entirely relies upon clinical features (age of the patient, the extent and recent evolution of brain lesions) [39]. BMT is not recommended for individuals with severe neurologic and neuropsychological dysfunction (i.e., performance IQ <80) because lower IQ levels are related with BMT complications and early death [10,11,13-16]. Tolar et al. in 2007 showed that administration of the antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC) before and after HSCT in three boys with advanced ALD whose neurologic status and brain radiographic findings were stabilized resulted in the survival of a disease process that would be expected to be fatal. They concluded that NAC merits investigation as therapeutic strategy for patients with advanced ALD and has the potential to change the lethal disease to a condition amenable to treatment with BMT [40]. More recently, Orchard et al. in 2011 observed highly significant elevations of chitotriosidase activity, an enzyme produced by activated monocytes and macrophages which is incremental and related to inflammation, in patients with active CCER and suggested that these levels predict prognosis of patients with CCER undergoing transplantation [41].

Our results should be confirmed with more research with a larger number of patients under BMT treatment. If these results are confirmed and together with previous findings we could presume that oxidative stress and C26:0 levels accumulation may act synergistically with other underlying mechanisms involved in the pathophysiology of the tissue damage found in X-ALD patients. Yet, since so far BMT for X-ALD has been proven to be successful, it is tempting to speculate that the administration of antioxidants should be considered as a potential adjuvant therapy for patients affected by X-ALD who had undergone BMT.

In conclusion, the present study reinforces the hypothesis that lipid peroxidation and protein damage are induced in plasma of X-ALD patients and, in addition,

demonstrates that BMT treatment is capable to reduce this pathogenic process. Considering that oxidative stress is probably involved in the pathophysiology of X-ALD and BMT has been the only known therapy to halt cerebral demyelination, these results reinforce the indication of this treatment for boys and adolescents who are in early stage of cerebral involvement, since it can provide long-term stabilization and even reverse symptoms.

5. Conflict of interest disclosure

The authors declare that there is no conflict of interest disclosure associated with this manuscript.

6. Acknowledgments

This study was supported by CAPES, CNPq, FAPERGS, PROPESP/UFRGS and FIPE/HCPA - Brazil.

7. References

- [1] L. Bezman, A.B. Moser, G.V. Raymond, P. Rinaldo, P.A. Watkins, K.D. Smith, N.E. Kass, H.W. Moser, Adrenoleukodystrophy: incidence, new mutation rate, and results of extended family screening, *Ann. Neurol.* 49 (2001) 512-517.
- [2] H.W. Moser, K.D. Smith, P.A. Watkins, J. Powers, A.B. Moser, X-linked adrenoleukodystrophy, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eight ed., McGraw-Hill Inc., New York, 2001, pp.3257-3301.
- [3] A.B. Moser, N. Kreiter, L. Bezman, S. Lu, G.V. Raymond, S. Naidu, H.W. Moser, Plasma very long chain fatty acids in 3000 peroxisome disease patients and 29,000 controls, *Ann Neurol.* 45 (1999)(1) 100-110.
- [4] H.W. Moser, G.V. Raymond, P. Dubey, Adrenoleukodystrophy—new approaches to a neurodegenerative disease, *JAMA*, 294 (2005) 3131–3134.
- [5] H.W. Moser, Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy, *Brain*, 120 (1997) 1485-1508.
- [6] B.M. Van Geel, J. Assies, R.J. Wanders, P.G. Barth., X-linked adrenoleukodystrophy: clinical presentation, diagnosis and therapy, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 63 (1997)(1) 4-14.
- [7] H.W. Moser, Therapy of X-linked adrenoleukodystrophy, *Neuro Rx.* 3 (2006) 246–253.
- [8] H.W. Moser, G.V. Raymond, S.E. Lu, L.R. Muenz, A.B. Moser, J. Xu, R.O. Jones, D.J. Loes, E.R. Melhem, P. Dubey, L. Bezman, N.H. Brereton, A. Odone, 2005a. Follow-up of 89 asymptomatic patients with adrenoleukodystrophy treated with Lorenzo's oil, *Arch. Neurol.* 62 (2005) (7) 1073–1080.
- [9] J. Berger, J. Gärtner, X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, biochemical and pathogenetics aspects, *Biochim. Biophys. Acta*, 1763 (2006) 1721–1732.

- [10] D.J. Loes, A. Fatemi, E.R. Melhem, N. Gupte, L. Bezman, H.W. Moser, G.V. Raymond, Analysis of MRI patterns aids prediction of progression in X-linked adrenoleukodystrophy, *Neurology* 61 (2003) 369-374.
- [11] C. Peters, L.R. Charnas, Y. Tan, R.S. Ziegler, E.G. Shapiro, T. DeFor, S.S. Grewal, P.J. Orchard, S.L. Abel, A. Goldman, N.K. Ramsay, K.E. Dusenbery, D.J. Loes, L.A. Lockman, S. Kato, P.R. Aubourg, H.W. Moser, W. Krivit, Cerebral X-linked adrenoleukodystrophy: the international hematopoietic cell transplantation experience from 1982 to 1999, *Blood*, 104(2004) (3) 881-888.
- [12] D. Beam, M.D. Poe, J.M. Provenzale, P. Szabolcs, P.L. Martin, V. Prasad, S. Parikh, T. Driscoll, S. Mukundan, J. Kurtzberg, M.L. Escolar, Outcomes of unrelated umbilical cord blood transplantation for X-linked adrenoleukodystrophy, *Biol Blood Marrow Transplant.* 13 (2007)(6) 665-674.
- [13] E. Shapiro, W. Krivit, L. Lockman, I. Jambaqué, C. Peters, M. Cowan, R. Harris, S. Blanche, P. Bordigoni, D. Loes, R. Ziegler, M. Crittenden, D. Ris, B. Berg, C. Cox, H. Moser, A. Fischer, P. Aubourg, Long-term effect of bone-marrow transplantation for childhood-onset cerebral X-linked adrenoleukodystrophy, *Lancet*, 356 (2000) (9231) 713-8.
- [14] M. Baumann, G.C. Korenke, A. Weddige-Diedrichs, E. Wilichowski, D.H. Hunneman, B. Wilken, K. Brockmann, T. Klingebiel, D. Niethammer, J. Kuhl, W. Ebell, F. Hanefeld, Haematopoietic stem cell transplantation in 12 patients with cerebral X-linked adrenoleukodystrophy, *Eur J Pediatr.* 162 (2003) 6-14.
- [15] A. Mahmood, P. Dubey, H.W. Moser, A. Moser, X-linked adrenoleukodystrophy: therapeutic approaches to distinct phenotypes, *Pediatr. Transplant*, 9 Suppl 7 (2005) 55-62.
- [16] I.B. Resnick, A. Abdul Hai, M.Y. Shapira, M. Bitan, E. Hershkovitz, A. Schwartz, M. Ben-Harush, R. Or, S. Slavin, J. Kapelushnik, Treatment of X-linked childhood cerebral adrenoleukodystrophy by the use of an allogeneic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning regimen, *Clin. Transplant*, 19 (2005) 840-847.
- [17] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge (Eds.), *Free radicals in Biology and Medicine*, 4ed., Oxford University Press, Oxford, 2007, 704 pages.
- [18] C.R. Vargas, M. Wajner, L.R. Sirtori, L. Goulart, M. Chiochetta, D. Coelho, A. Latini, S. Llesuy, A. Bello'-Klein, R. Giugliani, M. Deon, C.F. Mello, Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy, *Biochim. Biophys. Acta.* 1688 (2004) 26-32.
- [19] M. Deon, M. Wajner, L.R. Sirtori, D. Fitarelli, D. Coelho, A. Sitta, A.G. Barschak, G. C. Ferreira, A. Haeser, R. Giugliani, C.R. Vargas, The effect of Lorenzo's oil on oxidative stress in X-linked adrenoleukodystrophy, *J Neurol Sci.*, 247 (2006) 157-164.
- [20] M. Deon, A. Sitta, A.G. Barschak, D.M. Coelho, M. Pigatto, G.O. Schmitt, H.Y. Wanderley, L.B. Jardim, R. Giugliani, M. Wajner, C.R. Vargas, Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy, *Int. J. Dev. Neurosci.*, 25 (2007) 441-444.
- [21] M. Deon, A. Sitta, A.G. Barschak, D.M. Coelho, T. Terroso, G.O. Schmitt, H.Y. Wanderley, L.B. Jardim, R. Giugliani, M. Wajner, C.R. Vargas, Oxidative stress is induced in female carriers of X-linked adrenoleukodystrophy, *J. Neurol. Sci.* 266 (2008) 79-83.
- [22] A. Di Biase, R. Benedetto, C. Fiorentini, S. Travaglione, S. Salvati, L. Attorri, D. Pietraforte, Free radical release in C6 glial cells enriched in hexacosanoic acid: implication for X-linked adrenoleukodystrophy pathogenesis, *Neurochem. Int.*, 44 (2004) 215-221.
- [23] A. Di Biase, R. Benedetto, S. Salvati, L. Attorri, F. Leonardi, D. Pietraforte, 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 (2005)(2) 215-223.
- [24] S. Foucarde, J. López-Erauskin, J. Galino, C. Duval, A. Naudi, M. Jove, S. Kemp, F. Villarroya, I. Ferrer, R. Pamplona, M. Portero-Otin, A. Pujol, Early oxidative damage underlying neurodegeneration in X-adrenoleukodystrophy, *Hum. Mol. Genet.*, 17 (2008) 1762-1773.
- [25] H.W. Moser, A.B. Moser, Measurement of saturated very long chain fatty acid in plasma. In: F.A. Hommes (Ed.), *Techniques of Diagnostic Human Biochemical Genetics*, Wiley, New York, 1991, pp. 177–191.
- [26] H. Esterbauer, K.H. Cheeseman, Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal, *Meth. Enzymol.*, 186 (1990) 407-421.
- [27] M.Y. Aksenov, W.R. Markesbery, Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.*, 302 (2001) 141–145.
- [28] E.R. Stadtman, R.L. Levine, Free-radical mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins, *Amino Acids* 25 (2003) 207–218.
- [29] R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A.G. Lenz, B.W. Ahn, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.*, 186 (1990) 464–478.
- [30] A.G. Gornall, C.J. Bardawill, M.M. David, Determination of serum proteins by means of the biuret reaction, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 751-766.
- [31] H.W. Moser, D.J. Loes, E.R. Melhem, G.V. Raymond, L. Bezman, C.S. Cox, X-linked adrenoleukodystrophy: overview and prognosis as a function of age and brain magnetic resonance imaging abnormality. A study involving 372 patients, *Neuropediatrics*, 31 (2000) 227–239.
- [32] J.D. Rothstein, Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis, *Ann. Neurol.*, 65 (2009) (Suppl. 1) S3–S9.
- [33] C. Zhou, Y. Huang, S. Przedborski, Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1147 (2008) 93–104.
- [34] J.M. Powers, Z. Pei, A.K. Keinzer, R. Deering, A.B. Moser, H.W. Moser, P.A. Watkins, K.D. Smith, Adrenoleukodystrophy: oxidative stress of mice and men, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 64 (2005)(12) 1067-1079.
- [35] T. Uto, M.A. Contreras, A.G. Gilg, I. Singh, Oxidative imbalance in nonstimulated X-adrenoleukodystrophy-derived lymphoblasts, *Dev. Neurosci.*, 30 (2008) 410-418.
- [36] B. Deuticke, The role of membrane sulfhydryls in passive, mediated transport processes and for the barrier functions of the erythrocyte membrane, *Membrane Biochem.*, 6 (1986) (4) 309-326.
- [37] B. Halliwell, M. Whiteman, Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.*, 142 (2004) 231-255.
- [38] R. Requejo, T.R. Hurd, N.J. Costa, M.P. Murphy, Cystein residues exposed on protein surfaces are dominant intramitochondrial thiol and may protect against oxidative damage, *FEBS J.*, 277 (2010) 1465-1480.
- [39] N. Cartier, P. Aubourg, Hematopoietic stem cell transplantation and hematopoietic stem cell therapy in X-linked adrenoleukodystrophy, *Brain Pathology* 20 (2010) 857-862.

- [40] J. Tolar, P.J. Orchard, K.J. Bjoraker, R.S. Ziegler, E.G. Shapiro, L. Charnas, N-acetyl-L-cysteine improves outcome of advanced cerebral adrenoleukodystrophy, *Bone Marrow Transplantation*, 39 (2007) 211-215.
- [41] P.S. Orchard, T. Lund, W. Miller, S.M. Rothman, G. Raymond, D. Nascene, L. Basso, J. Cloyd, J. Tolar, Chitotriosidase as a biomarker of cerebral adrenoleukodystrophy, *J. Neuroinflammation* 8 (2011) 144.

Figure 1. Malondialdehyde (MDA) content in plasma from X-ALD patients (n=4) before and after BMT and controls individuals (n=14). Data represent the mean \pm SD. Difference from control, * $p < 0.05$ (Student's *t* test for unpaired samples). Difference between before BMT and after BMT groups, ^{##} $p < 0.01$ (Student's *t* test for paired samples).

Figure 2. Sulfhydryl content in plasma from X-ALD patients (n=4) before and after BMT and controls individuals (n=6). Data represent the mean \pm SD. Difference from control, * $p < 0.05$ (Student's *t* test for unpaired samples). Difference between before BMT and after BMT groups, [#] $p < 0.01$ (Student's *t* test for paired samples).

Figure 3. Correlation between sulfhydryl content and C26:0 levels in plasma from X-ALD patients (n=4) before BMT.

Figure 4. Carbonyl content in plasma from X-ALD patients (n=4) before and after BMT and control individuals (n=6). Data represent the mean \pm SD. No difference from control, $p > 0.05$ (Student's *t* test for unpaired samples). Difference between before BMT and after BMT groups, [#] $p < 0.05$ (Student's *t* test for paired samples).

Figure 5. C26:0 plasma levels from X-ALD patients (n=4) before and after BMT and control individuals (n=30). The broken lines indicate the normal ranges. Data represent the mean \pm SD. Difference from control, * $p < 0.05$ (Student's *t* test for unpaired samples). No difference between before BMT and after BMT groups, $p > 0.05$ (Student's *t* test for paired samples).

Figure 1

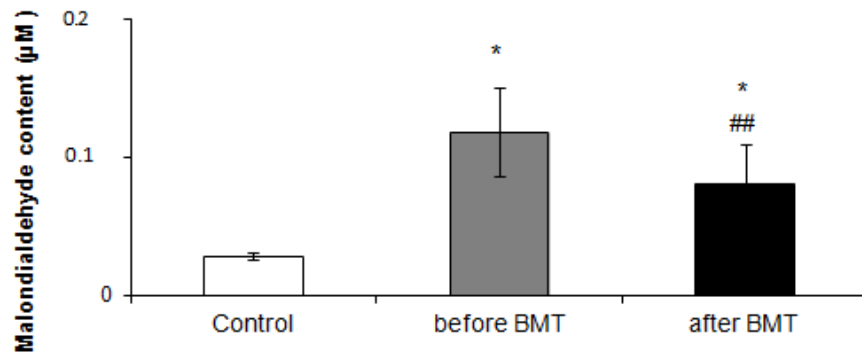


Figure 2

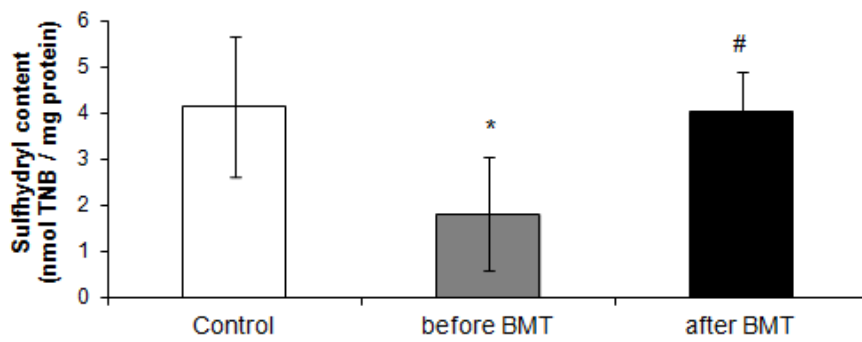


Figure 3

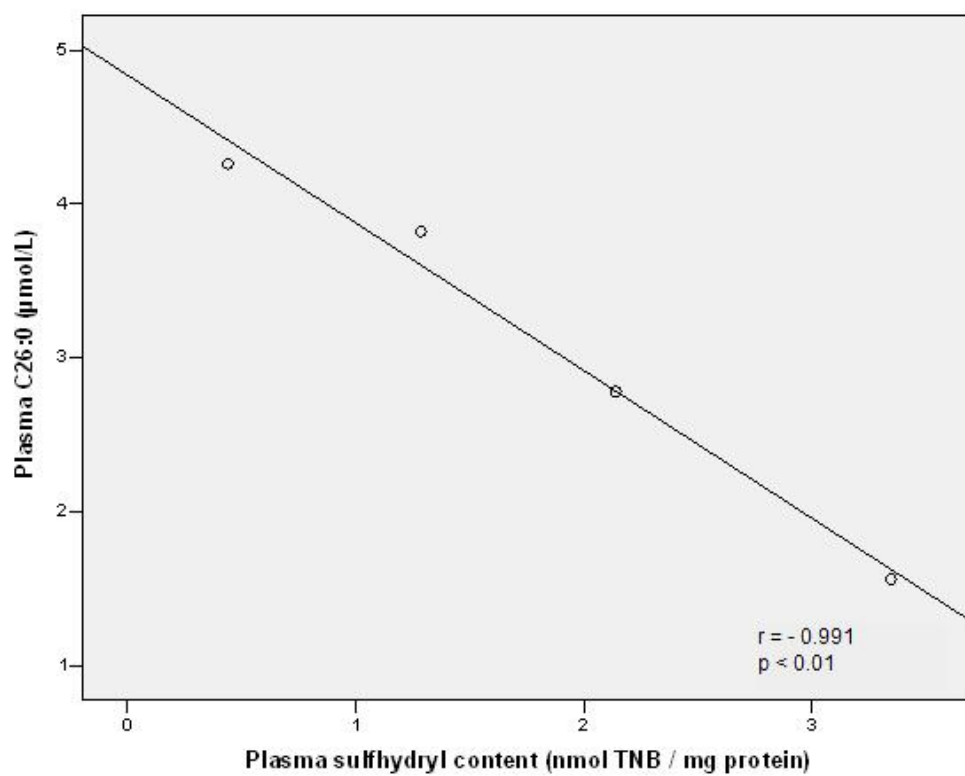


Figure 4

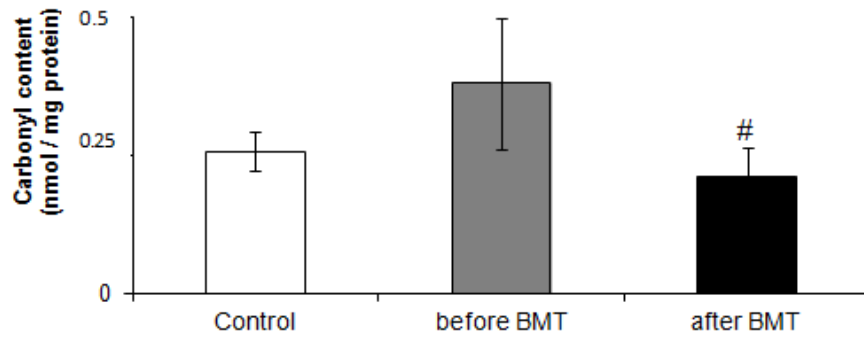


Figure 5

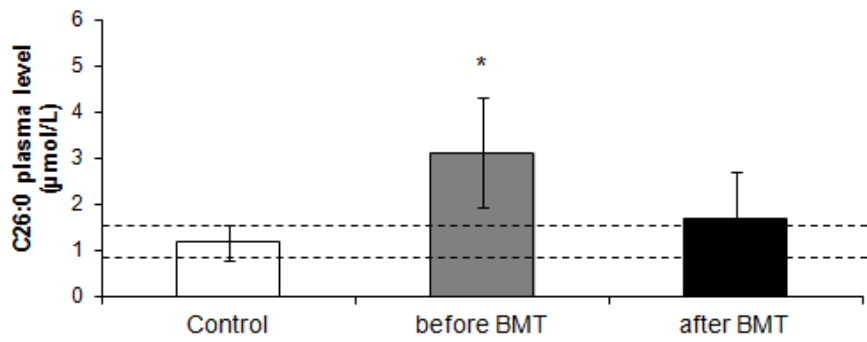


Table 1 – Age and main clinical characteristics of the X-ALD patients before and after BMT.

<i>Patient</i>	<i>Phenotype, clinical features, MRI findings and age at diagnosis.</i>	<i>Clinical features, MRI findings and age at BMT.</i>	<i>Donor type</i>	<i>Age at time of oxidative stress analysis “before BMT” (years)</i>	<i>Age at time of oxidative stress analysis “after BMT” (years)</i>	<i>Outcome</i>
1	Addison-only or pre-symptomatic. Adrenal Insufficiency. Normal neurological examination. Age at diagnosis: 5 years.	Mild hyperactivity. Loes score of 2. MRI: lesions in basal ganglia and pyramidal tracts. Age at BMT: 6 years.	unrelated	5	8	Stable
2	Addison-only or pre-symptomatic. Adrenal Insufficiency MRI: normal Age at diagnosis: 8 years.	Normal neurological examination PIQ 103 and Loes score of 2. MRI: lesions in corticospinal tracts. Age at BMT: 9 years 5months.	related	8	9y11m	Stable
3	Addison-only or pre-symptomatic. Adrenal Insufficiency MRI: normal Age at diagnosis: 4 years.	Normal neurological examination. Loes score of 1. MRI lesions in basal ganglia. Age at BMT: 6 years.	unrelated	4	7	Stable
4	CCER. Low school performance. MRI: occipital involvement. Age at diagnosis: 11 years.	Mild distal paresis and cerebellar ataxia in left arm. PIQ 91 and Loes score of 7,5. MRI: bilateral, occipital involvement. Age at BMT: 13 years.	unrelated	12	17	Stable

Abbreviations: CCER: childhood cerebral form; BMT: bone marrow transplantation; MRI: magnetic resonance

3.2 Capítulo 2 – artigo 02

Em processo de publicação

Em processo de publicação

Em processo de publicação

Em processo de publicação

Em processo de publicação

Em processo de publicação

Em processo de publicação

Em processo de publicação

Em processo de publicação

Em processo de publicação

Em processo de publicação

Em processo de publicação

Em processo de publicação

Em processo de publicação

Em processo de publicação

Em processo de publicação

Em processo de publicação

Em processo de publicação

4. DISCUSSÃO

Os EIM são distúrbios metabólicos de origem genética, em que a deficiência na atividade de uma proteína provoca o bloqueio de uma rota bioquímica e, com isso, o acúmulo de produtos tóxicos. Este bloqueio, dependendo da via afetada, repercute clinicamente de maneira bastante diversificada no indivíduo, podendo ser de sintomatologia muito severa e até mesmo letal (Scriver et al., 2001). De acordo com Saudubray e Charpentier (2001), os EIM podem ser classificados em três grandes grupos, de acordo com a área do metabolismo afetada. Um destes grupos é composto pelos distúrbios na síntese ou degradação de macromoléculas complexas, que apresentam sintomas permanentes, progressivos e não relacionados à ingesta alimentar. Fazem parte deste grupo as doenças peroxissomais e as doenças lisossômicas de depósito. A X-ALD é a desordem mais frequente dentre as doenças peroxissomais (Bezman et al., 2001).

A X-ALD é uma doença hereditária que compromete principalmente a substância branca e os axônios do SNC e o córtex adrenal, levando a desmielinização e à insuficiência adrenal (Bezman et al., 2001; Moser et al., 1992). Esta patologia está associada ao acúmulo de AGCML, que são quase sempre saturados, sem ramificações, incluindo principalmente os de cadeia de 26 carbonos (ácido hexacosanóico, C_{26:0}) e de 24 carbonos (ácido tetracosanóico, C_{24:0}) (Moser et al., 1992; Moser, 1997; Moser et al., 2001). Os AGCML acumulam-se em fluidos biológicos e tecidos na X-ALD devido a um defeito na degradação dessas substâncias, que normalmente ocorre nos peroxissomos (Moser et al., 2001). Muito pouco se sabe sobre a fisiopatologia e os mecanismos envolvidos no dano tecidual desta doença (Moser et al., 2001).

Nos últimos anos têm crescido evidências que relacionam EIM com manifestações neurológicas ao estresse oxidativo, sugerindo que a excessiva geração de radicais livres e o consequente dano oxidativo contribuam para

disfunção neurológica nessas doenças (Colomé et al., 2000; Wajner et al., 2004). Estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo e o dano oxidativo estão induzidos em pacientes com fenilcetonúria (Sierra et al., 1998; Sirtori et al., 2005; Sitta et al., 2006; Sitta et al., 2009), com a doença da urina do xarope do bordo (Barschak et al., 2006; Barschak et al., 2008) e com acidemias propiônica e metilmalônica (Ribas et al., 2010a; Ribas et al., 2010b). Da mesma forma, evidências da contribuição do estresse oxidativo têm sido demonstradas em tecido cerebral *post mortem*, em amostras de sangue e fibroblastos de pacientes X-ALD (Vargas et al., 2004; Powers et al., 2005; Deon et al., 2006; Deon et al., 2007; Deon et al., 2008b), bem como em estudos *in vitro* e em modelo animal para X-ALD (Di Biase et al., 2004; Di Biase et al. 2005; Uto et al., 2008; Yanagisawa et al., 2008; Foucarde et al., 2008, Foucarde et al., 2010, López-Euraskin et al., 2011; Galino et al., 2011).

Apesar das pesquisas e dos esforços em andamento, o tratamento para X-ALD é ainda considerado experimental, não havendo nenhuma terapia totalmente satisfatória. Várias opções de tratamentos têm sido utilizadas na tentativa de atingir os três principais objetivos de um tratamento bem sucedido: estabilizar a insuficiência adrenal, diminuir a concentração de AGCML no plasma e diminuir a desmielinização no cérebro (Moser et al., 2001). Um dos tratamentos preconizados para a X-ALD, dietoterapia com óleo de Lorenzo (OL) (dieta restrita de AGCML + OL), resulta numa diminuição tecidual importante dos AGCML acumulados, mostrando-se clinicamente eficaz em portadores assintomáticos, porém, apresenta pouco benefício clínico aos pacientes afetados neurologicamente, não atuando sobre o processo neuroinflamatório (Moser et al., 2001). Além disso, foi demonstrado que o tratamento com OL não protege ou atenua a produção de radicais livres em plasma e eritrócitos de pacientes sintomáticos e assintomáticos com X-ALD (Deon et al., 2006). Já o TCH é o método mais efetivo atualmente para a terapia da X-ALD, nos casos em que a forma cALD for detectada em estágios iniciais da doença, sendo o único método que melhora a desmielinização cerebral (Moser et al., 2001). Por isso, no

presente estudo, avaliamos os parâmetros de dano oxidativo a lipídios e a proteínas em pacientes com X-ALD antes e após o TCH com a finalidade de verificar se este tratamento seria capaz de alterar parâmetros de dano oxidativo, uma vez que não há dados na literatura sobre esse tipo de investigação.

O dano oxidativo pode ser demonstrado através do aumento de produtos finais da peroxidação lipídica, de produtos de oxidação de bases do DNA e dano oxidativo às proteínas (Halliwell, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007). A peroxidação lipídica é geralmente considerada um processo prejudicial, que pode induzir modificações estruturais, como alterações na permeabilidade, fluidez, integridade e perda funcional de biomembranas e lipoproteínas, e está geralmente associada a mau funcionamento celular, gerando produtos potencialmente tóxicos (Halliwell e Gutteridge, 2007). Neste trabalho, observamos em pacientes submetidos ao transplante, níveis aumentados de MDA, produto final da peroxidação de ácidos graxos de membrana (Halliwell e Gutteridge, 2007), antes e após o procedimento, em comparação ao grupo controle. No entanto, houve uma redução significativa nos valores de MDA após o transplante em comparação aos níveis encontrados antes do procedimento, sugerindo uma atenuação deste processo potencialmente patológico pelo TCH.

Neste estudo, investigamos também parâmetros de dano oxidativo a proteínas: formação de grupos carbonilas e oxidação de grupos sulfidrilas. A diminuição no conteúdo de sulfidrilas (SH) reflete a existência de dano oxidativo a proteínas uma vez que o grupo sulfidrilas é um capturador fisiológico de radicais livres em células e fluidos biológicos e pode capturar oxidantes que iniciam a peroxidação, poupando assim os lipídios do ataque oxidativo (Aksenov e Markesbery, 2001, Deuticke, 1986). Ressalta-se que a maioria dos grupos sulfidrilas celulares são ligados às proteínas e que a oxidação desses grupos a partir de resíduos de cisteína formando dissulfeto, potencialmente altera o estado redox das proteínas, podendo levar à sua inativação (Aksenov e Markesbery, 2001). Além disso, alterações da estrutura da proteína por oxidantes pode afetar a função dos receptores, enzimas e proteínas de transporte, resultando em uma

perda parcial ou completa de funcionalidade de proteínas (Halliwell e Whiteman, 2004, Levine et al., 1990). Grupos carbonilas são produzidos pela oxidação das cadeias laterais de proteínas, especialmente nos resíduos de prolina, lisina, arginina e treonina (Stadtman e Levine, 2003). Então, essas diferentes medidas refletem diferentes mecanismos de oxidação de proteínas.

Observamos neste estudo uma diminuição significativa no conteúdo de sulfidrilas no plasma de pacientes X-ALD antes do transplante em comparação ao grupo controle. Também verificamos um aumento significativo nos níveis do conteúdo de sulfidrilas após o TCH, indicando que este procedimento poderia reverter o dano oxidativo às proteínas. Aproximadamente dois terços dos grupos sulfidrilas estão ligados às proteínas, enquanto que um terço é composto de pequenas moléculas como a glutatona (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, o que foi restaurado nos pacientes X-ALD após o TCH.

Por outro lado, não observamos diferenças significativas no conteúdo de carbonila no plasma de X-ALD antes e após o TCH, em comparação aos controles. No entanto, observamos uma tendência ao aumento das carbonilas nos pacientes antes do transplante quando comparado ao grupo controle (47%). Além disso, observamos uma redução significativa no conteúdo de carbonilas no plasma de pacientes X-ALD após o TCH em relação a antes do transplante.

A importância da normalização dos níveis plasmáticos de $C_{26:0}$ em jejum nos meninos com cALD após o transplante permanece questionável, pois não foram encontradas relações aparentes entre os níveis plasmáticos de AGCML e desfechos neurológicos, neuropsicológicos e neurorradiológicos (Moser et al., 2001, Shapiro et al., 2000). Shapiro et al. (2000) observaram um aumento nos níveis plasmáticos de $C_{26:0}$ imediatamente após o TCH e que essa concentração

atingiu os níveis médios apresentados por heterozigotas dentro de 2 anos. Estes autores verificaram que, posteriormente, os níveis plasmáticos de $C_{26:0}$ se mantiveram praticamente inalterados. Em nosso estudo, os pacientes X-ALD apresentavam níveis plasmáticos de $C_{26:0}$ significativamente elevados antes do TCH em comparação com controles e, após o transplante, as concentrações foram fortemente reduzidas nos pacientes (46%) em comparação com os níveis de antes do procedimento. Portanto, os níveis plasmáticos de $C_{26:0}$ foram drasticamente reduzidos nos pacientes por nós analisados após o TCH, indicando a ocorrência de uma resposta bioquímica favorável, atingindo em média os níveis de $C_{26:0}$ de heterozigotas (0,66-2,20 $\mu\text{mol} / \text{L}$).

Correlacionamos os níveis plasmáticos de $C_{26:0}$ de pacientes X-ALD com os parâmetros de estresse oxidativo examinados antes e após o TCH. Observamos uma correlação negativa significativa entre a medida de conteúdo de sulfidrilas, um biomarcador de dano às proteínas e de status antioxidante e os níveis plasmáticos de $C_{26:0}$ de indivíduos X-ALD antes do TCH. Nossos dados, aliados a outros estudos que evidenciam que o acúmulo de $C_{26:0}$ resulta em danos oxidativos a lipídios e a proteínas (Fourcade et al., 2008, Powers et al., 2005), sugerem uma potencial ligação entre a acúmulo de $C_{26:0}$ e estresse oxidativo na patogênese da X-ALD.

Os resultados obtidos a partir do plasma de pacientes X-ALD antes e após o TCH mostram indução e proteção, respectivamente, do estresse oxidativo e permitem sugerir que o transplante de medula óssea ou de células hematopoiéticas, quando está indicado e é bem sucedido, é eficaz em reduzir a peroxidação lipídica e o dano oxidativo às proteínas nos pacientes que encontram-se em um estágio inicial de envolvimento cerebral, com o mínimo de sintomas neurológicos. A indicação de TCH na X-ALD continua difícil, uma vez que a previsão de evolução da doença ainda depende inteiramente de características clínicas do indivíduo (idade do paciente, extensão e evolução recente de lesões cerebrais) (Cartier & Aubourg, 2010). O TCH não é recomendado para indivíduos com disfunções neurológicas e neuropsicológicas

graves (ou seja, o desempenho de QI <80) porque os níveis de QI mais baixo estão relacionados com complicações no procedimento e morte prematura (Loes et al., 2003, Peters et al., 2004, Shapiro et al., 2000, Baumann et al., 2003, Mahmood et al., 2005, Resnick et al., 2005). Tolar et al. (2007) mostraram benefícios da administração do antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC) antes e após o transplante em três meninos com cALD em estágio avançado cujos estados neurológicos e achados radiográficos cerebrais foram estabilizados, resultando na sobrevivência de um processo de doença que provavelmente seria fatal. Eles concluíram que a NAC merece maior investigação como estratégia terapêutica para pacientes com cALD avançada e tem potencial para mudar a condição de doença letal a uma condição que pode ser corrigida através do TCH. Nossos resultados devem ser confirmados com pesquisas com um número maior de pacientes submetidos ao TCH. Se esses resultados forem confirmados e, juntamente com resultados anteriores (Di Biase et al., 2004, Di Biase et al., 2005, Vargas et al., 2004, Powers et al., 2005, Deon et al., 2006, Deon et al., 2007, Deon et al., 2008b, Uto et al., 2008, Yanagisawa et al., 2008, Foucarde et al., 2008) poderíamos supor que o estresse oxidativo e o acúmulo de C_{26:0} podem atuar sinergicamente com outros mecanismos subjacentes envolvidos na fisiopatologia do dano tecidual encontrada em pacientes X-ALD. No entanto, uma vez que até agora o TCH tem se mostrado bem sucedido no tratamento da X-ALD quando precocemente diagnosticada, é tentador especular que a administração de antioxidantes deve ser considerada como uma terapia adjuvante potencial para os pacientes afetados por X-ALD, inclusive os que forem submetido ao TCH.

O sistema nervoso central é muito vulnerável a danos mediados por espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, que podem aumentar drasticamente em eventos tais como inflamação. Além disso, no sistema nervoso central o metabolismo oxidativo é muito elevado, há baixos níveis de defesas antioxidantes e altos teores de ferro e de lipídios com uma grande quantidade de ácidos graxos insaturados da membrana (Smith et al., 1999, Halliwell, 2006). Por

tudo isso, a mielina presente nas membranas é um alvo preferencial de espécies reativas de oxigênio, devido à composição lipídica, bem como à alta proporção de proteínas (Smith et al., 1999). Além disso, o dano oxidativo pode atacar a bainha de mielina através de macrófagos diretamente por lipoperoxidação e indiretamente por ativação de proteases e fosfolipases (Halliwell e Gutteridge, 2007). Ainda, oligodendrócitos são mais sensíveis ao ataque oxidativo e/ou nitrativo *in vitro* devido ao seu baixo nível de defesas antioxidantes e alto conteúdo de ferro, o que resultaria *in vivo* em morte celular e, portanto, em desmielinização (Halliwell e Gutteridge, 2007; Reznick e Parker, 1993).

A X-ALD é uma doença peroxissomal desmielinizante que pode se apresentar em uma ampla faixa etária e com diferentes manifestações dependendo da presença e do tipo de achados neurológicos. O fenótipo da X-ALD abrange desde uma doença infantil, bastante severa e de rápida progressão que pode levar a um estado vegetativo e morte em dois anos a partir do primeiro sintoma, até uma paraparesia lentamente progressiva com preservação do intelecto que se manifesta na idade adulta e é compatível com a vida normal, adrenomieloneuropatia (Moser et al., 1992; Moser et al. 2001). A progressão da forma mais grave da X-ALD em meninos se deve a duas fases: fase metabólica caracterizada apenas pelo aumento dos AGCML e uma fase subsequente caracterizada por grave e progressiva doença neuroinflamatória. Embora muito pouco se saiba a respeito da fisiopatologia e dos mecanismos envolvidos no dano tecidual desta doença e tão pouco sobre o que desencadeia a transição da forma assintomática ou pouco sintomática (forma doença de Addison) para a forma cerebral, é viável que o acúmulo dos AGCML e a resposta inflamatória possam contribuir com a patogênese da X-ALD (Moser et al., 2001). Desta forma, no presente trabalho, também avaliamos, além de parâmetros de estresse oxidativo (dano oxidativo à proteínas e a lipídios), a concentração da citocina pró-inflamatória IL-6 e do antioxidante natural GSH em pacientes com X-ALD com diferentes formas clínicas (cALD e assintomáticos) no momento diagnóstico.

Observamos também elevados níveis de MDA, parâmetro de lipoperoxidação, em pacientes cALD e assintomáticos comparados ao grupo controle. Nossos resultados corroboram achados anteriores que demonstraram o envolvimento da peroxidação lipídica na fisiopatologia da X-ALD em plasma de pacientes X-ALD sintomáticos e assintomáticos através da determinação do conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e da quimioluminescência, bem como de marcadores imunorreativos de dano a lipídios em tecido cerebral *post mortem* de pacientes (Vargas et al., 2004, Powers et al., 2005, Deon et al., 2006, Deon et al., 2007, Deon et al., 2008b). Assim, nossos dados indicam que a peroxidação lipídica está induzida no plasma de pacientes X-ALD, o que provavelmente ocorre devido ao aumento da geração de radicais livres.

Também demonstramos que a formação de grupos carbonilas, marcador de dano oxidativo a proteínas, foi significativamente aumentada em pacientes cALD e assintomáticos em comparação ao grupo controle. Nossos resultados estão de acordo com estudos que relataram danos oxidativos a proteínas em células mononucleares periféricas e em fibroblastos de pacientes X-ALD e na medula espinhal de ratos com X-ALD (Foucarde et al., 2008, Foucarde et al., 2010, López-Euraskin et al., 2011). Portanto, é possível presumir que o dano oxidativo às proteínas verificado no presente estudo no plasma de pacientes X-ALD pode ter um significado fisiopatológico.

As células quando são expostas a lesões oxidativas e nitrativas utilizam uma série de mecanismos de defesa para se proteger. Estes mecanismos de defesa incluem limitar a produção de espécies reativas e neutralizar alguns radicais, prevenindo a proliferação de radicais secundários em reações em cadeia e reparando o dano. A defesa da célula é alcançada devido à presença de enzimas antioxidantes e antioxidantes de baixo peso molecular (por exemplo, glutathione, vitaminas C e E) (Halliwell e Gutteridge, 2007). A GSH é sintetizada no citoplasma de todas as células animais, sendo o fígado o órgão mais ativo (Halliwell e Gutteridge, 2007). A GSH tem funções importantes como

antioxidante, sendo componente importante da desintoxicação celular de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio em todos os órgãos, incluindo o cérebro (Smith et al., 1999, Dringen et al., 2000). Assim, realizou-se a quantificação de GSH, a principal defesa antioxidante natural não enzimática, em eritrócitos de pacientes cALD e assintomáticos. Observamos, pela primeira vez na literatura, uma diminuição significativa no conteúdo de GSH nos eritrócitos dos dois grupos de pacientes testados em comparação com o grupo controle. Este resultado está de acordo com outros estudos que demonstraram uma diminuição acentuada dos níveis de GSH em fibroblastos de pacientes X-ALD, bem como em medula espinhal de modelo animal de X-ALD (ratos) (Foucarde et al., 2008, Foucarde et al., 2010).

O cérebro tem níveis relativamente baixos de enzimas antioxidantes e um conteúdo lipídico relativamente alto com grandes quantidades de ácidos graxos insaturados e catecolaminas, os quais são substratos suscetíveis ao ataque das espécies reativas de oxigênio (Halliwell e Gutteridge, 2007; Reznick & Parker, 1993). Por isso, é muito suscetível a danos mediados por espécies reativas tanto de oxigênio, quanto de nitrogênio, que aumentam drasticamente em eventos tais como inflamação (Smith et al., 1999; Halliwell, 2006). Citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF α) são muitas vezes produzidas em resposta ao estresse oxidativo, e agem em parte por causa do estresse oxidativo em suas células-alvo (Halliwell e Gutteridge, 2007). A quantificação de IL-6 no plasma de pacientes X-ALD foi significativamente maior nos pacientes sintomáticos analisados (cALD), o que não foi observado no grupo dos pacientes assintomáticos. Este resultado é consistente com estudos que postularam que os danos neurológicos parecem ser mediados por indução de citocinas pró-inflamatórias (Moser et al., 2001). Paintlia et al. (2003) mostraram que a expressão de mRNA de citocinas e de níveis proteicos de citocinas, incluindo IL-6, foi significativamente maior em diferentes áreas de cérebros cALD comparados aos controles. Além disso, foi relatada a expressão de antígenos leucocitários humanos (HLA) e citocinas inflamatórias em lesões cerebrais

desmielinizantes de X-ALD (McGuinness et al., 1997). A expressão de citocinas pró-inflamatórias observada, tais como $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e $IFN\gamma$ na X-ALD indica um papel dessas citocinas inflamatórias na desmielinização (McGuinness et al., 1997, Powers et al., 1992). Inflamação e resposta imune alterada estão presentes e caracterizam a forma cerebral da X-ALD (Moser et al., 2001). É importante enfatizar, no entanto, a tendência de aumento nos níveis de IL-6 no plasma de pacientes assintomáticos em nosso estudo e que a maioria dos pacientes assintomáticos evoluem para formas sintomáticas tais como cALD ou adrenomieloneuropatia (Moser et al., 2001; Moser, 2006). Possivelmente, nossos pacientes assintomáticos possam evoluir para uma forma cerebral, uma vez que a indução de citocinas pró-inflamatórias está relacionada à progressão dos sintomas neurológicos em X-ALD (McGuinness et al., 1995). Além disso, nossos atuais resultados de depleção do conteúdo de GSH em pacientes assintomáticos complementam achados anteriores, que não demonstraram uma redução do *status* antioxidante total, um parâmetro que representa a quantidade de antioxidantes não enzimáticos teciduais, no plasma de pacientes assintomáticos (Deon et al., 2007). As maiores contribuições para o TAS (*Status* Antioxidante Total) no plasma são fornecidos por urato (Shoefield e Bragança, 1996, Halliwell e Gutteridge, 2007). Em outro estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, presume-se que alguns pacientes X-ALD são assintomáticos devido à sua quantidade normal de antioxidantes não enzimáticos que poderia ser suficiente para contrabalançar a geração de radicais livres (Deon et al., 2008). De outra forma, agora demonstramos uma redução da defesa antioxidante não-enzimática (GSH) e uma tendência de incremento da citocina pró-inflamatória IL-6 especificamente nestes pacientes assintomáticos. Além disso, estes pacientes, como citado anteriormente, apresentaram alterações nos parâmetros de dano oxidativo à proteínas e a lipídios (aumento de MDA e conteúdo de carbonilas). Assim, podemos presumir que, nestes pacientes X-ALD assintomáticos, dano oxidativo e aspectos inflamatórios desempenham um papel importante na evolução fenotípica e futuras manifestações neuronais. Entretanto, a fim de

esclarecer esta questão e poder extrapolar estas suposições, é importante estudar no futuro um grupo maior de pacientes, realizando o acompanhamento dos mesmos por períodos maiores.

Foucarde et al. (2008) demonstraram ativação de respostas oxidativas após a exposição a AGCML em fatias organotípicas de medula espinhal de ratos X-ALD e em fibroblastos humanos, as quais foram revertidos por trolox, um análogo da vitamina E. Outro estudo demonstrou que o ácido valpróico induz efeitos antioxidantes na X-ALD, prevenindo dano oxidativo tanto em modelo animal para X-ALD, quanto em paciente submetido a 6 meses de tratamento com AVP (Foucarde et al., 2010). López-Erauskin et al. (2011) identificaram uma combinação de antioxidantes (N-acetilcisteína, alfatocoferol e ácido lipóico) que foi capaz de reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio *in vitro* e normalizar o dano oxidativo às proteínas *in vivo* em medula espinhal de camundongos X-ALD.

Assim, analisados conjuntamente os fatos de que nenhuma terapia para X-ALD mostrou-se completamente bem sucedida, que o estresse oxidativo parece desempenhar um papel na patogênese da X-ALD e que os efeitos de reversão na geração de radicais livres promovidos por antioxidantes tem sido demonstrados em alguns estudos, também pode-se presumir que a administração de antioxidantes deve ser considerada como uma terapia adjuvante potencial para os pacientes assintomáticos e sintomáticos afetados pela X-ALD.

5. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

5.1 Capítulo 1:

- A medida de lipoperoxidação (MDA) está significativamente aumentada em plasma de pacientes X-ALD antes e após TCH em relação ao grupo controle.
- Após o transplante, os valores de MDA estão reduzidos significativamente em comparação aos níveis encontrados antes do procedimento, sugerindo uma atenuação deste processo potencialmente patológico pelo TCH.
- O conteúdo de sulfidrilas, parâmetro de dano à proteína e de status antioxidante, no plasma de pacientes X-ALD antes do TCH em comparação ao grupo controle está significativamente diminuído.
- A medida dos grupamentos sulfidrilas está aumentando após o TCH, indicando que o TCH poderia reverter o dano oxidativo às proteínas.
- Não observamos diferenças significativas no conteúdo de carbonila, outro parâmetro de dano proteico, no plasma de X-ALD antes e após o TCH, em comparação aos controles. Verificamos uma tendência de aumento (47%) do conteúdo de carbonila em relação ao controle e uma diminuição significativa desta medida após o TCH quando comparado a antes do TCH.
- Os pacientes X-ALD apresentam níveis plasmáticos de $C_{26:0}$ significativamente aumentados antes do TCH em comparação com controles e, após o transplante, as concentrações de $C_{26:0}$ reduziram fortemente, indicando a ocorrência de uma resposta bioquímica favorável.

- Observamos uma correlação negativa significativa entre a medida de conteúdo de sulfidrilas e os níveis plasmáticos de C_{26:0} de indivíduos X-ALD antes do TCH.
- Não encontramos qualquer correlação significativa entre os parâmetros de dano oxidativo, conteúdo de MDA e conteúdo de carbonilas, e os níveis plasmáticos de C_{26:0} antes e após o TCH.

5.2 Capítulo 2:

- O parâmetro de lipoperoxidação (MDA) está significativamente aumentado em plasma de pacientes sintomáticos (cALD) e assintomáticos com X-ALD comparado ao grupo controle.
- A medida do conteúdo de carbonila, parâmetro de dano a proteína, está significativamente aumentado em plasma de pacientes sintomáticos (cALD) e assintomáticos em comparação ao grupo controle.
- A quantificação de glutathiona reduzida (GSH), a principal defesa antioxidante natural não enzimática, em eritrócitos de pacientes cALD e assintomáticos está significativamente diminuída em comparação com o grupo controle.
- A quantificação de IL-6 no plasma de pacientes X-ALD está significativamente maior nos pacientes sintomáticos analisados (cALD) em relação ao grupo controle, o que não foi observado no grupo dos pacientes assintomáticos.

5.3 Conclusão geral

A indicação para transplante de medula óssea ou de células hematopoiéticas na X-ALD requer vários cuidados, uma vez que a previsão de evolução da doença ainda depende inteiramente de características clínicas do indivíduo (idade do paciente, extensão e evolução recente de lesões cerebrais) e não é recomendada para indivíduos com disfunções neurológicas e neuropsicológicas graves. Os resultados obtidos a partir do plasma de pacientes X-ALD antes e após o TCH demonstram que esta terapia tem alta efetividade em reduzir $C_{26:0}$ plasmático ao atingir os níveis médios de heterozigotas e também mostram indução e proteção, respectivamente, do estresse oxidativo. Isto permite sugerir que o transplante, quando está bem indicado e é bem sucedido, é eficaz em reduzir a peroxidação lipídica e o dano oxidativo às proteínas nos pacientes que encontram-se em um estágio inicial de envolvimento cerebral, com o mínimo de sintomas neurológicos e também em reduzir a concentração de $C_{26:0}$, uma resposta bioquímica favorável.

A lipoperoxidação e o dano a proteínas parecem estar presentes na X-ALD independentemente do fenótipo e da manifestação dos sintomas, uma vez que aparecem induzidos no plasma de pacientes assintomáticos e sintomáticos (cALD) antes de se submeterem ao transplante. Ainda, os resultados obtidos mostraram redução na concentração de glutathiona reduzida, principal defesa antioxidante natural não enzimática em pacientes X-ALD (assintomáticos e cALD). Estes resultados permitem sugerir que a lipoperoxidação, o dano protéico e a ocorrência de defesa antioxidante deficiente possam de alguma forma estar envolvidos na fisiopatologia da X-ALD. Ainda, como esperado, a quantificação de IL-6 no plasma de pacientes X-ALD foi significativamente maior nos pacientes sintomáticos analisados (cALD), o que não foi observado no grupo dos pacientes assintomáticos, apesar da tendência de aumento nas concentrações de IL-6. Assim, podemos presumir que, nestes pacientes X-ALD assintomáticos, dano oxidativo e aspectos inflamatórios desempenham um papel importante na

evolução e futuras manifestações fenotípicas neuronais. Cabe salientar que a demonstração de uma correlação negativa significativa entre a medida de conteúdo de sulfidrilas em plasma e os níveis plasmáticos de C_{26:0} de indivíduos X-ALD antes do TCH, juntamente a outros resultados apresentados na literatura científica, permite sugerir uma potencial ligação entre a acúmulo de C_{26:0} e estresse oxidativo na patogênese da X-ALD.

Finalmente, uma vez que até agora o TCH tem se mostrado bem sucedido no tratamento da X-ALD quando precocemente diagnosticada, o estresse oxidativo e aspectos inflamatórios parecem estar envolvidos na fisiopatologia desta doença, é tentador especular que a administração de antioxidantes deva ser considerada como uma terapia adjuvante ou até mesmo uma terapia em potencial para pacientes afetados pela X-ALD, inclusive para os que forem submetidos ao TCH.

6. PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados neste estudo sobre avaliação do papel da IL – 6 e do transplante de células hematopoiéticas sobre vários parâmetros de estresse oxidativo em pacientes com adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X devem ser cautelosamente considerados e confirmados com outras técnicas de determinação de estresse oxidativo. Pretendemos dar continuidade a este trabalho, investigando o efeito de outras citocinas pró-inflamatórias e do TCH sobre outros parâmetros de estresse oxidativo em plasma e em eritrócitos de pacientes X-ALD com diferentes formas clínicas, bem como estudar o efeito *in vitro* de lovastatina e de alguns antioxidantes (vitaminas C e E, ácido lipóico, N-acetilcisteína) sobre parâmetros de estresse oxidativo em sangue total de pacientes com X-ALD e de mulheres heterozigotas para X-ALD. Desta forma as perspectivas específicas são:

- Determinar as concentrações das citocinas pró-inflamatórias em plasma de pacientes X-ALD com diferentes formas clínicas no momento diagnóstico, antes e após o TCH, como:
 - ✓ Fator de necrose tumoral (TNF-alfa).
 - ✓ Interleucina 12 (IL 12).
 - ✓ Interferon gama.
 - ✓ Interleucina 1 beta (IL 1 beta).
 - ✓ Interleucina 6 (IL 6).
- Avaliar o estresse oxidativo em pacientes X-ALD com diferentes formas clínicas no momento diagnóstico, antes e após o TCH através de vários parâmetros, como:
 - ✓ Ensaio cometa em leucócitos.
 - ✓ Determinação de malondialdeído (MDA) em plasma.

- ✓ Reatividade antioxidante total (TAR) em plasma.
 - ✓ Status antioxidante total (TAS) em plasma.
 - ✓ Determinação de carbonila em plasma.
 - ✓ Medida de tióis totais (conteúdo de sulfidrilas) em plasma.
 - ✓ Determinação de glutathiona (GSH) em eritrócitos.
 - ✓ Atividade das enzimas: catalase, glutathiona peroxidase e superóxido dismutase em eritrócitos.
- Investigar correlação entre os parâmetros de estresse oxidativo e as citocinas (parâmetros de resposta inflamatória) nos pacientes X-ALD, realizando um acompanhamento no grupo assintomático a fim de verificar uma possível evolução fenotípica e seu comportamento quanto aos parâmetros oxidativos e inflamatórios.
 - Verificar o efeito *in vitro* da lovastatina sobre parâmetros de estresse oxidativo em sangue total e fibroblastos de pacientes X-ALD e HTZ para X-ALD.
 - Verificar o efeito *in vitro* de antioxidantes (ácido lipóico, N-acetilcisteína, vitamina E) sobre parâmetros de estresse oxidativo em sangue total de pacientes X-ALD e HTZ para X-ALD.

7. REFERÊNCIAS

- Aksenov, M.Y., Markesbery, W.R. (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.
- Aubourg, P., Blanche, S., Jambaque, I., Rocchicili, F., Kalifa, G., Naud-Saudreau, C., Rolland, M.O., Debre, M., Chaussain, J.L., Gristelli, C., Fischer, A., Bougnères, P.F. (1990). Reversal of early neurologic and neuroradiologic manifestations of X-linked adrenoleukodystrophy by bone marrow transplantation. *N.Engl.J.Med.* 322:1860-1866.
- Aubourg, P., Sack, G.H., Meyers, D.A., Lease, J.J., Moser, H.W. (1987). Linkage of adrenoleukodystrophy to a polymorphic DNA probe. *Ann. Neural.* 21: 349-351.
- Barschak, A., Sitta, A., Deon, M., Oliveira, M.H., Haeser, A., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M. and Vargas, C.R. (2006). Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metab. Brain Dis.* 21:279-286.
- Barschak, A., Sitta, A., Deon, M., Barden, A.T., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M. and Vargas, C.R. (2008). Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. *Metab. Brain Dis.* 23(1): 71-80.
- Baumann, M., Korenke, G.C., Weddige-Diedrichs, A., Wilichowski, E., Hunneman, D.H., Wilken, B., Brockmann, K., Klingebiel, T., Niethammer, D., Kuhl, J., Ebell, W., Hanefeld, F. (2003). Haematopoietic stem cell transplantation in 12 patients with cerebral X-linked adrenoleukodystrophy. *Eur J Pediatr* 162:6-14
- Baumgartner, M. R.; Saudubray, J. M. (2002). Peroxisomal disorders. *Semin. Neonatol.* 7:85-94.
- Bezman, L., Moser, A.B., Raymond, G.V., Rinaldo, P., Watkins, P.A., Smith, K.D., Kass, N.E., Moser, H.W. (2001). Adrenoleukodystrophy: incidence, new mutation rate, and results of extended family screening. *Ann. Neurol.* 49:512-517.
- Boveris, A., (1998). Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina, B. Aires.* 58:350-356.
- Cartier, N. (2001). Gene therapy strategies for X-linked adrenoleukodystrophy. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 4:357:361.

- Cartier, N., Aubourg, P. (2010). Hematopoietic stem cell transplantation and hematopoietic stem cell gene therapy in X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol.* 20(4):857-62.
- Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C.C., Bougnères, P., Schmidt, M., Kalle, C.V., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M., Aubourg, P. (2012). Lentiviral hematopoietic cell gene therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. *Methods Enzymol.* 507:187-98.
- Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C.C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., Vidaud, M., Abel, U., Dal-Cortivo, L., Caccavelli, L., Mahlaoui, N., Kiermer, V., Mittelstaedt, D., Bellesme, C., Lahlou, N., Lefrère, F., Blanche, S., Audit, M., Payen, E., Leboulch, P., l'Homme, B., Bougnères, P., Von Kalle, C., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M., Aubourg, P. (2009). Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science.* 326(5954):818-23.
- Colomé, C., Vilaseca, M. A., Sierra, C. (2000). Congenital errors of metabolism: cause of oxidative stress? *Med. Clin.* 115:111-117.
- Dacremont, G., Cocquyt, G., Vincent, G. (1995). Measurement of very long chain fatty acids, phytanic and pristanic acid in plasma and cultured fibroblasts by gas chromatography. *J. Inher. Metab. Dis.* 18: 76-83.
- Deon, M., Sitta, A., Barschak, A.G., Coelho, D.M., Pigatto, M., Schimitt, G.O., Jardim, L.B., Giugliani, R., Wajner, M.; Vargas, C.R. (2007). Induction 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, M.P., Sitta, A., Barschack, A.G., Coelho, D.M., Schimit, G.O., Pigatto, M., Jardim, L.B., Wajner, M., Giugliani, R., Vargas, C.R. (2008a). Hexacosanoic and docosanoic acids 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, A.G., Coelho, D.M., Terroso, T., Schimitt, G.O., Wanderley, H.Y.C., Jardim, L.B., Giugliani, R., Wajner, M., Vargas, C.R. (2008b). Oxidative stress is induced in female carriers of X-linked adrenoleukodystrophy. *J. Neurol. Sci.* 266:79-83.
- Deon, M., Wajner, M., Sirtori, L.R., Fitarelli, D., Coelho, D., Sitta, A., Barschak, A.G., Ferreira, G.C., Haeser, A., Giugliani, R., Vargas, C.R. (2006). The effect of Lorenzo's oil on oxidative stress in X-linked adrenoleukodistrophy. *J Neurol Sci.* 247:157-164.

- Deuticke, B. (1986) The role of membrane sulfhydryls in passive, mediated transport processes and for the barrier functions of the erythrocyte membrane. *Membrane Biochem.* 6 (4) 309-326.
- Di Benedetto, R., Denti, M.A., Salvati, S., Attorri, L., Di Biase, A. (2009). PMP70 knock-down generates oxidative stress and pro-inflammatory cytokine production in C6 glial cells. *Neurochem Int.* 54(1):37-42.
- Di Biase, A., Benedetto, R., Fiorentini, C., Travaglione, S., Salvati, S., Attorri, L., Pietraforte, D. (2004). Free radical release in C6 glial cells enriched in hexacosanoic acid: implication for X-linked adrenoleukodystrophy pathogenesis. *Neurochem. Int.* 44:215-221.
- Di Biase, A., Benedetto, R., Salvati, S., Attorri, L., Leonardi, F., Pietraforte, D. (2005). Effects of L-mono methyl-arginine, N-acetyl-cysteine and diphenyliodonium on free radical release in C6 glial cells enriched in hexacosanoic acid. *Neurochem. Res.* 30(2): 215-223.
- Dringen, R., Gutterer, J.M., Hirrlinger, J. (2000) Glutathione metabolism in brain. *Eur. J. Biochem.* 267:4912-4916.
- Dubois-Dalcq, M., Feigenbaum, V., Aubourg, P. (1999). The neurobiology of X-linked adrenoleukodystrophy, a demyelinating peroxisomal disorder. *TINS.* 22 (1): 4-13.
- Fourcade, S.; López-Erauskin, J., Galino, J., Duval, C., Naudi, A., Jove, M., Kemp, S., Villarroya, F., Ferrer, I., Pamplona, R., Portero-Otin, M., Pujol, A. (2008). Early oxidative damage underlying neurodegeneration in X-adrenoleukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 17:1762-1773.
- Fourcade, S., Ruiz, M., Guilera, C., Hahnen, E., Brichta, L., Naudi, A., Portero-Otín, M., Dacremont, G., Cartier, N., Wanders, R., Kemp, S., Mandel, J.L., Wirth, B., Pamplona, R., Aubourg, P., Pujol, A. (2010) Valproic acid induces antioxidant effects in X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet* 19(10): 2005-14.
- Fournier, B., Smeitink, J.A.M., Dorland, L., Gerger, R., Saudubray, J.M., Pollthe, B.T. (1994). Peroxisomal Disorders: A Review. *J. Inher. Metab. Dis.* 17: 470-486.
- Galino, J., Ruiz, M., Foucarde, S., Schlüter, A., López-Erauskin, J., Guilera, C., Jove, M., Naudi, A., García-Arumí, E., Andreu, A.L., Starkov, A.A., Pamplona, R., Ferrer, I., Portero-Otin, M., Pujol, A. (2011). Oxidative damage compromises energy metabolism in the axonal degeneration mouse model of X-Adrenoleukodystrophy. *Antioxidant&Redox Signaling*; 00:1-13

- Halliwell, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? (2006) *J. Neurochem.* 97:1634-1658.
- Halliwell, B., Chirico, S., (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr.* 57:715- 725.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (Eds). (2007) Free radicals in Biology and Medicine. 4ª edição. New York: Oxford University Press.
- Halliwell, B., Whiteman, M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142: 231-255.
- Harris, E.D., (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J.* 6(9):2675-2683.
- Kemp, S., Wanders, R. (2010) Biochemical Aspects of X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol.* 20(4):831-7.
- Kemp, S., Wli, H. M., Lu, J.F., Braitermann, L., McGuinness, M.C., Moser, A.B., Watkins, P.A., Smith, K.D. (1998). Gene redundancy and pharmacological gene therapy implications for X-ALD. *Nat. Med.* 4(11): 1261-1268.
- Latini, A., Borba-Rosa, R., Scussiato, K., Lessuy, S., Bello-Klein, A., Wajner M., (2002) 3-Hydroxyglutaric acid induces oxidative stress and decreases the antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats. *Brain Res.* 956:367-373.
- Levine, R.L. Garland, D. Oliver, C.N. Amici, A. Climent, I. Lenz, A.G. Ahn, B.W. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186 464–478.
- Loes, D. J., Fatemi, A., Melhem, E.R., Gupte, N., Bezman, L., Moser, H.W., Raymond, G.V. (2003). Analysis of MRI patterns aids prediction of progression in X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurology.* 61(3): 369-374.
- Loes, D. J., Hite, S., Moser, H., Stillman, A.E., Shapiro, E., Lockman, L., Latchaw, R.E., Krivit, W.(1994) Adrenoleukodystrophy: a scoring method for brain MR observations. *Am J Neuroradiol.* 15(9): 1761-1766.
- López-Erauskin, J., Fourcade, S., Galino, J., Ruiz, M., Schlüter, A., Naudi, A., Jove, M., Portero-Otin, M., Pamplona, R., Ferrer, I., Pujol, A. (2011) Antioxidants halt axonal degeneration in a mouse model of X-adrenoleukodystrophy. *Ann Neurol.* 70(1):84-92.
- Mahmood, M., Dubey, P., Moser, H.W., Moser, A. (2005). X-linked

- adrenoleukodystrophy. Therapeutic approaches to distinct phenotypes. *Pediatric Transplantation*. 9(7):55-62.
- McGuinness, M.C., Griffin, D.E., Raymond, G.V., Washington, C.A., Moser, H.W., Smith, K.D. (1995). Tumor necrosis factor-[alpha] and X-linked adrenoleukodystrophy. *J. Neuroimmunol.* 61, 161–169.
- McGuinness, M.C., Powers, J.M., Bias, W.B., Schmeckpeper, B.J., Segal, A.H., Gowda, V.C. et al (1997) Human leukocyte antigens and cytokine expression in cerebral inflammatory demyelinating lesions of X-linked adrenoleukodystrophy and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 75:174–182.
- Migeon, B.R., Moser, A.B., Axelman, J., Silience, D., Norum, R.A. (1981). Adrenoleukodystrophy evidence for X linkage, inactivation and selection favoring the mutant allele in heterozygous cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:5066-5070.
- Moser, H.W., Moser, A.B., Smith, K.D., Bergin, A., Borel, J., Shankroff, J., Stine, O.C., Merette, C., Ott, J., Krivit, W., Shapiro, E. (1992). Adrenoleukodystrophy: phenotypic variability and implications for therapy. *J. Inher. Metab. Dis.* 15:645-664.
- Moser, H.W.(1997). Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain*. 120:1485-1508.
- Moser, H.W. (2006). Therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. *Neuro Rx*. 3 246–253.
- Moser, H.W., Raymond, G.V., Lu, S.E., Muenz, L.R., Moser, A.B., Xu, J., Jones, R.O., Loes, D.J., Melhem, E.R., Dubey, P., Bezman, L., Brereton, N.H., Odone, A. (2005) Follow-up of 89 asymptomatic patients with adrenoleukodystrophy treated with Lorenzo's oil. *Arch. Neurol.* 62(suppl. 7):1073-1080.
- Moser H.W., Smith K.D., Watkins P.A., Powers J., Moser A.B. X-linked adrenoleukodystrophy. In Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D. (Eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th edition, New York: McGraw-Hill Inc., 2001: 3257-3301.
- Moser, H.W., Moser, A.B. (1991). Measurement of saturated very long chain fatty acid in plasma. In: Hommes, F. A., (Ed.) *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics*. New York: Wiley.

- Mosser, J., Douar, A.M., Sarde, C.O., Kioschis, P., Feil, R., Moser, H. *et al* (1993) Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 361:726–730.
- Olivier, L. M., Krisans, S. K. (2000). Peroxisomal protein targeting and identification of peroxisomal targeting signals in cholesterol in biosynthetic enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1529: 89-102.
- Paintlia, A.S., Gilg, A.G., Khan, M., Singh, A.K., Barbosa, E., Singh, I. (2003). Correlation of very long chain fatty acid accumulation and inflammatory disease progression in childhood X-ALD: implications for potential therapies. *Neurobiol. Dis.* 14, 425–439.
- Peters, C., Charnas, L.R., Tan, Y., Ziegler, R.S., Shapiro, E.G., Defor, T., Grewal, S.S., Orchard, P.J., Abel, S.L., Goldman, A.I., Ramsay, N.K.C., Dusenbery, K.E., Loes, D.J., Lockman, L.A., Kato, S., Aubourg, P.R., Moser, H.W., Krivit, W. (2004). Cerebral X-linked adrenoleukodystrophy: the international hematopoietic cell transplantation experience from 1982 to 1999. *Blood.* 104(3):881-888.
- Powers, J.M., Liu, Y., Moser, A.B., Moser, H.W. (1992) The inflammatory myelinopathy of adreno-leukodystrophy: cells, effector molecules, and pathogenetic implications. *J Neuropathol Exp Neurol* 51: 630–643.
- Powers, J. M., Moser, H. W. (1998). Peroxisomal disorders: genotype, phenotype, major neuropathologic lesions and pathogenesis. *Brain Pathology* 8: 101-120.
- Powers, J.M., Pei, Z., Keinzer, A.K., Deering, R., Moser, A.B., Moser, H.W., Watkins, P.A., Smith, K.D. (2005). Adreno-leukodystrophy: oxidative stress of mice and men. *J.Neuropathol. Exp. Neurol.* 64(12): 1067-1079.
- Requejo, R., Hurd, T.R., Costa, N.J., Murphy, M.P. (2010) Cystein residues exposed on protein surfaces are dominant intramitochondrial thiol and may protect against oxidative damage, *FEBS J.*, 277 1465-1480.
- Resnick, I.B., Abdul Hai, A., Shapira, M.Y., Bitan, M., HersHKovitz, E., Schwartz, A. *et al* (2005) Treatment of X-linked childhood cerebral adrenoleukodystrophy by the use of an allogeneic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning regimen. *Clin Transplant* 19:840–847.
- Reznick, A.Z., Packer, L. (1993) Free Radicals and Antioxidants in Muscular and Neurological Diseases and Disorders. In: Pilo, G., Albano, E., Dianzani, M. U. (eds) *Free Radicals: From Basic Science to Medicine* Birkhäuser Verlag Basic I Switzerland.

- Ribas, G.S., Manfredini, V., de Mari, J.F., Wayhs, C.Y., Vanzin, C.S., Biancini, G.B., Sitta, A., Deon, M., Wajner, M., Vargas, C.R. (2010a). Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation. *Int J Dev Neurosci.* 28(2): 127-32.
- Ribas, G.S., Manfredini, V., de Marco, M.G., Vieira, R.B., Wayhs, C.Y., Vanzin, C.S., Biancini, G.B., Wajner, M., Vargas, C.R. (2010 b). Prevention by L-carnitine of DNA damage induced by propionic and L-methylmalonic acids in human peripheral leukocytes in vitro. *Mutat Res.* 30; 702(1):123-8.
- Rizzo, W.B., Phillips, M.W., Dammann, A.L., Leshner, R.Y., Jennings, S.V.K. (1987). Adrenoleukodystrophy. Dietary oleic acid lowers hexacosanoate levels. *Ann. Neurol.* 21: 232.
- Saudubray, J.M., Charpentier, C. (2001) 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.
- Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (2001) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8^a edição. New York: Mc Graw-Hill.
- Shapiro, E., Krivit, W., Lockman, L., Jambaqué, I., Peters, C., Cowan, M., Harris, R., Blanche, S., Bordigoni, P., Loes, D., Ziegler, R., Crittenden, M., Ris, D., Cox, C., Moser, H., Fischer, A., Aubourg, P. (2000). Long-term effect of bone marrow transplantation for childhood-onset cerebral X-linked adrenoleukodystrophy. *The Lancet.* 356:713-718.
- Shofield D, Braganza JM. (1996). Shortcomings of an automated assay for total antioxidant status in biological fluids. *Clinical Chemistry* 10:1712-1714.
- Sierra, C., Vilaseca, M.A., Moyano, D., Brandi, N., Campistol, J., Lambruschini, N., Cambra, F.J., Deulofeu, R., Mira, A. (1998). Antioxidant status in hyperphenylalaninemia. *Clin Chim Acta.* 276(1):1-9.
- Sirtori, L.R., Dutra-Filho, C.S., Fitarelli, D., Sitta, A., Haeser, A., Barschak, A., Wajner, M., Coelho, D.M., Llesuy, S., Belló-Klein, A., Giugliani, R., Deon, M., Vargas, C. R. (2005). Oxidative stress in patients with Phenylketonuria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1740:68-73.
- Sitta, A., Barschak, A., Deon, M., Terroso, T., Pires, R., Giugliani, R., Dutra-Filho, C. S., Wajner, M., Vargas, C. R. (2006). Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. *Metab. Brain Dis.* 21:287-296.

- Sitta, A., Barschak, A.G., Deon, M., De Mari, J.F., Barden, A.T., Vanzin, C.S., Biancini, G.B., Schwartz, I.V., Wajner, M., Vargas, C.R. (2009). L-carnitine blood levels and oxidative stress in treated phenylketonuric patients. *Cell Mol Neurobiol.* 29(2):211-8.
- Smith, K.J., Kapoor, R., Felts, P.A. (1999). Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathology.* 9:69:92.
- Stadtman, E.R., Levine, R.L. (2003) Free-radical mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25 207–218.
- Stradomska, T.J., Tylki-Szymanska, A. (1996). Examination of very long chain fatty acids in diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy. *Pediatr. Pol.* 3:197-201.
- Ten Brink, H. J., Van Den Heuvel, C.M.M., Poll-The, B.T., Wanders, R.J.A., Jakobs, C. (1993). Peroxisomal disorders. *J. Inher. Metab. Dis.* 16: 587-590. 124.
- Tolar, J., Orchard, P.J., Bjoraker, K.J., Ziegler, R.S., Shapiro, E.G., Charnas, L. (2007). N-acetyl-L-cysteine improves outcome of advanced cerebral adrenoleukodystrophy. *Bone Marrow Transplant.* 39(4): 211-215.
- Unterrainer, G., Molzer, B., Forss-Petter, S., Berger, J. (2000). Co-expression of mutated and normal adrenoleukodystrophy protein reduces protein function: implications for gene therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum. Molec. Genet.* 9: 2609-2616.
- Uto T, Contreras MA, Gilg AG, Singh I. (2008) Oxidative Imbalance In Nonstimulated X-Adrenoleukodystrophy-Derived Lymphoblasts. *Dev. Neurosci*; 30:410-418.
- Van Geel, B.M., Assies, J., Wanders, R.J., Barth, P.G. (1997). X-linked adrenoleukodystrophy: clinical presentation, diagnosis, and therapy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 63(1): 4-14.
- Vargas, C.R., Wajner, M., Sirtori, L.R., Goulart, L., Chiochetta, M., Coelho, D.M., Latini, A., Llesuy, S., Bello-Klein, A., Giugliani, R., Deon, M., Mello, C.F. (2004) Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked Adrenoleukodistrophy. *Biochim Biophys Acta.* 1688:26-32.
- Wajner, M., Latini, A., Wyse, A. T., Dutra-Filho, C. S. (2004). The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J. Inherit. Metab. Dis.* 27:427-448.

- Wanders, R.J.A, Schutgens, R.B.H, Barth, P.G, Tager, J.M., Van Den Bosch, H. (1993). Postnatal diagnosis of peroxisomal disorders: a biochemical approach. *Biochemie*. 75:269-279.
- Wanders, R.J.A, Schutgens, R.B.H, Barth, P.G. (1995) Peroxisomal Disorders: A Review. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 54(5):726-739
- Wanders, R.J.A, Vreken, P., Ferdinandusse, S., Jassen, G.A., Waterham, R., Van Roermund, C.W.T., Van Grunsven, E.G. (2001). Peroxisomal fatty acid α - and β - oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. *Biochim Soc Trans.* 29(2) 259 – 267.
- Wulf, D., (2001). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82:47-95.
- Yanagisawa, N., Shimada, K., Miyazaki, T., Kume, A., Kitamura, Y., Sumiyoshi, K., Kiyonagi, T., Iesaki, T., Ionue, N., Daida, H. (2008). Enhanced production of nitric oxide, reactive oxygen species, and pro-inflammatory cytokines in very long chain saturated fatty acid-accumulated macrophages. *Lipids Health Dis.* 7:48.

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 E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A Comissão Científica e o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP/HCPA), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 100482

Data da Versão do Projeto: 14/06/2011

Data da Versão do TCLE: 14/06/2011

Pesquisadores:

CARMEN REGLA VARGAS

LAURA BANNACH JARDIM

MARION DEON

DAIANE PÉRES MARCHESE

CAROLINE PAULA MESCKA

IZABELA NETTO PEREIRA

FRANCIELI JULIANA ROCKENBACH

ANDERSON BÚKER DE OLIVEIRA

Título: Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X: Papel das citocinas pró-inflamatórias, dos antioxidantes e do transplante de células hematopoiéticas sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo.

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos, bem como o seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais de pesquisa clínica, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

- Os membros da Comissão Científica e do Comitê de Ética em Pesquisa não participaram do processo de avaliação dos projetos nos quais constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.
- Somente poderá ser utilizado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no qual conste o carimbo de aprovação do CEP/HCPA.

Porto Alegre, 21 de junho de 2011.


Prof.^a Nadine Clauseil
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

8.2 FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS DA COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA - CONEP



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS				FR - 433754	
Projeto de Pesquisa ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AO CROMOSSOMO X: PAPEL DAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS, DOS ANTIOXIDANTES E DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS SOBRE ALGUNS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO					
Área de Conhecimento 2.00 - Ciências Biológicas - 2.02 - Genética				Grupo Grupo II	Nível
Área(s) Temática(s) Especial(s) Genética Humana,				Fase Não se Aplica	
Unitermos X-ALD, ESTRESSE OXIDATIVO, ANTIOXIDANTES, TRANSPLANTE, CITOCINAS					
Sujeitos na Pesquisa					
Nº de Sujeitos no Centro 70	Total Brasil 70	Nº de Sujeitos Total 70	Grupos Especiais Criança e ou menores de 18 anos,		
Placebo NAO	Medicamentos HIV / AIDS NÃO	Wash-out NÃO	Sem Tratamento Específico NÃO	Banco de Materiais Biológicos NÃO	
Pesquisador Responsável					
Pesquisador Responsável Carmen Regla Vargas			CPF 393.686.370-91	Identidade 3016989844	
Área de Especialização Bioquímica			Maior Titulação Doutorado	Nacionalidade brasileira	
Endereço rua Ramiro Barcelos 2350 - HCPA			Bairro santana	Cidade Porto Alegre - RS	
Código Postal 90035-003	Telefone 33168011 / 33316982	Fax 33168010	Email crvargas@hcpa.ufrgs.br		
Termo de Compromisso					
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não.					
Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima.					
Data: 31 / 05 / 2011			Assinatura		
Instituição Proponente					
Nome Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA		CNPJ 87.020.517/0001-20	Nacional/Internacional Nacional		
Unidade/Órgão SERVIÇO DE GENÉTICA MÉDICA		Participação Estrangeira NÃO	Projeto Multicêntrico NÃO		
Endereço Rua Ramiro Barcellos 2350		Bairro Bonfim	Cidade Porto Alegre - RS		
Código Postal 90035003	Telefone (51) 21018000	Fax 51 21017640	Email cep@hcpa.ufrgs.br		
Termo de Compromisso					
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.					
Nome: _____					
Data: ____/____/____ Assinatura _____					
Instituição Co-Participante					
Nome Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS		CNPJ 92.969.856/0001-98	Nacional/Internacional Nacional		
Unidade/Órgão DEPARTAMENTO DE ANÁLISES DA FACULDADE DE FARMÁCIA		Participação Estrangeira NÃO	Projeto Multicêntrico NÃO		
Endereço Rua Paulo Gama		Bairro Bonfim	Cidade Porto Alegre - RS		
Código Postal 90040060	Telefone (51) 3316-3051	Fax (51) 3316-3973	Email ufrgs@ufrgs.br		
Termo de Compromisso					
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares.					
Nome: _____					

Data: ____/____/____

Assinatura

O Projeto deverá ser entregue no CEP em até 30 dias a partir de 31/05/2011. Não ocorrendo a entrega nesse prazo esta Folha de Rosto será INVALIDADA.

 Voltar

IMPRIMIR

8.3 TERMO DE CONSENTIMENTO – INDIVÍDUOS CONTROLES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X: Papel das citocinas pró-inflamatórias, dos antioxidantes e do transplante de células hematopoéticas sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo.

INDIVÍDUOS CONTROLES

Você está sendo convidado a participar de um trabalho cujo objetivo é verificar os efeitos de substâncias inflamatórias (por exemplo, citocinas pró-inflamatórias), da ação dos radicais livres (por exemplo, radiação solar) e de antioxidantes (por exemplo, vitaminas, como: Vitamina A e Vitamina C) em pacientes com doenças metabólicas herdadas geneticamente, as quais causam danos graves à saúde. Também pretendemos avaliar o efeito do tratamento utilizado rotineiramente nestas doenças sobre a ação destas substâncias antioxidantes e dos radicais livres. Você está sendo convidado a participar deste estudo como controle, ou seja, por não ser portador de doenças metabólicas herdadas geneticamente.

Para participar você fará exames de sangue, os quais serão coletados juntamente com os que serão utilizados 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. Os dados obtidos com sua doação são de importância científica relevante para o

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA

VERSÃO APROVADA

21/06/2011

10-0482

estabelecimento de novos tratamentos para estas doenças, bem como para melhor entendimento destas patologias. O material coletado será único e exclusivamente utilizado para fins do projeto de pesquisa, sendo reservado ao doador acesso aos mesmos.


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

Todas as despesas relacionadas ao custo dos exames laboratoriais serão coberta por verbas do próprio projeto de pesquisa, completamente gratuitas para você. Caso você queira retirar-se em definitivo da pesquisa, terá total liberdade para fazê-lo, sem que isso prejudique futuros atendimentos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O seu material (sangue) coletado será destruído e os seus dados excluídos do nosso banco de dados.

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo (a mestranda Francieli Juliana Rockenbach, a Profa. Dra.Carmen Regla Vargas e a farmacêutica bioquímica Dra. Marion Deon) estarão a disposição para esclarecimento de qualquer dúvida durante todo andamento da pesquisa no Serviço de Genética Médica do HCPA (localizado no 3º andar, Fone: 3359 8011). Ainda, para maiores informações sobre este ou qualquer outro projeto de pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (CEP/HCPA) por telefone (33597640) ou por email (cep@hcpa.ufrgs.br).

Pelo presente Consentimento, declaro que fui informado, de forma clara e detalhada, sobre o presente Projeto de Pesquisa e que fui igualmente informado da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca da pesquisa; da

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA
VERSÃO APROVADA

21 / 06 / 2011 
10-0482

liberdade de não participar do estudo, da segurança da preservação da privacidade e de receber uma via deste documento.

Data:


Indivíduo:

Responsável Legal:

Pesquisador:

Fone: 3359-8011

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA
VERSÃO APROVADA

21 / 06 / 2011 
10-0482

8.4 TERMO DE CONSENTIMENTO – PACIENTES X-ALD

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X: Papel das citocinas pró-inflamatórias, dos antioxidantes e do transplante de células hematopóéticas sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo.

PACIENTES COM ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AO X

Você, portador de adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (X-ALD), está sendo convidado a participar do presente projeto de pesquisa que tem por objetivo verificar os efeitos de substâncias inflamatórias (por exemplo, citocinas pró-inflamatórias), da ação dos radicais livres (por exemplo, radiação solar) e de antioxidantes (por exemplo, vitaminas A e C) na adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X. Também pretendemos avaliar o efeito do transplante de medula óssea sobre estes mesmos parâmetros investigados (radicais livres, antioxidantes e substâncias inflamatórias).

Os dados necessários para a realização deste 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 solicitadas rotineiramente pelo seu médico para realização dos testes para o seu acompanhamento clínico. É muito importante que você saiba que os dados (entrevista, dados clínicos e coleta de sangue) obtidos com sua doação são de relevante

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA
VERSÃO APROVADA

21/06/2011
10-0482

importância científica para o estabelecimento de novos tratamentos para X-ALD, bem como para um melhor entendimento desta doença.

Assim, seus dados serão coletados em 3 momentos diferentes (durante o seu diagnóstico para X-ALD; antes e após o transplante de medula óssea, somente caso você seja indicado para este procedimento ou por fazer parte do protocolo de transplante de medula óssea) nos dias das suas consultas rotineiras, não sendo necessário o seu comparecimento em consultas extras. Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue para este estudo são semelhantes aos envolvidos na coleta de sangue para exames de 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 desistência da participação neste estudo não trará implicações ao seu atendimento clínico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Ainda, todas as despesas relacionadas ao custo dos exames laboratoriais serão cobertas por verbas do próprio projeto de pesquisa, e, portanto, serão completamente gratuitas para você.

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo (a mestrandia Francieli Juliana Rockenbach, a Profa. Dra. Carmen Regla Vargas e a farmacêutica bioquímica Dra. Marion Deon) estarão a disposição para esclarecimento de qualquer dúvida durante todo andamento da pesquisa no Serviço de Genética Médica do HCPA (localizado no 3º andar, Fone: 3359 8011). Ainda, para maiores informações sobre este ou qualquer outro projeto de pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (CEP/HCPA) por telefone (33597640) ou por email (cep@hcpa.ufrgs.br).

Pelo presente Consentimento, declaro que fui informado, de forma clara e detalhada, sobre o presente Projeto de Pesquisa e que fui igualmente informado da garantia

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA
VERSÃO APROVADA

21.06.2011
10.0482

de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca da pesquisa; da liberdade de não participar do estudo, da segurança da preservação da privacidade e de receber uma via deste documento.

Data:


Indivíduo:

Responsável Legal:

Pesquisador:

Fone: 3359-8011

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA
VERSÃO APROVADA

21 / 06 / 2011
10-0482 

**8.5 COMPROVANTE DE RECEBIMENTO DO ARTIGO INTITULADO
“INVESTIGATION OF LIPID PEROXIDATION, PROTEIN OXIDATIVE
DAMAGE AND INFLAMMATORY PROCESS IN PLASMA FROM
ASYMPTOMATIC AND CHILDHOOD CEREBRAL X-LINKED
ADRENOLEUKODYSTROPHY PATIENTS” PELO PERIÓDICO CLINICAL
BIOCHEMISTRY**

Ms. No.: CLB-D-12-00129

Title: INVESTIGATION OF LIPID PEROXIDATION, PROTEIN OXIDATIVE DAMAGE AND
INFLAMMATORY PROCESS IN PLASMA FROM ASYMPTOMATIC AND CHILDHOOD
CEREBRAL X-LINKED ADRENOLEUKODYSTROPHY PATIENTS.

Corresponding Author: Dr Marion Deon

Authors: Francieli J Rockenbach, Msc. student; Marion Deon, PhD; Daiane P Marchese, graduated;
Vanusa Manfredini, PhD; Giovana B Biancini, Msc; Camila S Vanzin, Msc; Carlos A Whays, Msc;
Clarissa T Habekost, graduated; Laura B Jardim, PhD; Carmen R Vargas, PhD

Dear Dr Deon,

Your submission, referenced above, has been assigned the following manuscript number: CLB-D-12-
00129

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System
as an author:

<http://ees.elsevier.com/clb/>

Your username is: mdeon

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/clb/automail_query.asp.

Thank you for submitting your work to Clinical Biochemistry.

Kind regards,

D. Jones
Administrative Support Agent [30-Mar-11]
Clinical Biochemistry

Phone: (619) 699-6218

E-mail: clbi@elsevier.com

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com> Here you can
search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more
about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need
any further assistance from one of our customer support representatives.