

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

AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO EM  
ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AO  
CROMOSSOMO X E DOENÇAS DO ESPECTRO  
ZELLWEGER.

Tese de Doutorado  
MARION DEON

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Carmen Regla Vargas

Co-orientador: Prof. Dr. Moacir Wajner

Porto Alegre  
2009

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

AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO EM  
ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AO  
CROMOSSOMO X E DOENÇAS DO ESPECTRO  
ZELLWEGER.

Tese de Doutorado  
MARION DEON

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Carmen Regla Vargas

Co-orientador: Prof. Dr. Moacir Wajner

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito à obtenção de grau de

Doutor em Bioquímica

Porto Alegre  
2009

*Aos meus amados pais, Augusto e Marlena.*

## Agradecimentos

À minha orientadora Profa. Carmen Regla Vargas pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela disponibilidade, pela amizade e carinho, e principalmente, pela confiança em mim depositada.

Ao prof. Moacir Wajner por sua co-orientação, pelas palavras amigas, por dividir seus conhecimentos e sugestões que muito contribuíram para realização deste trabalho.

Às queridas amigas e “professoras” Angela e Alethéa, pessoas maravilhosas, por toda ajuda e pela amizade.

Aos meus excelentes e competentes colegas Franciele, Vanusa, Grazi e Carlos pela colaboração.

Às bolsistas “de ontem e de hoje” Amanda, Maiara, Thatiana, Marcela, Roberta, Giovana, Camila e Diana pelo auxílio fundamental para o desenvolvimento e a conclusão deste trabalho.

Aos amigos do LAMP/SGM-HCPA Anderson, Anelise, Estela, Rafaela e Daniella pelos bons momentos.

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

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica/UFRGS.

A Capes pelo apoio financeiro.

Aos meus familiares e amigos por toda torcida e apoio.

À minha vovózinha adorada pelo incentivo e carinho.

Ao meu irmão querido pela amizade e força.

À minha mãe, meu alicerce, e ao meu pai, meu verdadeiro “orientador”, por todo amor e desvelo, por tudo que me ensinaram e por acreditarem incondicionalmente em mim.

A Deus por sempre estar presente na minha vida.

# Índice

<b>RESUMO</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>4</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO	9
1.2 PEROXISSOMOS	10
1.3 DOENÇAS PEROXISSOMAIS	13
1.4 X-ALD	14
1.5 ESPECTRO ZELLWEGER	24
1.6 RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS	28
1.7 DEFESAS ANTIOXIDANTES	30
1.7.1 ENZIMAS ANTIOXIDANTES	30
1.7.2 DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICAS	32
1.8 ESTRESSE OXIDATIVO	32
1.8.1 ESTRESSE OXIDATIVO E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL	34
1.8.2 ESTRESSE OXIDATIVO E MARCADORES SANGUÍNEOS	35
1.8.3 ESTRESSE OXIDATIVO E OS ERROS INATOS DO METABOLISMO	37
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>39</b>
2.1 GERAL	39
2.2 ESPECÍFICOS	39
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>41</b>
3.1 CAPÍTULO 1 – ARTIGO 1	41
3.2 CAPÍTULO 2 – ARTIGO 2	49
3.3 CAPÍTULO 3 – ARTIGO 3	54
3.4 CAPÍTULO 4 – ARTIGO 4	60

<b>4. DISCUSSÃO</b>	<b>88</b>
<b>4.1 X-ALD</b>	<b>88</b>
<b>4.2 ESPECTRO ZELLWEGER</b>	<b>101</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>106</b>
<b>6. PERSPECTIVAS</b>	<b>110</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>126</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>126</b>

## Resumo

As doenças peroxissomais são um grupo de doenças metabólicas geneticamente heterogêneas que compartilham disfunções peroxissomais. Estas disfunções estão associadas a mudanças fundamentais e até mesmo fatais no desenvolvimento neurológico humano. Embora os sintomas neurológicos e as anormalidades cerebrais sejam características dos pacientes com doenças peroxissomais, muito pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos nos danos teciduais destas enfermidades. O principal objetivo deste estudo foi investigar parâmetros de estresse oxidativo em pacientes com enfermidades peroxissomais, como adrenoleucodistrofia ligada ao X (X-ALD) e Espectro Zellweger (ZSD). X-ALD é uma doença peroxissomal bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo de ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA) em diferentes tecidos e fluidos biológicos e clinicamente caracterizada pela desmielinização central e periférica e pela insuficiência adrenal. Sete tipos de formas clínicas já foram descritas, sendo as mais comuns as formas cerebral infantil (cALD), adrenomieloneuropatia (AMN) e assintomática. Um considerável número de heterozigotas (HTZ) para X-ALD desenvolve sintomas neurológicos como o envolvimento da medula espinhal que se assemelha aos das formas mais amenas de AMN. A terapia recomendada para X-ALD consiste no uso da mistura gliceroltrioleato/gliceroltrierucato conhecida como óleo de Lorenzo (OL) combinada a uma dieta pobre em VLCFA. No presente estudo, nós inicialmente avaliamos o curso bioquímico de pacientes com X-ALD com as formas cALD e assintomática tratados com OL e dieta restrita em VLCFA. Observamos que a concentração plasmática do ácido hexacosanóico (C<sub>26:0</sub>) e a razão entre os ácidos hexacosanóico/docosanóico



(C<sub>26:0</sub>/C<sub>22:0</sub>) estavam significativamente reduzidas nos plasmas dos pacientes cALD e assintomáticos durante o tratamento quando comparado ao diagnóstico. Somente nos pacientes assintomáticos sob tratamento com OL o nível plasmático de C<sub>26:0</sub> atingiu os valores de referência. Também, no presente estudo, objetivamos determinar e comparar o dano oxidativo a lipídios (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, TBA-RS) e as defesas antioxidantes teciduais (status antioxidante total, TAS) no plasma de pacientes com diferentes formas clínicas (cALD, AMN e assintomáticos). Foi demonstrado que pacientes sintomáticos e assintomáticos com X-ALD apresentaram um aumento significativo da medida de TBA-RS no plasma. Ainda, a determinação de TBA-RS mostrou-se mais aumentada em AMN quando comparada as formas cALD e assintomática. Também observamos que o TAS estava diminuído em pacientes sintomáticos e não em assintomáticos com X-ALD. Subseqüentemente, buscamos avaliar parâmetros de estresse oxidativo em plasma de HTZ para X-ALD para verificar se o dano oxidativo ocorre nestes indivíduos. Foi observado que HTZ para X-ALD apresentaram um aumento significativo da medida de TBA-RS, bem como uma diminuição da reatividade antioxidante total (TAR). ZSD são doenças progressivas caracterizadas pela perda de múltiplas funções metabólicas peroxissomais, sintomas neurológicos e anormalidades cerebrais. Ainda, muito pouco é sabido sobre os mecanismos envolvidos nos danos teciduais dessas enfermidades. Foi observado um aumento significativo na determinação de TBA-RS, assim como uma diminuição no conteúdo total de tióis em plasma de pacientes afetados por ZSD. Ao contrário, a medida de TAS não se mostrou alterada no plasma de indivíduos com ZSD, comparativamente aos controles. Em suma, nossos principais resultados mostram que: a) tratamento com OL em pacientes assintomáticos com X-ALD mostra uma boa resposta bioquímica e é importante recomendá-lo para este grupo de pacientes; b)

lipoperoxidação parece ocorrer em formas clínicas sintomáticas (cALD, AMN) e assintomáticas (HTZ e assintomáticos) de X-ALD; c) estresse oxidativo ocorre em cALD, AMN e HTZ para X-ALD, provavelmente contribuindo para a fisiopatologia destas formas clínicas; d) pacientes assintomáticos com X-ALD parecem estar protegidos contra o estresse oxidativo devido a suas defesas antioxidantes normais, sugerindo que outros fatores além do dano oxidativo possam ser responsáveis pela gravidade dos sintomas na X-ALD; e) lipoperoxidação e oxidação protéica podem estar envolvidas na fisiopatologia das doenças do Espectro Zellweger; f) pode ser presumido que os antioxidantes possam ser usados como uma terapia adjuvante em pacientes afetados por doenças peroxissomais.

## **Abstract**

Peroxisomal disorders are a group of genetically heterogeneous metabolic diseases that share peroxisomal dysfunctions. These defects are associated with major, and often fatal, changes in human neurological development. Although neurological symptoms and brain abnormalities are characteristic of patients with peroxisomal disorders, very little is known about the pathomechanisms involved in the tissue damage of these disorders. The main objective of the present study was to investigate oxidative stress parameters in patients with peroxisomal disorders like X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) and Zellweger spectrum disorders (ZSD). X-ALD is a peroxisomal disease biochemically characterized by the accumulation of very long chain fatty acids (VLCFA) in different tissues and in biological fluids and clinically characterized by central and peripheral demyelination and adrenal insufficiency. Seven clinical variants have been described, being the childhood cerebral form (CCER), adrenomyeloneuropathy (AMN) and asymptomatic the most common clinical forms. A considerable number of heterozygotes (HTZ) for X-ALD develop neurological symptoms like spinal cord involvement resembling milder forms of AMN. The recommended therapy consists of the use of the glyceroltrioleate/glyceroltrierucate mixture known as Lorenzo's Oil (LO), combined with a VLCFA-poor diet. In the present study we initially evaluated the biochemical course of patients with CCER and asymptomatic clinical forms of X-ALD treated with LO associated with a VLCFA-restricted diet. We observed that hexacosanoic acid ( $C_{26:0}$ ) plasma concentrations and hexacosanoic/docosanoic ratio ( $C_{26:0}/C_{22:0}$ ) were significantly reduced in CCER and asymptomatic patients during treatment when compared with patients at diagnosis. Only

in asymptomatic patients under LO treatment, C<sub>26:0</sub> plasma level was achieved the reference values. Also, in the present study, we aimed to determine and compare the lipid oxidative damage (thiobarbituric acid-reactive substances, TBA-RS) and the tissue antioxidant defenses (total antioxidant status, TAS) in plasma from patients with various clinical forms of X-ALD (CCER and AMN and asymptomatic). It was demonstrated that symptomatic and asymptomatic X-ALD patients presented a significant increase of plasma TBA-RS measurement. Furthermore, TBA-RS determination was higher in AMN, as compared to CCER and asymptomatic patients. We also observed that TAS was decreased in symptomatic but not in asymptomatic X-ALD patients. Subsequently, we aimed to evaluate parameters of oxidative stress in plasma of X-ALD female carriers in order to verify whether oxidative damage occurs in these individuals. It was observed that HTZ for X-ALD presented a significant increase of TBA-RS measurement, as well as a decrease of total antioxidant reactivity (TAR). ZSD are progressive disorders characterized by loss of multiple peroxisomal metabolic functions, neurological symptoms and brain abnormalities. Furthermore, very little is known about the pathomechanisms involved in the tissue damage of these disorders. It was observed a significant increase of plasma TBA-RS measurement, as well as a decrease of total thiol content in plasma from patients affected by ZSD. In contrast, TAS measurement was not changed in plasma of ZSD patients, as compared to controls. In summary, our main results show that: a) LO treatment in asymptomatic X-ALD patients shows a good biochemical response and it is important to recommend LO treatment to this group of patients; b) lipid peroxidation seems to occur in symptomatic (CCER and AMN) and asymptomatic (HTZ and asymptomatic) clinical forms of X-ALD; c) oxidative stress occurs in CCER, AMN and HTZ for X-ALD, probably contributing to the pathophysiology of this clinical forms; d) asymptomatics patients

seem to be protected against oxidative stress because of their normal antioxidant defenses, suggesting that other factors besides oxidative damage may be responsible for the severity of the symptoms in X-ALD; e) lipid peroxidation and protein oxidation may be involved in the pathophysiology of the Zellweger spectrum disorders; f) it may be presumed that antioxidant might be used as an adjuvant therapy for patients affected by peroxisomal disorders.

## Lista de Abreviaturas

3-OH-HMG-CoA	3-hidróxi-3-metil-glutaril coenzima A
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
ALDP	proteína relacionada à Adrenoleucodistrofia ( <i>adrenoleukodystrophy related protein</i> )
AMN	adrenomieloneuropatia
C <sub>18:1</sub>	ácido oleico
C <sub>22:0</sub>	ácido docosanoico
C <sub>22:1</sub>	ácido erúxico
C <sub>24:0</sub>	ácido tetracosanoico
C <sub>26:0</sub>	ácido hexacosanoico
cALD/CCER	forma cerebral infantil ( <i>childhood cerebral adrenoleukodystrophy</i> )
CAT	catalase
CuZn-SOD	cobre-zinco superóxido dismutase
DHA	ácido docosaexaenóico
DHCA	ácido diidroxicolestanóico
DTNB	ácido ditionitrobenzóico
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
EIM	erros inatos do metabolismo
GPx	glutathione peroxidase
GTE	gliceroltrierucato
GTO	gliceroltrioleato
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
HTZ	heterozigotas
IRD	Doença de Refsum Infantil ( <i>Infantile Refsum Disease</i> )
KO	nocaute ( <i>knockout</i> )
MDA	malondialdeído
Mn-SOD	manganês superóxido dismutase

NALD	adrenoleucodistrofia neonatal ( <i>neonatal adrenoleukodystrophy</i> )
NO <sup>•</sup>	óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	ânion superóxido
OH <sup>•</sup>	radical hidroxila
OL	óleo de Lorenzo
ONOO <sup>•</sup>	peroxinitrito
ONS	óxido nítrico sintase
PBD	doenças da biogênese do peroxissomo ( <i>peroxisomal biogenesis disorders</i> )
PED	defeito de uma única enzima peroxissomal ( <i>single peroxisomal enzyme deficiencies</i> )
RNM	ressonância nuclear magnética
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
TAR	reatividade antioxidante total ( <i>total antioxidant reactivity</i> )
TAS	<i>status</i> antioxidante total ( <i>total antioxidant status</i> )
TBA-RS	espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico ( <i>thiobarbituric acid reactive species</i> )
THCA	ácido triidroxicolestanóico
TMO	transplante de medula óssea
TNB	ácido tionitrobenzóico
Tnf- $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa
VLCFA	ácidos graxos de cadeia muito longa ( <i>very long chain fatty acids</i> )
X-ALD	Adrenoleucodistrofia ligada ao X <i>X-linked adrenoleukodystrophy</i>
ZS	Síndrome de Zellweger ( <i>Zellweger syndrome</i> )
ZSD	doenças do Espectro Zellweger ( <i>Zellweger Spectrum disorders</i> )

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Erros Inatos do Metabolismo

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

Os EIM são individualmente raros, porém frequentes quando analisados em conjunto em pacientes pré-selecionados (Raine, 1974; Hall *et al.*, 1978). Estas doenças correspondem cerca de 10% de todas as doenças genéticas, isto é, aproximadamente 500 enfermidades envolvendo defeitos na síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Gimenez-Sanchez *et al.*, 2001).

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

- Grupo 1: distúrbios na síntese ou degradação de macromoléculas complexas. Fazem parte deste grupo as doenças lisossômicas de depósito e as doenças peroxissomais (ex: adrenoleucodistrofia ligada ao X (X-ALD), doença de Refsum, síndrome de Zellweger etc.).



- Grupo 2: erros inatos do metabolismo intermediário, que levam a intoxicação aguda ou crônica por acúmulo de componentes tóxicos e de metabólitos produzidos devido ao bloqueio de rotas metabólicas. Fazem parte deste grupo defeitos no metabolismo dos aminoácidos, ácidos orgânicos, ciclo da uréia e as intolerâncias aos açúcares.
- Grupo 3: doenças com deficiência de energia, os sintomas são causados pelo menos parcialmente por deficiência na produção ou utilização de energia resultante de erros inatos do metabolismo intermediário no fígado, miocárdio, músculo ou cérebro. Este grupo inclui as doenças de depósito de glicogênio, defeitos de gliconeogênese, acidemias lácticas congênitas, defeitos de oxidação dos ácidos graxos e doenças mitocondriais de cadeia respiratória.

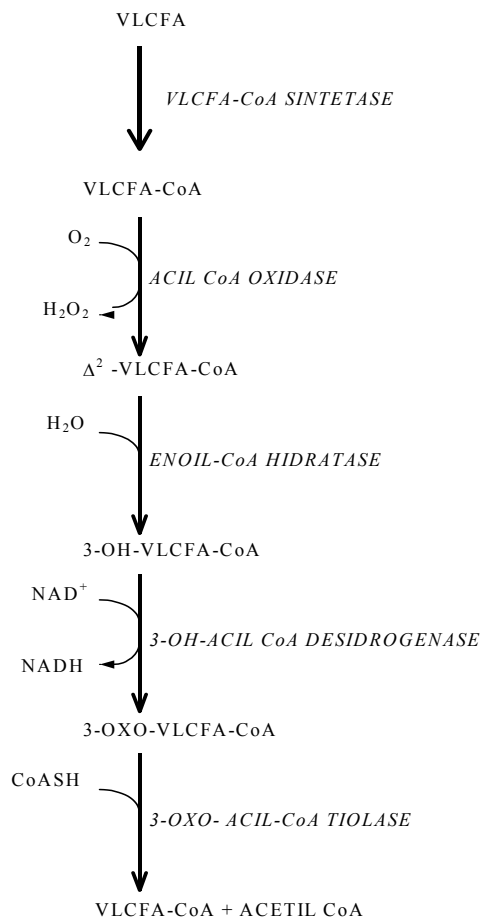
## 1.2 Peroxissomos

O peroxissomo é uma suborganela presente em quase todas as células eucarióticas (com exceção de eritrócitos maduros) e presente em todos os tecidos, principalmente no fígado e nos rins (Gould *et al.*, 2001). É uma organela de 0,2 a 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro, envolvida por uma única membrana sem estrutura interna, sem DNA próprio nem ribossomos e suas proteínas são importadas do citoplasma. Sua vida média é de aproximadamente 4 dias, sendo destruídas por autofagia (Olivier *et al.*, 2000; Kovacs *et al.*, 2002). Sua primeira descrição morfológica ocorreu no início dos anos 50 por Rhodin (1954) como “corpos esféricos ou ovais” presentes no citoplasma do túbulo renal proximal de camundongo. De Duve e Baudhuin (1966) isolaram e caracterizaram os peroxissomos como organelas subcelulares através de técnicas de centrifugação densidade-gradiente. Esses investigadores verificaram a presença de enzimas geradoras

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

Sabe-se que esta organela apresenta mais de 40 tipos de enzimas oxidativas e catalisa um grande número de reações essenciais de diferentes rotas metabólicas e, portanto, desempenha um papel extremamente importante no metabolismo (Olivier *et al.*, 2000). Um dos mais importantes processos metabólicos em que o peroxissomo está envolvido é a  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA *do inglês* “*Very Long Chain Fatty Acids*”) (Wanders *et al.*, 2001). Os peroxissomos também estão envolvidos: na biossíntese de fosfolípidios, de ácidos biliares, de colesterol e de intermediários de colesterol; na síntese de plasmalógenos; na oxidação de VLCFA, de ácidos de cadeia ramificada, de ácidos dicarboxílicos e de ácidos graxos poliinsaturados; no catabolismo de fitanato, de pipercolato e de glioxilato (Olivier e Krisans, 2000; Kovacs *et al.*, 2002; Steinberg *et al.*, 2006; Wanders e Waterhan, 2006).

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



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

Está bem estabelecido que os peroxissomos apresentam um importante papel tanto na produção quanto na eliminação das espécies reativas de oxigênio. Peroxissomos geram quantidades significativas de peróxido de hidrogênio através da ação de diversas oxidases peroxissomais que podem ser convertidas a espécies reativas de oxigênios mais agressivas. Porém, esta organela também contém múltiplas enzimas antioxidantes (por exemplo, catalase, glutathiona peroxidase, superóxido dismutase, peroxirredoxina I e epóxido hidrolase) que contribuem para a regulação dos níveis intracelulares das espécies reativas do oxigênio e, portanto, estresse oxidativo (Schrader e Fashimi, 2006).

### 1.3 Doenças Peroxissomais

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 dos indivíduos acometidos com estas enfermidades, os VLCFA, o ácido pipecólico, os ácidos biliares e os ácidos pristânicos e fitânico acumulam-se em graus variados (Ten Brink *et al.*, 1993). Sua incidência ultrapassa de 1: 25.000. As doenças peroxissomais estão subdivididas em 2 grandes grupos:

- Defeito de uma única enzima peroxissomal: nestas situações, a estrutura peroxissomal está intacta e presente, ocorrendo um defeito em uma única proteína peroxissomal. Isso faz com que apenas uma via metabólica peroxissomal seja afetada. Esse grupo inclui pelo menos 10 doenças: X-ALD (defeito no transporte da ALDP), hiperoxalúria tipo I (deficiência de alanina:glioxalato aminotransferase), doença de Refsum (deficiência de fitanoil-CoA hidrolase), forma rizomélica da condrodissplasia punctata tipo II e III (deficiências das diidroxiacetona fosfato aciltransferase e alquil diidroxiacetona fosfato sintase), doenças da  $\beta$ -oxidação como a deficiência da acil-CoA oxidase, deficiência da enzima bifuncional peroxissomal e a deficiência da tiolase peroxissomal (acil-CoA oxidase, proteína bifuncional e tiolase) e acatalasemia (deficiência da catalase) (Powers e Moser, 1998).
- Doenças da biogênese do peroxissomo (PBD): nestes casos, a organela não é formada normalmente e várias funções peroxissomais estão deficientes. Assim,

quando totalmente ausentes, essa disfunção afeta todas as vias metabólicas do peroxissomo. Podem ser divididas em dois subtipos: Espectro Zellweger e o espectro Condrodisplasia Rizomérica Punctata (forma condrodisplasia rizomérica da punctata tipo I). As doenças do Espectro Zellweger incluem a síndrome de Zellweger, a adrenoleucodistrofia neonatal e a forma infantil da doença de Refsum (Powers e Moser, 1998).

## 1.4 X-ALD

O primeiro caso de X-ALD foi descrito por Haberfeld e Spieler em 1910 em um menino de seis anos de idade com histórico de completa normalidade que passou a apresentar distúrbios visuais, apatia e inabilidade para andar. Aos sete anos de idade, o paciente já não falava mais, apresentava paraparesia e perda de consciência, indo a óbito oito meses depois do aparecimento dos primeiros sintomas (Moser *et al.*, 2001).

A X-ALD é a doença do metabolismo peroxissomal mais comum, cuja incidência mínima é de aproximadamente 1 em cada 17.000, somando –se os casos de hemizigotos e mulheres portadoras de X-ALD (Bezman *et al.*, 2001). Essa doença compromete principalmente a substância branca e os axônios do SNC, o córtex adrenal e os testículos. Está associada ao acúmulo de VLCFA, que são quase sempre saturados, sem ramificações, incluindo principalmente os ácidos hexacosanóico (C<sub>26:0</sub>) e tetracosanóico (C<sub>24:0</sub>). Os VLCFA acumulam-se em fluidos biológicos e tecidos na X-ALD devido a um defeito na degradação dessas substâncias, que normalmente ocorre nos peroxissomos. Esse distúrbio é devido a uma mutação no gene ABCD1 e resulta em defeito na  $\beta$  oxidação peroxissomal (Moser *et al.*, 2001).

O defeito primário da X-ALD envolve um único gene, denominado gene ABCD1 ou gene ALD, localizado no braço longo do cromossomo X (Xq28) (Moser *et al.*, 1992; Moser, 1997). Mosser e col. (1993) verificaram que o gene responsável pela X-ALD codifica uma proteína homóloga a proteína de membrana peroxissomal pertencente à família dos transportadores ABC (*do inglês "ATP binding cassette"*), denominada proteína ALD (ALDP), com 745 aminoácidos. Além de estarem associadas ao transporte através da membrana celular, os transportadores ABC também podem mediar o transporte de substâncias através das membranas intracelulares, como parece ser o caso do gene ALD, que atua na membrana dos peroxissomos (Auborg *et al.*, 1993; Contreras *et al.*, 1994). Atualmente, já foram identificadas mais de 974 mutações do gene ABCD1, que são responsáveis pela ausência ou insuficiência da ALDP (Di Benedetto *et al.*, 2009).

A proteína ALD é encontrada em todas as células da glia, incluindo a microglia e os oligodendrócitos (Migeon *et al.*, 1981). A ausência ou a disfunção da ALDP está relacionada com desmielinização (Moser, 1997). O dano neurológico na X-ALD pode ser mediado por ativação de astrócitos e indução de citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral  $\alpha$  - TNF $\alpha$ , interleucinas - IL1 $\beta$  e IL6) (Powers *et al.*, 1992; McGuinness *et al.*, 1997; Moser *et al.*, 2001).

A adrenoleucodistrofia ligada ao X pode se apresentar em uma ampla faixa etária e com diferentes manifestações dependendo da presença e do tipo de achados neurológicos. Os fenótipos da X-ALD abrangem desde uma doença infantil, bastante grave e de rápida progressão que pode levar a um estado vegetativo e morte em dois anos a partir do primeiro sintoma, até uma paraparesia lentamente progressiva com preservação do intelecto que se manifesta na idade adulta e é compatível com a vida

normal, adrenomieloneuropatia (Moser *et al.*, 1992). Estes dois fenótipos são os mais frequentes (Kemp *et al.*, 1996; Dubois-Dalcq *et al.*, 1999).

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

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

<b>Fenótipos masculinos</b>	<b>Descrição</b>	<b>Frequência relativa</b>
<b>Cerebral infantil (cALD/CCER)</b>	Início entre 3 e 10 anos. Desmielinização progressiva associada à resposta inflamatória cerebral. Deficiência cognitiva e neurológica de rápida e grave progressão. Insuficiência adrenal Estado vegetativo/óbito ocorre entre 2 a 4 anos após o início dos sintomas.	31-35%
<b>Cerebral juvenil</b>	Início entre 11 e 20 anos. Clínica semelhante à CCER, porém com progressão um pouco mais lenta. Insuficiência adrenal	4-7%
<b>Cerebral adulta</b>	Sintomas cerebrais semelhantes a CCER e sem envolvimento de medula espinhal. Insuficiência adrenal	2-3%
<b>Adrenomieloneuropatia (AMN) <i>AMN puro</i></b>	Início entre 21 e 29 anos. Envolvimento da medula espinhal, axonopatia e nervos periféricos. Lenta progressão. Insuficiência adrenal	25-30%
<b><i>AMN cerebral</i></b>	Além do envolvimento da medula espinhal e nervos periféricos, há o	10-12%

	acometimento inflamatório cerebral. Progressão mais rápida do que AMN“puro”	
<b>Olivo-ponto cerebelar</b>	Muito raro: 1 caso infantil; 7 adultos. Envolvimento cerebelar (Ataxia cerebelar)	1-2%
<b>“Addison only”</b>	Início por volta dos 7 anos de idade. Insuficiência adrenal primária. Sem evidência de anormalidade cerebral.	Variável com a idade. Mais de 50% na infância.
<b>Assintomático</b>	Sem evidência de anormalidade neurológica ou adrenal RNM normal	Diminui com a idade. Comum < 4anos. Muito raro > 40 anos
<b>Fenótipo em mulheres portadoras de X-ALD.</b>	<b>Descrição</b>	<b>Frequência relativa</b>
<b>Forma assintomática</b>	Sem evidência de anormalidade neurológica ou adrenal	Diminui com a idade. Maioria das mulheres < 30 anos neurologicamente não envolvidas.
<b>Mieloneuropatia</b>		Aumenta com o avançar da idade (> 40 anos)
<b>Branda</b>	Aumento dos reflexos dos tendões profundos e alterações sensoriais distais nas extremidades inferiores	50%.
<b>Moderada a severa</b>	Dados clínicos e patológicos semelhantes a AMN. Porém seu início é mais tardio e mais brando do que a forma AMN	15%.
<b>Cerebral</b>	Raramente visto na infância. Pouco mais comum na meia-idade.	2%
<b>Insuficiência Adrenal</b>	Rara a qualquer idade.	1%

Fonte: Moser *et al* (2001)

O diagnóstico da X-ALD pode ser sugerido pela sintomatologia clínica do paciente, nos exames de neuroimagem e é realizado bioquimicamente pela detecção de níveis plasmáticos elevados de VLCFA.



O comprometimento do SNC pode ser detectado por exames de ressonância nuclear magnética (RNM) e também avaliado através de um sistema de pontuação desenvolvida por Loes e col. (1994). Nesse sistema, é estipulada uma pontuação crescente (0 a 34 pontos) para cada RNM, levando em conta a localização, a extensão dos danos cerebrais, o acometimento neuroanatômico e a presença de atrofiais focais ou globais, onde zero significa ausência de lesões e 34 é o máximo de dano e atrofia cerebral (Loes *et al.*, 2003).

A apresentação de níveis anormalmente elevados de VLCFA saturados em fluidos corporais como soro ou plasma e/ou em tecidos acessíveis como fibroblastos cultivados, leucócitos, eritrócitos, fígado e músculo determinam o diagnóstico bioquímico de X-ALD (Moser *et al.*, 2001). Pela facilidade de obtenção, a análise de soro ou de plasma tem sido a mais utilizada na rotina. A maioria dos laboratórios utiliza 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 e a quantificação por cromatografia gasosa (Dacremont *et al.*, 1995). Para a correta interpretação do resultado das análises, é necessário a concentração do ácido hexacosanóico ( $C_{26:0}$ ), bem como, verificar as razões  $C_{26:0}/C_{22:0}$  (ácido hexacosanóico/ácido docosanóico) e  $C_{24:0}/C_{22:0}$  (ácido tetracosanóico/ácido docosanóico). Apesar das concentrações de VLCFA em pacientes X-ALD serem menos acentuadas do que outras doenças peroxissomais, na maior parte das vezes (acima de 90%) todos os três parâmetros estão mais do que dois desvios padrões acima dos valores médios dos controles (Wanders *et al.*, 1995).

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

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

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

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

A detecção de heterozigotos é possível na X-ALD através da análise dos VLCFA no soro ou fibroblastos ou pela análise de DNA (Seneca e Lissens, 1995; Moser *et al.*, 2001). Segundo Moser e col. (2001) 80% dos heterozigotos obrigatórios apresentam níveis anormais de VLCFA plasmático. Tal percentagem é mais alta (95%) ao analisar os níveis de VLCFA em fibroblastos, o que indica que a detecção de 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 no afetado, permitindo, deste modo, a identificação precisa da mulher portadora (Migeon *et al.*, 1981; Auborg *et al.*, 1987).

Três modelos animais de X-ALD foram descritos (Forss-Peter *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1997). Esses modelos foram baseados principalmente na inativação do gene ABCD1. Tais modelos reproduzem os defeitos do metabolismo dos VLCFA e as anormalidades adrenocorticais vistas histologicamente, o que, de alguma forma, lembra a doença humana. Entretanto, os animais X-ALD não apresentam

fenótipo neurológico, evidenciando apenas leves alterações em idade avançada (em torno dos 20 meses), o que mostra alguma semelhança com a forma clínica AMN ou forma mielopática de uma heterozigota para X-ALD (Lu *et al.*, 2007).

Apesar das pesquisas e dos esforços em andamento, o tratamento para X-ALD é ainda considerado experimental, não havendo nenhuma terapia satisfatória. Além da terapêutica de suporte e fisioterápica, várias opções de tratamentos (dietoterapia com óleo de Lorenzo, uso de drogas e transplante de medula óssea) têm sido utilizadas e estudadas na tentativa de atingir os três principais objetivos de um tratamento bem sucedido: estabilizar a insuficiência adrenal, diminuir a concentração de VLCFA no plasma e diminuir a desmielinização no cérebro.

A insuficiência adrenal pode ser letal caso não seja tratada devido às baixas concentrações plasmáticas de cortisol e às elevadas concentrações plasmáticas 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 glicorticóide (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 (Van Geel *et al.*, 1997; Moser *et al.*, 2001).

Rizzo e col. (1989) demonstraram que a administração de gliceroltrioleato (GTO) juntamente com gliceroltrierucato (GTE) na proporção de 4:1 diminui acentuadamente os VLCFA no plasma. Essa mistura foi denominada “Óleo de Lorenzo” (OL) em homenagem a Lorenzo, menino que apresentava cALD e cujos pais foram os principais incentivadores da produção desse óleo. A mistura 4:1 de GTO e GTE normalizou os níveis de C<sub>26:0</sub> em quatro semanas de tratamento no plasma da maioria dos pacientes. O

tratamento com OL juntamente com uma dieta que restringe o consumo de gorduras saturadas resulta em uma importante diminuição dos VLCFA acumulados, portanto uma considerável melhora bioquímica. A dosagem recomendada do OL é dependente da idade, do peso corporal e das condições do paciente. Em geral, administra-se 2-3ml/kg/dia do óleo (Van Duyn *et al.*, 1984). Vários estudos foram realizados no intuito de verificar a validade do uso do OL no tratamento de X-ALD. Foi verificado que o OL reduz os níveis de C<sub>26:0</sub> no plasma, deixando-os próximos aos níveis normais. Entretanto, em pacientes com sintomas neurológicos, o uso desse tratamento não reduz ou prorroga a progressão da doença. Assim, por não beneficiar significativamente a clínica de pacientes sintomáticos, seu uso não parece ser justificado nestes pacientes devido seus efeitos colaterais, como a trombocitopenia (Zinkham *et al.*, 1993, Moser *et al.*, 2001). Entretanto, 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 8 anos em que foi evidenciado que a redução do C<sub>26:0</sub> estava associada a um menor risco de desenvolver alterações na Ressonância Nuclear Magnética (Moser *et al.*, 2005).

O transplante de medula óssea (TMO) é o método mais efetivo 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 e normaliza os níveis de VLCFA a longo prazo (Moser *et al.*, 2001). O primeiro TMO ocorreu em 1984 em um menino de 12 anos de idade, já com comprometimento neurológico importante. Suas anormalidades cerebrais não melhoraram após o transplante e ele morreu 141 dias após a cirurgia (Moser *et al.*, 2001). Estudos subsequentes afirmaram que TMO em pacientes com maior incapacidade neurológica não melhorava o estado neurológico e poderia até acelerar a deterioração. O primeiro TMO bem sucedido ocorreu em 1990 em um

menino de 8 anos de idade com anormalidades leves na função psicométrica, na função motora, no estado neurológico e na imagem de ressonância magnética. O procedimento regrediu as manifestações neurológicas e restaurou suas funções cognitivas como normais, apesar dos leves aumentos iniciais nos níveis de VLCFA (Auborg *et al.*, 1990). Shapiro *et al.* (2000) em estudo de acompanhamento de 12 pacientes cALD submetidos a TMO 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 VLCFA, deixando-os pouco acima dos níveis normais. Peters e colaboradores (2004) relataram a experiência em âmbito internacional do transplante em pacientes cALD entre os anos de 1982 a 1999 e concluíram que os resultados de TMO em pacientes com leve envolvimento neurológico eram bastante animadores e apresentavam bastante benefícios, enquanto que os meninos X-ALD com avançado grau de comprometimento neurológico não seriam candidatos ao TMO e sim a terapias experimentais. O tratamento seria indicado, então, para pacientes com alterações sutis nos exames neurológicos, neuropsicológicos e de imagem, como RNM 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). Os mecanismos de ação desses efeitos benéficos do TMO ainda não estão completamente compreendidos. Acredita-se que os seguintes fatores estejam envolvidos: a) o suprimento de enzimas normais ao cérebro através de células derivadas do TMO (microglia); b) imunossupressão associada com o transplante; c) a transferência de um gene modificador favorável. 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 VLCFA acumulados diretamente no SNC. Ainda acredita-se que o mecanismo esteja relacionado à interrupção do processo inflamatório no SNC associado ao dano a mielina. Devido a seus altos riscos e a necessidade de se ter um doador imunologicamente compatível, a indicação desse procedimento deve ser cuidadosamente analisada (Moser et al., 2001; Peter et al., 2004; Mahmood et al., 2005).

A resposta inflamatória, a qual pode ser mediada através das citocinas inflamatórias ou por mecanismos imunes, parece ter grande importância na patogênese das lesões desmielinizantes na X-ALD (Powers *et al.*, 1992; McGuinness *et al.*, 1997; Moser *et al.*, 2001). Assim, considerando a rápida progressão dessas lesões em X-ALD possivelmente associadas à resposta inflamatória no cérebro, a redução dessa resposta é terapeuticamente interessante. Até então, esforços em atingir esse objetivo não obtiveram sucesso, tendo sido testados ciclofosfamida e interferon  $\beta$ -1a (Stumpf *et al.*, 1981; Korenke *et al.*, 1997). Estudos aprofundados parecem ser necessários para avaliar estes aspectos.

Singh e col. (1998 a e b) verificaram que a lovastatina (um inibidor da 3-hidróxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase) e o fenilacetato de sódio (inibidor do mevalonato pirofosfato descarboxilase) normalizaram os níveis de VLCFA em fibroblastos de pele de pacientes X-ALD. Singh e col. (1998b) mostraram em modelos animais que a lovastatina e o fenilacetato de sódio inibem a liberação das citocinas pró-inflamatórias e a indução da óxido nítrico sintetase (ONS) envolvidas na patogênese do dano neurológico na X-ALD. A resposta clínica à terapia com lovastatina foi estudada por Pai e col. (2000), principalmente por ela inibir o processo neuroinflamatório característico da doença, demonstrando uma diminuição nos níveis plasmáticos de VLCFA em 12 pacientes X-ALD. No entanto, estudos *in vivo* demonstraram que o tratamento de ratos

“nocaute” (KO) para X-ALD com lovastatina e com simvastatina (outro inibidor da 3-OH-HMG-CoA redutase) não resultou em qualquer mudança ou resultou até em aumento dos níveis teciduais de VLCFA, respectivamente (Cartier *et al.*, 2000; Yamada *et al.*, 2000). Cabe salientar que os animais KO para X-ALD, são modelos que não mimetizam as características neuroinflamatórias encontradas nas formas cALD.

No futuro, a terapia genética, poderá ser o passo fundamental para a possibilidade de cura da X-ALD. Atualmente, estudos estão em andamento demonstrando a correção da beta-oxidação peroxissomal depois de uma transferência viral de cDNA em fibroblastos e células hematopoiéticas, porém não são suficientemente eficazes para justificar testes clínicos (Unterranier *et al.*, 2000; Cartier, 2001).

## **1.5 Espectro Zellweger**

Em 1964, Hans Zellweger e colaboradores descreveram o primeiro caso de uma doença congênita e fatal que afetava cérebro, fígado, retina, ossos e rins, que atualmente é conhecido como síndrome hepato-cerebro-renal de Zellweger ou Síndrome de Zellweger. O primeiro relato de que esta anomalia congênita era causada pelo defeito da biogênese dos peroxissomos foi apresentado por Sidney Goldfisher e colaboradores em 1973. Desde então, outros fenótipos menos graves como adrenoleucodistrofia neonatal (NALD) e a doença de Refsum Infantil foram descritos. Sendo assim, a Síndrome de Zellweger (SZ), adrenoleucodistrofia neonatal e doença de Refsum Infantil constituem o Espectro de Zellweger que é assim denominado por envolver esses três fenótipos de maior a menor gravidade de acometimento da doença da biogênese peroxissomal em que a clínica se sobrepõe. Todas essas doenças, que se manifestam na fase neonatal e no início da primeira infância, são herdadas de forma autossômica recessiva e sua

incidência mínima é estimada em 1:50 000-100 000 (Gould *et al.*, 2001; Steinberg *et al.*, 2006).

Os pacientes com o Espectro Zellweger apresentam carência de algumas funções, como: não conseguem degradar ácidos graxos de cadeia muito longa, devido ao defeito na beta oxidação peroxissomal; não podem sintetizar plasmalógenos (éter de fosfolipídios); não sintetizam completamente os lipídios intermediários do metabolismo dos ácidos biliares; apresentam problemas no catabolismo do ácido pipecólico e com a oxidação dos ácidos fitânico e pristânico, obtendo como resultado o acúmulo em tecidos (Gould *et al.*, 2001; Steinberg *et al.*, 2006).

As doenças do Espectro Zellweger se devem a mutação ou mutações nos genes PEX que normalmente codificam as proteínas peroxinas, cujas expressões apropriadas são necessárias para a biogênese do peroxissomo. Mais de 14 mutações já foram descritas (Gould *et al.*, 2001; Wanders e , 2004; Steinberg *et al.*, 2006).

A Síndrome de Zellweger clássica tem como a principal manifestação clínica dismorfias craniofaciais que incluem fronte alta, fontanela ampla, palato ogival, nariz achatado, hipoplasia das pontes supraorbitais, epicanto e deformidade dos lóbulos das orelhas, assim como manifestações de dano cerebral. As anormalidades cerebrais nestes indivíduos incluem displasias corticais, microgiria, defeitos na migração neuronal e desmielinização. Os pacientes apresentam disfunções neurológicas como grave retardo neuropsicomotor, hipotonia profunda, hiporreflexia, crises convulsivas durante o período neonatal. Além disso, outros problemas estão presentes, como glaucoma, degeneração da retina, opacificação corneana, catarata, cegueira, surdez em diferentes graus, hepatomegalia e anormalidades hepáticas (colestase, fibrose hepática). Alguns destes pacientes geralmente apresentam calcificações puntiformes nas epífises ósseas (patela), malformações cardíacas e pequenos cistos renais e esplênicos. A maior parte



dos afetados falece durante o primeiro ano de vida (Gould *et al.*, 2001; Steinberg *et al.*, 2006).

A adrenoleucodistrofia neonatal e a doença de Refsum infantil (IRD) se encaixam na faixa menos severa do Espectro Zellweger. Para NALD, os achados clínicos mais característicos são a desmielinização cerebral com a possibilidade de apresentar paquiplimicrogirria e as dismorfias mínimas ou ausentes. Ao nascimento ou à tenra infância, o que chama atenção é a marcante hipotonia muscular sem resposta a estímulos. Além disso, estes pacientes apresentam convulsões, porém não costumam apresentar cistos renais, nem calcificações ósseas. Alguns pacientes mimetizam uma doença neuromuscular semelhante a uma atrofia muscular espinhal como a doença de Werdnig-Hoffman (Gould *et al.*, 2001; Steinberg *et al.*, 2006).

Na Doença de Refsum Infantil, a característica principal é a idade inicial mais avançada da instituição dos sintomas, além da maior sobrevida, mesmo apresentando alguns sintomas semelhantes a da SZ. Os pacientes com a IRD apresentam mínimas dismorfias faciais e normalmente começam seu desenvolvimento neuromuscular de forma normal para posteriormente desenvolver problemas neurológicos entre o primeiro e o terceiro ano de vida. Estes problemas de desenvolvimento cognitivos e motores englobam moderados problemas de aprendizagem, problemas auditivos (surdez) e visuais, estes últimos devido a retinopatia. Essa forma clínica não apresenta defeito na migração neuronal, nem alteração progressiva da substância branca (Gould *et al.*, 2001; Steinberg *et al.*, 2006).

Todas as doenças que apresentem alguma anormalidade na metabolização lipídica peroxissomal apresentam disfunções neurológicas com diferentes graus de gravidade. Nas doenças do Espectro Zellweger, há três tipos de envoltimentos no SNC característicos: alterações na migração neuronal, anormalidades na formação e

manutenção da substância branca e degeneração e envolvimento neuronal seletivo. A migração neuronal anormal com heterotopias de algum grupo de neurônios que não puderam migrar ao córtex caracteriza displasia neocortical. Também é observado heterotopias de células de Purkinje no cerebelo. A anormalidade na substância branca nessas doenças é devida um defeito na formação da mielina, ou seja, desmielinização, o que também está presente nas regiões cerebelares (olivo-cerebelares) e/ou cerebrais. O grau e a seriedade da degeneração e do envolvimento neuronal variam com o grau da gravidade clínica e o envolvimento bioquímico, e a maioria dessas alterações e degenerações começa no período pré-natal e pós-desenvolvimento neuronal (Gould *et al.*, 2001; Steinberg *et al.*, 2006).

Para o diagnóstico de uma doença peroxissomal como o Espectro Zellweger, devem ser considerados as manifestações clínicas, a idade do início dos sintomas e principalmente as determinações bioquímicas. Nessas enfermidades são observadas alterações nos níveis plasmáticos de VLCFA, dos ácidos pristânico, fitânico, pipercolico e biliares (ácidos triidroxicoletanóico - THCA e diidroxicoletanóico - DHCA) e também a ausência da síntese de plasmalógenos detectada nas hemácias. As anormalidades bioquímicas detectadas em sangue e ou urina também devem ser confirmadas em cultura de fibroblastos (Gould *et al.*, 2001; Steinberg *et al.*, 2006).

Dois modelos animais para essas doenças já foram descritos em que há deleção de genes PEX. No primeiro caso, o modelo foi obtido pela depleção do gene PEX5 (Baes *et al.*, 1997). Os animais afetados apresentaram um retardo no crescimento intra-uterino, porém nasceram vivos e com características mendelianas compatíveis, morrendo apenas dois dias após o nascimento. Estudos histológicos no neocortex desses animais evidenciaram um defeito na migração e na maturação neuronal, bem como uma extensiva morte neuronal apoptótica, condizente com o encontrado em pacientes ZS. O

outro modelo animal envolve a depleção do gene PEX 2 (Faust e Hatten, 1997). Os camundongos nasceram extremamente hipotônicos e hipoativos, morrendo algumas horas depois. Os animais apresentaram níveis elevados de VLCFA e diminuídos de plasmalógenos. O SNC apresentou uma expressiva anormal migração neuronal, semelhante ao encontrado em pacientes ZS (Gould *et al.*, 2001; Steinberg *et al.*, 2006).

O tratamento para estas enfermidades é essencialmente sintomático. A administração de anticonvulsivantes frente a uma convulsão e de vitamina K para melhorar transtornos hemorrágicos relacionados com a hepatopatia. Em geral, tenta-se limitar o consumo de gorduras saturadas, de VLCFA e de ácido fitânico. Os pacientes que apresentam um quadro com menor gravidade podem ser beneficiados com o uso de ácido docosahexaenóico (DHA). O DHA é um ácido graxo insaturado (6 ligações duplas e 22 carbonos) e é um produto fisiológico, sendo um componente fundamental para as membranas celulares, principalmente na retina e no cérebro (Martinez *et al.*, 1993; Martinez *et al.*, 2000). Os indivíduos com SZ e os outros fenótipos relacionados apresentam níveis de DHA diminuídos no cérebro, na retina e plasma e por isso a sua administração pode ser útil a estes indivíduos.

## **1.6 Radicais livres e espécies reativas**

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

qualquer espécie capaz da existência independentemente de conter um ou mais elétrons não pareados, como por exemplo, anion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxila (OH) e óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) (Halliwell e Gutteridge, 1990).

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

Entretanto, há compostos tão reativos quanto os radicais livres que não possuem elétrons desemparelhados na última camada, classificados como espécies reativas. As espécies reativas de oxigênio (ERO) são derivadas de oxigênio e não são necessariamente radicalares, como peróxido de hidrogênio e oxigênio *singlet* (Drodge, 2002). A redução parcial de oxigênio ocorre nos sistemas biológicos, gerando as ERO que são potencialmente lesivas a proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. O radical superóxido e outras ERO são formados em todos os organismos aeróbios por reações enzimáticas e não enzimáticas, assim seus níveis aumentam tanto em processos fisiológicos quanto em patológicos, mas há mecanismos eficientes para sua desintoxicação (Bergendi *et al.*, 1999).

Além das ERO, existem as espécies reativas de nitrogênio (ERN). O óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) é um radical livre gerado nos sistemas biológicos pela óxido nítrico sintase (ONS). Devido aos seus efeitos na neurotransmissão, na vasodilatação e na resposta imune,  $NO^{\bullet}$  desempenha um papel importante em aspectos fisiológicos, em patológicos e em farmacológicos (Giulivi, *et al.*, 1998). A toxicidade da  $NO^{\bullet}$  envolve reações de oxidação, mas o óxido nítrico por si só é um fraco oxidante. Contudo, o óxido nítrico pode ser convertido a um potente oxidante ao reagir com o radical superóxido

produzindo peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e o seu conjugado ácido, o ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ). O peroxinitrito é capaz de oxidar tióis, lipídios e resíduos de metionina no sítio ativo do inibidor da  $\alpha 1$  proteinase (Pryor *et al.*, 1994).

## **1.7 Defesas antioxidantes**

A formação de radicais livres é um processo que pode decorrer de processos metabólicos normais e também de exposição a fatores ambientais como irradiação (luz UV, raios X e  $\gamma$ ) e poluentes na atmosfera (ozônio,  $\text{N}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2$ , fumaça de cigarro) (Ames *et al.*, 1993; Matés *et al.*, 1999; Halliwell e Gutteridge, 2007). Para evitar o dano celular por todo esse processo, os sistemas biológicos desenvolveram sistemas de defesa antioxidante, convertendo as espécies reativas em derivados inativos (Halliwell, 1994). Esses mecanismos de defesa incluem a prevenção da formação de radicais livres (antioxidantes preventivos), remoção de radicais livres e processos de reparos (Travacio e Llesuy, 1996; Matés *et al.*, 1999).

Os antioxidantes podem ser definidos como ‘qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, significativamente retarda ou previne a oxidação desse substrato’ (Halliwell e Gutteridge, 2007). Os antioxidantes podem ser enzimáticos e não-enzimáticos.

### **1.7.1 Enzimas antioxidantes**

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

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

Catalase é uma hemoproteína presente em todas as células de mamíferos e está localizada, principalmente, nos peroxissomos. A catalase está presente nos eritrócitos e no fígado e em menor extensão no plasma, no coração, no pulmão e no cérebro, pois são órgãos que possuem um menor número de peroxissomos. Essa enzima controla os níveis de peróxido de hidrogênio, pois é responsável pela sua degradação: catalisa a transformação de duas moléculas de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Travacio e Llesuy, 1996; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Superóxido dismutase é uma enzima presente em todos os organismos aeróbios, que catalisa a dismutação de dois radicais superóxidos, formando  $H_2O_2$  e  $O_2$ . Esta reação pode ocorrer de modo espontâneo em pH fisiológico, porém quando a SOD está presente a velocidade desta reação é  $10^4$  vezes maior (Halliwell e Gutteridge, 2007). Existem dois tipos principais:

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

Glutathiona peroxidase é a enzima que catalisa a decomposição de hidroperóxidos, utilizando a glutathiona reduzida como co-substrato. A redução de hidróxidos orgânicos e inorgânicos se dá através da glutathiona reduzida (GSH) para formar glutathiona oxidada (GSSG) e o produto de redução dos hidroperóxidos (a água ou álcoois) (Travacio e Llesuy, 1996). A glutathiona peroxidase é encontrada em todos os tecidos animais, apresentando alta atividade no fígado e nos eritrócitos, mas apresenta baixa atividade nos pulmões, no coração e menor ainda nos músculos. Essa enzima é considerada um

dos principais sistemas de defesa antioxidante (Matés *et al.*, 1999; Halliwell e Gutteridge, 2007).

### **1.7.2 Defesas antioxidantes não enzimáticas**

As defesas antioxidantes não enzimáticas compreendem as proteínas ligantes de metal (como a transferrina, a hemopexina, a ceruloplasmina e a ferritina), os metabólitos e co-fatores (ácido úrico, bilirrubina), os componentes provenientes da dieta [como tocoferóis (vitamina E e  $\alpha$ -tocoferol), ácido ascórbico, carotenóides, a vitamina A, bioflavonóides]. Além desses, estão incluídos a glutathione, a melatonina, a haptoglobina e a albumina, entre outras. O modo de atuação dos antioxidantes para proteger o organismo contra a ação de radicais livres é bastante diverso, podendo abranger remoção do oxigênio presente no meio, sequestro das ERO ou precursores, bem como a inibição da formação dessas espécies reativas (Halliwell, 1994). Outros mecanismos utilizados são o de quelatação de íons metálicos por meio de proteínas transportadoras (ferritina e transferrina), o de reparo do DNA e o de degradação de proteínas lesadas (Halliwell e Gutteridge, 2007).

## **1.8 Estresse Oxidativo**

Normalmente, são produzidas durante o metabolismo celular aeróbico várias substâncias eletricamente instáveis e potencialmente reativas (os radicais livres) com moléculas biológicas capazes de causar oxidação e dano irreversível à célula. O organismo está normalmente em equilíbrio entre a produção e degradação de radicais livres que existem em baixas concentrações em todos os tecidos biológicos (Wulf,

2001). Quando um desequilíbrio ocorre entre a capacidade antioxidante e as espécies reativas produzidas (pró-oxidantes), em favor destas, cria-se um estado que se denomina estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Perante o estresse oxidativo, o organismo pode reagir de duas formas: adaptando-se ou sofrendo injúria celular. Em um caso de estresse oxidativo brando, as células suportam e respondem a essa situação com um aumento na produção de defesas antioxidantes, tentando com essa adaptação restabelecer o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante. Entretanto, um estresse oxidativo severo pode causar injúria celular e quando muito intenso produz danos irreversíveis que leva a morte celular (Halliwell e Gutteridge, 2007).

O desequilíbrio pró-oxidante/antioxidante pode causar dano a todos os tipos de biomoléculas (DNA, proteínas e lipídios). Assim, as principais conseqüências secundárias ao estresse oxidativo em sistemas biológicos são: lipoperoxidação da membrana celular, oxidação de proteínas e lesão DNA/RNA celular (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A peroxidação de lipídios de membrana (lipoperoxidação) é um processo fisiológico contínuo que ocorre nas membranas celulares decorrente da ação dos radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 2007). Os principais efeitos da lipoperoxidação sobre a membrana são a lesão na membrana, alteração da fluidez da membrana, o aumento da permeabilidade, alterando a seletividade e as trocas iônicas, acarretando o influxo excessivo de cálcio, o qual ativa as enzimas autolíticas causando proteólise e morte celular. Esses efeitos dependem de quão sensível o tecido (quantidade de material lipídico, nível de defesa antioxidante) está para a lipoperoxidação (Halliwell e Gutteridge, 2007).



A oxidação de proteínas decorre, principalmente, da ação dos radicais livres sobre os grupos tióis (grupo sulfidril e metionil), causando também agregação e fragmentação de aminoácidos, o que leva a desnaturação (Arkezenov e Markesbery, 2001). Também ocorre, na oxidação protéica, a formação de grupos carbonilas que se deve a reação de oxidação entre a cadeia lateral de alguns aminoácidos e espécies reativas (Reznick e Parker, 1994). Algumas das consequências da oxidação protéica são: a redução ou a inativação da atividade enzimática, o dano a receptores, o dano de vias de transdução de sinais e de transporte prejudicados (Halliwell e Gutteridge, 2007).

As espécies reativas produzem uma grande variedade de danos ao DNA, podendo provocar a cisão do anel desoxirribose dos ácidos nucleicos e o rompimento da ligação glicose-fosfato, com liberação de bases livres dos nucleotídeos. Isso promove inibição da síntese protéica e mutações, o que pode contribuir e ser de grande importância para origem de diversas doenças, como diversos tipos de câncer, Síndrome de Bloom, doença de Parkinson, entre outras (Halliwell e Gutteridge, 2007).

### **1.8.1 Estresse oxidativo e o sistema nervoso central**

Várias doenças neurológicas nas quais parece haver envolvimento de radicais livres em sua fisiopatologia estão descritas: doença de Parkinson, doença de Alzheimer, isquemia, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, doenças inflamatórias, epilepsia, etc (Reznick e Packer, 1993; Przedborski *et al.*, 1996; Ben-Menachem *et al.*, 2000). O cérebro tem concentrações relativamente baixas 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 (Reznick e Packer, 1993; Halliwell e Gutteridge, 2007). Assim, 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. Ainda, o dano oxidativo pode atacar a bainha de mielina através de macrófagos diretamente por lipoperoxidação e indiretamente por ativação de proteases e fosfolipases. Evidências para existência de danos oxidativos e nitrativos dentro de lesões desmielinizantes incluem tanto a presença de peróxidos lipídicos e protéicos, como nitrotirosinas, um marcador de formação de peroxinitrito (Smith *et al.*, 1999; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Além disso, há outras razões para tamanha vulnerabilidade que o cérebro apresenta perante o estresse oxidativo, tais como (Halliwell e Gutteridge, 2007):

- Alto transporte de  $\text{Ca}^{++}$  através de membranas neuronais, sendo que qualquer alteração neste fluxo pode gerar estresse oxidativo;
- Presença de aminoácidos excitotóxicos, que podem gerar estresse oxidativo;
- Alto consumo de oxigênio por unidade de massa de tecido;
- Presença de neurotransmissores muitos das quais são moléculas auto-oxidáveis;
- Presença de altas concentrações de ferro em algumas áreas cerebrais (por exemplo a substância nigra, o núcleo caudado, o putamen e o globus palidus);
- Geração de peróxido de hidrogênio pelo metabolismo cerebral normal, um exemplo disso é a oxidação da dopamina pela monoaminoxidase (MAO);
- Algumas células gliais (microglia), como os macrófagos, podem produzir  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  quando ativados.

### 1.8.2 Estresse oxidativo e marcadores sanguíneos

Evidências têm se acumulado mostrando que o dano gerado pelos radicais livres é importante em algumas doenças neurodegenerativas, em doenças crônico-inflamatórias,

nas doenças vasculares e no câncer (Halliwell e Gutteridge, 1996), sendo essas resultantes (ou geradoras) de um desbalanço redox na produção e consumo de espécies reativas de oxigênio e/ou de nitrogênio, os quais podem causar danos e perda de funções a proteínas, polissacarídeos, lipídios e DNA. Esse desequilíbrio redox pode ser analisado em sangue humano total ou em um dos seus constituintes, como eritrócitos, leucócitos, plasma e soro. Essas amostras biológicas são fontes de marcadores *in vivo* de estresse oxidativo, uma vez que através do sangue circulam antioxidantes, outras substâncias que sofreram ação das espécies reativas e produtos de reações entre espécies reativas e biomoléculas (Dalle-Donne *et al.*, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007).

O sistema antioxidante sanguíneo é classificado como enzimático e não-enzimático. O enzimático, representado pelas enzimas antioxidantes (CAT, GPx, SOD), está presente predominantemente no meio intracelular, sendo então os eritrócitos as amostras mais adequadas para análise. O sistema antioxidante não-enzimático é formado por diversas substâncias, tais como, glutathiona, vitamina C, tocoferóis, beta-caroteno, ácido úrico, transferrina e ceruplasmina e se localiza no meio extracelular, com exceção da glutathiona (intracelular), por isso é analisado em soro ou plasma (Travacio e Llesuy, 1996; Matés *et al.*, 1999; Dalle-Donne *et al.*, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007).

As biomoléculas reagem com ERO e ERN, produzindo diversos produtos que são considerados marcadores de dano oxidativo, que podem ser identificados no sangue, como dano a lipídios (produtos de lipoperoxidação: malondialdeído), a proteínas (produtos da oxidação protéica: conteúdo de sulfidrilas e de carbonilas) e ao DNA. Essas substâncias podem ser analisadas por determinações espectrofotométricas, cromatográficas e eletroanalíticas. (Dalle-Donne *et al.*, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007).

### 1.8.3 Estresse oxidativo e os erros inatos do metabolismo

Acredita-se que o estresse oxidativo possa estar envolvido em diferentes erros inatos do metabolismo (Colomé *et al.*, 2000; Wajner *et al.*, 2004). Foi observado que a geração de radicais livres pode participar da disfunção neurológica de algumas acidemias orgânicas, como as acidemias propiônica e metilmalônica (Fontella *et al.*, 2000), bem como na acidemia glutárica (Kolker *et al.*, 2001; Latini *et al.*, 2002; Latini *et al.*, 2005). Além disso, os radicais livres parecem estar envolvidos na fisiopatologia de algumas aminoacidopatias como fenilcetonúria (Sierra *et al.*, 1998; Artuch *et al.*, 2004; Sirtori *et al.*, 2005; Sitta *et al.*, 2006; Sitta *et al.*, 2009), homocistinúria (Streck *et al.*, 2003; Stefanello *et al.*, 2005), tirosinemia tipo I (Bird *et al.*, 1995) e Doença da Urina do Xarope do Bordo (Bridi *et al.*, 2003; Bridi *et al.*, 2005; Barschak *et al.*, 2006; Barschak *et al.*, 2007; Barschak *et al.*, 2008).

Vargas *et al.* (2004) verificaram que vários parâmetros de estresse oxidativo estão alterados em plasma, eritrócitos e fibroblastos de pacientes sintomáticos 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. Postula-se então que o mesmo poderia explicar ao menos em parte o comprometimento neurológico dos pacientes portadores desta doença. Ainda, Deon e colaboradores (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.

Aumentos de produto do óxido nítrico (nitritos e nitratos) e de ânion superóxido foram encontrados em células gliais suplementadas com C<sub>26:0</sub>, principal ácido graxo de cadeia muito longa acumulado na X-ALD (Di Biase *et al.*, 2004). Segundo os autores, a liberação desses produtos oxidativos indica que os radicais livres têm papel importante

na patogênese da resposta neuroinflamatória na X-ALD.

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

Estudos *post mortem* em córtex adrenal e cérebro de pacientes com X-ALD demonstraram evidências de estresse oxidativo nesta doença (Powers *et al.*, 2005). O estresse oxidativo foi evidenciado através do aumento da expressão das enzimas manganês-superóxido dismutase e hemoxigenase-1, que constituem o sistema antioxidante cerebral. O dano oxidativo foi evidenciado através do aumento tecidual da lipoperoxidação detectado pelo aumento da produção de malondialdeído e de 4-hidroxinonenal. A presença de proteínas nitrosiladas nas lesões desmielinizantes evidencia a participação do peroxinitrito, uma das moléculas mais danosas dentre as espécies reativas do nitrogênio.

Acredita-se que o acúmulo dos metabólitos tóxicos dos EIM possa induzir ou estar relacionado à geração de radicais livres nessas doenças, contribuindo para a fisiopatologia destas doenças, apesar do mecanismo responsável pelo estresse oxidativo nos EIM não estar ainda completamente esclarecido.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar parâmetros de estresse oxidativo nas doenças peroxissomais como: adrenoleucodistrofia ligada ao X e as doenças do Espectro Zellweger.

### **2.2 Específicos**

**2.2.1 Capítulo 1.** Avaliar o efeito do tratamento com óleo de Lorenzo sobre os níveis plasmáticos de  $C_{26:0}$  e  $C_{26:0}/C_{22:0}$  em pacientes portadores das formas cerebral infantil e assintomáticos com X-ALD.

**2.2.2 Capítulo 2.** Avaliar parâmetros de estresse oxidativo como as espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e o status antioxidante total (TAS) em plasma de pacientes sintomáticos e assintomáticos com X-ALD.

**2.2.3 Capítulo 3.** Avaliar parâmetros de estresse oxidativo como as espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), o status antioxidante total (TAS) e a reatividade antioxidante total (TAR) em plasma de mulheres heterozigotas para X-ALD.

**2.2.4 Capítulo 4.** Avaliar parâmetros de estresse oxidativo como o conteúdo total de tióis, as espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e o status antioxidante total (TAS) em plasma de pacientes portadores de doenças do Espectro Zellweger.

### **3. RESULTADOS**

Os resultados estão apresentados na forma de artigos científicos.

#### **3.1 Capítulo 1 – Artigo1**

*Hexacosanoic and docosanoic acids plasma levels in patients with cerebral childhood and asymptomatic X-linked adrenoleukodystrophy: Lorenzo's oil effect.*

Marion Deon, Mariana Pires Garcia, Angela Sitta, Alethéa G. Barschak, Daniella M. Coelho, Graziela O. Schimitt, Maiara Pigatto, Laura B. Jardim, Moacir Wajner, Roberto Giugliani, Carmen R. Vargas.

Este trabalho foi desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, ICBS, UFRGS.

Periódico: Metabolic Brain Disease

Status: publicado



## Hexacosanoic and docosanoic acids plasma levels in patients with cerebral childhood and asymptomatic X-linked adrenoleukodystrophy: Lorenzo's oil effect

Marion Deon · Mariana Pires Garcia · Angela Sitta ·  
Alethéa G. Barschak · Daniella M. Coelho ·  
Graziela O. Schimit · Maiara Pigatto ·  
Laura B. Jardim · Moacir Wajner ·  
Roberto Giugliani · Carmen R. Vargas

Received: 4 January 2007 / Accepted: 26 September 2007 / Published online: 17 November 2007

© Springer Science + Business Media, LLC 2007

**Abstract** X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is an inherited disorder of peroxisomal metabolism, biochemically characterized by deficient  $\beta$ -oxidation of saturated very long chain fatty acids (VLCFA). The consequent accumulation of these fatty acids in different tissues and in biological fluids is associated with a progressive central and peripheral demyelination, as well as with adrenocortical insufficiency and hypogonadism. Seven variants of this disease have been described, being cerebral childhood the most frequent. The recommended therapy consists of the use of the glyceroltrioleate/glyceroltrierucate mixture known as Lorenzo's Oil (LO), combined with a VLCFA-poor diet, but only in asymptomatic patients will this treatment prevent the progression of the symptomatology. In the present study we evaluated the biochemical course of patients with cerebral childhood (CCER) and asymptomatic clinical forms of X-ALD treated with LO associated with a VLCFA-restricted diet. We observed that hexacosanoic acid plasma concentrations and hexacosanoic/docosanoic ratio were significantly reduced in CCER patients during treatment when compared

---

M. P. Garcia · M. Pigatto · C. R. Vargas

Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

D. M. Coelho · G. O. Schimit · L. B. Jardim · M. Wajner · R. Giugliani · C. R. Vargas  
Serviço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

M. Deon · A. Sitta · A. G. Barschak · M. Wajner · R. Giugliani · C. R. Vargas  
Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

C. R. Vargas (✉)

Medical Genetics Service, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90.035-003 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil  
e-mail: crvargas@hcpa.ufrgs.br

with diagnosis. Hexacosanoic acid plasma level was significantly reduced when compared with that at diagnosis and achieved the normal levels only in asymptomatic patients under LO treatment. In asymptomatic patients the magnitude of hexacosanoic acid decrease was higher than that of the CCER patients. These results show the good biochemical response of LO treatment in asymptomatic X-ALD patients. It is possible to suppose that this could be correlated with the prevention of the appearance of neurological signals in this group of patients treated with LO.

**Keywords** Adrenoleukodystrophy · Hexacosanoic acid · Tetracosanoic acid · Lorenzo's Oil · Peroxisomes · Very long chain fatty acids

## Introduction

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is the most common inherited disorder of the peroxisomal metabolism, with a frequency estimated of 1:21,000 males (Moser 2006). In this disease, there is impairment in shortening the chain of very long saturated fatty acids and their derivatives, leading to tissue accumulating of VLCFA (Moser *et al.* 2001). The major accumulated saturated fatty acids are hexacosanoic acid (C<sub>26:0</sub>) and tetracosanoic acid (C<sub>24:0</sub>) (Korenke *et al.* 1995; Moser and Moser 1991). It is presumed that the increased concentrations of these metabolites cause progressive demyelination of the white matter in central nervous system and also adrenal insufficiency (Ruiz *et al.* 1996; Moser *et al.* 2004; Dubey *et al.* 2005).

X-ALD is clinically heterogeneous, with the occurrence of different phenotypes: childhood cerebral form (CCER), juvenile cerebral form, adult cerebral form, adrenomyeloneuropathy (AMN), isolated Addison disease, olivo-ponto-cerebellar and asymptomatic patients, which can be manifested within the same family (van Geel *et al.* 1997; Moser 1997; Moser *et al.* 2001; Moser 2006). The most common clinical forms are CCER, AMN, Addison and asymptomatic patients (Moser *et al.* 2001; Mahmood *et al.* 2005).

At the moment, there is no effective therapy for X-ALD patients. It was however demonstrated that a mixture of monounsaturated oleic acid (C<sub>18:1</sub>) in triglyceride form (glyceroltrioleate, GTO) with monounsaturated erucic acid (C<sub>22:1</sub>) in triglyceride form (glyceroltrierucate, GTE) at the 4:1 proportion, called Lorenzo's oil (LO), combined with a VLCFA-poor diet is able to normalize plasma C<sub>26:0</sub> levels within one month (Moser 1997; Moser *et al.* 2001). The clinical effectiveness of this treatment is presently questioned since it did not prevent the progression of preexisting neurological symptoms (van Geel *et al.* 1999; Restuccia *et al.* 1999; Moser *et al.* 2001,) and favorable responses occur only in patients beginning treatment before the appearance of neurological symptoms (Moser *et al.* 2005).

Therefore, considering that the accumulation of VLCFA contributes to X-ALD pathogenesis and that LO treatment combined with a VLCFA-poor diet prevent the appearance of symptoms in asymptomatic patients, the objective of the present study was to evaluate the biochemical course of X-ALD Brazilian patients with different clinical forms (CCER and asymptomatic) treated with Lorenzo's Oil and a VLCFA-restricted diet.

## Materials and methods

### Patients and controls

In the present study we evaluated 11 patients with different clinical forms of X-ALD (5 CCER and 6 asymptomatic forms) at the moment of diagnosis and after 20 months (in average) under treatment with a VLCFA-poor diet and Lorenzo's Oil. The average age at diagnosis was 8 years for CCER patients and 7 years for asymptomatic patients. The control group was obtained from healthy age matched individuals.

Clinical symptoms of the CCER patients included leukodystrophy, learning difficulty, seizures and hyperactivity. All patients included in this study received LO treatment, at a dose of 2–3 ml kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>, plus a VLCFA restricted diet. Asymptomatic patients did not present any neurological symptom during the period of therapy.

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

### Sample preparation

Plasma was prepared from whole blood samples obtained from controls (healthy individuals) and from X-ALD patients before and after LO treatment by venous puncture with heparinized vials. Whole blood was centrifuged at 3,000 rpm, plasma was rapidly removed by aspiration and frozen at -80°C until analysis.

### Methods

Plasma VLCFAs were analyzed according to the technique by Moser and Moser (1991). 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 analysed by gas chromatography. A Varian gas chromatographer with an HP-5 column (5% methylphenyl silicone, 0.33 mm film thickness, 0.2 mm inner diameter and 25 m in length), a flame ionization detector, a split/splitless injector, and helium as the mobile phase were utilized. C<sub>22:0</sub> (docosanoic acid) and C<sub>26:0</sub> (hexacosanoic acid) concentrations expressed in µmol/l were determined and the C<sub>26:0</sub>/C<sub>22:0</sub> ratio was calculated. Heptacosanoic acid (C<sub>27:0</sub>) was used as internal standard.

### Statistical analysis

Data were expressed as mean±standard deviation. For the statistical analysis, non-paired Student *t* test was used to compare results from control and X-ALD after and before LO treatment and paired Student *t* test was also used to compare results from X-ALD after and before LO treatment (Altman 1991). A *p* value of less than 0.05 was considered to be significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer.

## Results

Figures 1 and 2 illustrate the plasma concentrations of  $C_{26:0}$  and the  $C_{26:0}/C_{22:0}$  ratio, respectively, of controls and X-ALD patients with the different clinical forms (CCER and asymptomatic) at diagnosis and after 20 months under LO treatment.

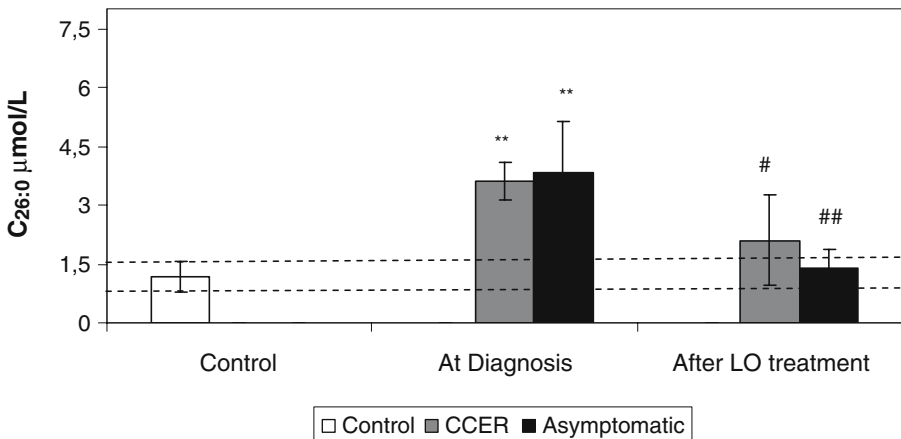
It can be observed in all figures that at diagnosis there was a significant difference between the plasma VLCFA levels of the two X-ALD clinical forms (CCER and asymptomatic) when compared to controls.

Figure 1 shows a significant decrease of  $C_{26:0}$  plasma levels in asymptomatic [ $t(5)=5.063$ ;  $p<0.01$ ] and CCER patients [ $t(4)=3.119$ ;  $p<0.05$ ] after LO treatment. Furthermore, hexacosanoic acid plasma levels achieved the normal values only in asymptomatic patients.

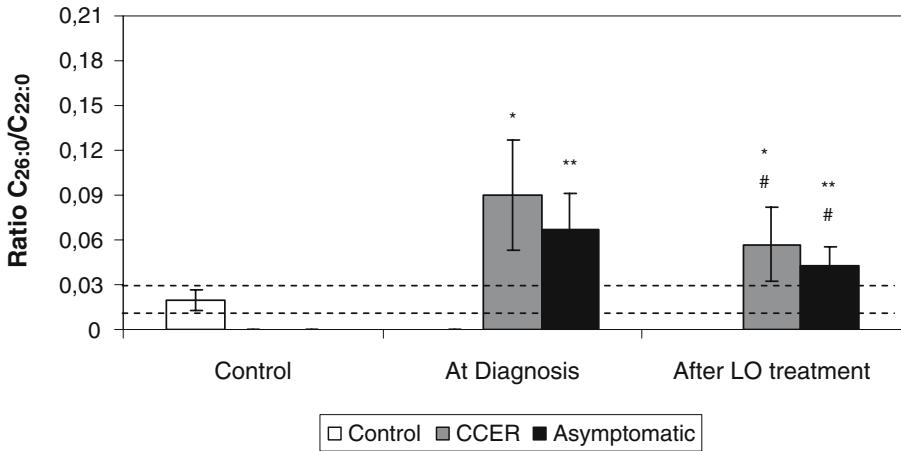
Figure 2 shows that  $C_{26:0}/C_{22:0}$  ratio was decreased in asymptomatic [ $t(5)=3.292$ ;  $p<0.05$ ] and CCER [ $t(4)=4.001$ ;  $p<0.05$ ] patients after the beginning of LO treatment and that these ratio were different from the control group.

## Discussion

X-ALD is an inherited disorder of peroxisomal metabolism biochemically characterized by deficient  $\beta$ -oxidation of saturated very long chain fatty acids, particularly hexacosanoic acid and tetracosanoic acid. 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 (Moser *et al.* 2001). Dietary treatment with a 4:1 mixture of glyceroltrioleate and glyceroltrierucate (LO) lowers and almost normalizes plasma VLCFA concentrations (particularly the  $C_{26:0}$



**Fig. 1**  $C_{26:0}$  plasma levels of X-ALD patients with different clinical forms (CCER and asymptomatic) at diagnosis and under LO treatment and controls. The broken lines indicate the normal ranges. Data represent the mean $\pm$ SD. Non-paired Student  $t$  test was used to compare results from control and X-ALD after and before LO treatment (\*\* $p<0.01$ ) and paired Student  $t$  test was used to compare results from X-ALD after and before LO treatment. (# $p<0.05$  and ## $p<0.01$ )



**Fig. 2**  $C_{26:0}/C_{22:0}$  plasma levels of X-ALD patients with different clinical forms (CCER and asymptomatic) at diagnosis and under LO treatment and controls. The broken lines indicate the normal ranges. Data represent the mean  $\pm$  SD. Non-paired Student *t* test was used to compare results from control and X-ALD after and before LO treatment (\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ ) and paired Student *t* test was used to compare results from X-ALD after and before LO treatment. (# $p < 0.05$ )

levels), but did not ameliorate or alter the rate of the rapid progression of neurological symptoms in the cerebral variants of X-ALD (Moser 2006).

We described here our experience on the treatment with Lorenzo's Oil of 11 X-ALD patients (6 with asymptomatic form and 5 with CCER form) during 20 months. The patients presented significant high plasma levels of VLCFA at the time of diagnosis. Also, they presented statistical difference of the  $C_{26:0}/C_{22:0}$  ratio between the two different clinical forms of X-ALD (CCER and asymptomatic) and the control group during LO treatment.

After 20 months of LO administration and a VLCFA restricted diet, plasma  $C_{26:0}$  levels were significantly reduced in CCER patients (42%) and were strongly decreased (almost 65%) in asymptomatic patients.

Plasma  $C_{26:0}$  levels were above 1.40 mmol/l (normal levels: 0.78 to 1.56 mmol/l) in all determinations made in the six asymptomatic patients after LO treatment. Therefore, plasma  $C_{26:0}$  levels were drastically reduced in these patients after the onset of treatment, indicating that favorable biochemical responses apparently occur only in asymptomatic patients with X-ALD beginning treatment before the appearance of neurological symptoms. We also observed that these asymptomatic patients were kept without neurological symptoms during the 20 months of therapy. Moser *et al.* (2005), in a study of 89 asymptomatic with X-ALD treated with LO and moderate fat restriction during  $6.9 \pm 2.7$  years, observed that hexacosanoic acid reduction by Lorenzo's oil was associated with reduced risk of developing magnetic resonance image (MRI) cerebral abnormalities, and recommended LO therapy for asymptomatic boys who have normal brain MRI.

Other studies demonstrated that treatment with Lorenzo's Oil was ineffective in changing the clinical course of the disease in 15 Italian boys and 20 American boys with ALD, who already presented neurological symptoms at the diagnosis (Ruiz *et al.* 1996; Moser *et al.* 2001).

Van Geel *et al.* (1999) observed a significant reduction of C<sub>26:0</sub> levels in AMN, Addison only phenotype and asymptomatic forms. However, these authors verified that only in the asymptomatic group LO therapy can postpone the characteristic X-ALD neurological involvement. Korenke *et al.* (1995) observed that AMN and CCER patients who already presented neurological symptoms when started the LO treatment presented progression on the disease, even with the reduction of C<sub>26:0</sub>. Suzuki *et al.* (2001) follow up 15 CCER individuals under LO therapy and did not observe alteration on the downhill course in the phenotypes of cerebral demyelination despite the lowering of plasma VLCFA concentrations.

So, considering the results presented here of drastic reduction of hexacosanoic acid plasma level especially in asymptomatic X-ALD patients during treatment, it is feasible that this therapy may contribute to prevent the appearance of symptoms in this group of patients. It is important to recommend that asymptomatic boys from families at risk to be affected by X-ALD should have their VLCFA plasma levels measured. In case VLCFA plasma accumulation is detected LO treatment should be initiated as soon as possible.

**Acknowledgment** This research was supported by grants from CAPES, CNPq, FAPERGS, PROPESQ/UFRGS and FIPE/HCPA.

## References

- Altman DG (1991) Practical Statistics for Medical Research. Chapman & Hall, London
- Dubey P, Raymond GV, Moser AB, Kharkar S, Bezman L, Moser HW (2005) Adrenal insufficiency in asymptomatic adrenoleukodystrophy patients identified by very long chain fatty acid screening. *J Pediatr* 146(4):528–32
- Korenke GC, Hunneman DH, Kohler J, Stöckler S, Landmark K, Hanefeld F (1995) Glyceroltrioleato/glyceroltrierucate therapy in 16 patients with X-chromosomal adrenoleukodystrophy/adrenomyeloneuropathy: effect on clinical, biochemical and neurophysiological parameters. *Eur J Pediatr* 154: 64–70
- Mahmood A, Dubey P, Moser HW, Moser A (2005) X-linked adrenoleukodystrophy: therapeutic approaches to distinct phenotypes. *Pediatr Transplantation* 9(7):55–62
- Moser HW (1997) Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain* 120:1485–1508
- Moser HW (2006) Therapy of X-linked Adrenoleukodystrophy. *NeuroRx* 3:246–253
- Moser HW, Moser AB (1991) Measurement of saturated very long chain fatty acid in plasma. In: Hommes FA (ed) Techniques of diagnostic human biochemical genetics. Wiley, New York
- Moser HW, Smith KD, Watkins PA, Powers J, Moser AB (2001) X-linked adrenoleukodystrophy. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th edn. McGraw-Hill, New York
- Moser HW, Dubey P, Fatemi A (2004) Progress in X-linked adrenoleukodystrophy. *Curr Opin Neurol* 17:263–269
- Moser HW, Raymond GV, Lu SE, Muenz LR, Moser AB, Xu J, Jones RO, Loes DJ, Melhem ER, Dubey P, Bezman L, Brereton NH, Odone A (2005) Follow-up of 89 asymptomatic patients with adrenoleukodystrophy treated with Lorenzo's oil. *Arch Neurol* 62(7):1073–80
- Restuccia D, Di Lazzaro V, Valeriani M, Oliviero A, Le Pera D, Barba C, Cppa M, Bertini E, Di Capua M, Tonali P (1999) Neurophysiologic follow-up of long-term dietary treatment in adult-onset adrenoleukodystrophy. *Neurology* 52:810–815
- Ruiz M, Pampols T, Girós M (1996) Glycerol triooleato/glycerol trierucate therapy in X-linked adrenoleukodystrophy: Saturated and unsaturated fatty acids in blood cells. Implications for the follow-up. *J Inher Metab Dis* 19:188–192
- Suzuki Y, Imamura A, Shimozawa N, Kondo N (2001) The clinical course of childhood and adolescent adrenoleukodystrophy before and after Lorenzo's oil. *Brain Dev* 23(1):30–3

- van Geel BM, Assies J, Wanders RJA, Barth PG (1997) X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, presentation, diagnosis and therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63:4–14
- van Geel BM, Assies J, Haverkort EB, Koelman JHTM, Verbeeten B Jr, Wander RJA, Barth PG (1999) Progression of abnormalities in adrenomyeloneuropathy and neurologically asymptomatic X-linked adrenoleukodystrophy despite treatment with Lorenzo's oil. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 67(3): 290–299

### 3.2 Capítulo 2 – Artigo 2

*Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy.*

Marion Deon, Angela Sitta, Alethea G. Barschak, Daniela M. Coelho, Maiara Pigatto, Graziela O. Schmitt, Laura B. Jardim, Roberto Giugliani, Moacir Wajner, Carmen.R. Vargas.

Este trabalho foi desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, ICBS, UFRGS.

Periódico: International Journal of Developmental Neuroscience

Status: Publicado



## Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy

Marion Deon<sup>a,c,\*</sup>, Angela Sitta<sup>a,c</sup>, Alethea G. Barschak<sup>a,c</sup>, Daniela M. Coelho<sup>a</sup>,  
Maiara Pigatto<sup>a,b</sup>, Graziela O. Schmitt<sup>a</sup>, Laura B. Jardim<sup>a</sup>, Roberto Giugliani<sup>a,c</sup>,  
Moacir Wajner<sup>a,c</sup>, Carmen R. Vargas<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Serviço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, PPGCF, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

Received 20 June 2007; received in revised form 26 August 2007; accepted 27 August 2007

### Abstract

Patients affected by X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) present a progressive brain and peripheral demyelination and adrenal cortex insufficiency, associated with accumulation of the very long chain fatty acids (VLCFA) hexacosanoic acid (C26:0) and tetracosanoic acid (C24:0) in different tissues and biological fluids. X-ALD is characterized by heterogeneous clinical phenotypes. Seven clinical variants have been described for this genetic disorder, being the childhood cerebral form (CCER), adrenomyeloneuropathy (AMN) and asymptomatic the most common clinical forms. In a previous work, we showed evidence that oxidative stress is involved in the pathophysiology of X-ALD symptomatic patients. In the present study, we compared oxidative stress parameters, namely thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) and total antioxidant status (TAS), in plasma from patients with CCER, AMN and in asymptomatic X-ALD patients. It was observed that symptomatic and asymptomatic X-ALD patients presented a significant increase of plasma TBA-RS measurement, indicating a stimulation of lipid peroxidation. Furthermore, lipid peroxidation was higher in AMN, as compared to CCER and asymptomatic patients. We also observed that the total antioxidant defenses (TAS) were decreased in symptomatic but not in asymptomatic X-ALD patients. Therefore, it may be presumed that asymptomatic patients seem to be protected against oxidative stress because of their normal antioxidant defenses and that other factors besides oxidative damage may be responsible for the severity of the symptoms in X-ALD and need to be investigated.

© 2007 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Oxidative stress; Free radicals; X-ALD; AMN; Asymptomatic; CCER

### 1. Introduction

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD; [MIM 300100]) is the most frequent peroxisomal demyelinating disorder with an estimated frequency of 1:21,000 males (Bezman et al., 2001; Moser et al., 2001). Biochemically, it is characterized by the accumulation of saturated very long chain fatty acid (VLCFA), particularly hexacosanoic acids (C26:0) and tetracosanoic acids (C24:0), in tissues and body fluids (Moser et al., 2005a,b).

X-ALD presents a wide range of phenotypic variability sharing the same defective gene located within the Xq28 region and the same degree of VLCFA accumulation. Seven different phenotypes, which differ in age of onset, symptoms and severity of disease, can be manifested within the same family: childhood cerebral form (CCER), juvenile cerebral form, adult cerebral form, adrenomyeloneuropathy (AMN), isolated Addison disease, olivo-ponto-cerebellar and asymptomatic patients in male patients (Moser, 1997; Van Geel et al., 1997; Moser et al., 2001; Moser, 2006). CCER is the most severe phenotype and manifests before 10 years of age and involves a rapid progression of neurological symptoms leading patients to a vegetative state before 3 years of age (Moser et al., 2001). AMN manifests between 20 and 40 years of age and is characterized by progressive paraparesis involving disorders of

\* Corresponding authors at: Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350 CEP 90.035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.  
Tel.: +55 51 21018011; fax: +55 51 21018010.

E-mail addresses: marion\_deon@yahoo.com.br (M. Deon),  
crvargas@hcpa.ufrgs.br (C.R. Vargas).

the spinal cord (Moser, 1997; Van Geel et al., 1997; Moser et al., 2001), with approximately 50% of these patients showing a risk for cerebral involvement. Isolated Addison X-ALD disease manifests primary adrenal insufficiency without apparent neurological involvement. However, this phenotype develops signs of AMN by middle age. Some asymptomatic patients, mainly those identified by family screening (demonstrating elevated levels of VLCFA or a mutation identified in the X-ALD gene), do not present adrenal insufficiency and/or neurological abnormalities during the first years of life. However, the risk for these patients to develop adrenal insufficiency and/or neurological symptoms is high and the number of asymptomatic patients diminishes with age (Moser et al., 2001; Moser et al., 2005a,b; Berger and Gärtner, 2006).

At this time, current treatment is limited on three modes of therapy: adrenal hormone replacement for adrenal insufficiency (present in about 70% of male patients), Lorenzo's Oil (LO) therapy for asymptomatic boys with X-ALD who have normal cerebral magnetic resonance imaging (MRI) and bone marrow or hematopoietic stem cell transplantation in boys with early stage of cerebral involvement (Moser et al., 2005a; Berger and Gärtner, 2006; Moser, 2006).

Although the clinical manifestations in X-ALD are severe, the mechanisms underlying tissue damage in this disease are still obscure. In this context, preliminary results from our laboratory showed a significant increase in lipid peroxidation (TBA-RS and chemiluminescence) and a decreased of the tissue capacity to handle free radical formation (TAR) in plasma of symptomatic X-ALD. Furthermore, we also observed a significant increase of erythrocyte GPx activity, as well as catalase and superoxide dismutase activities in fibroblasts from symptomatic patients, indicating that oxidative stress is involved in this disease (Vargas et al., 2004). In a subsequent study, it was demonstrated that lipid peroxidation occurs in symptomatic and asymptomatic X-ALD patients and that LO treatment does not attenuate or prevent free radical generation in these patients (Deon et al., 2006).

These results are in accordance with other studies showing that C6 glial cells in the presence of C26:0 produce enhanced levels of NO products (nitrites and nitrates) and superoxide anion and reduce the amount of intracellular glutathione levels (Di Biase et al., 2004, 2005).

Our objective in the present study was to determine and compare the lipid oxidative damage (thiobarbituric acid-reactive substances, TBA-RS) and the tissue antioxidant defenses (total antioxidant status, TAS) in plasma from the various clinical forms of X-ALD individuals (CCER and AMN and asymptomatic) in order to evaluate whether these parameters differed among the various groups of patients and between patients and controls.

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Reagents

All chemicals were of PA purity and were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) except for thiobarbituric acid, which was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and a kit for TAS measurement from Randox Laboratories (Antrim, United Kingdom).

### 2.2. Patients and controls

Blood (plasma) taken from 22 patients with different clinical forms of X-ALD (8 CCER, 5 AMN and 9 asymptomatic forms) at the diagnosis were used to evaluate the parameters of oxidative stress. Patients were diagnosed in our laboratory by increased plasma levels of very long chain fatty acids detected by gas chromatography (Moser and Moser, 1991). The average age at diagnosis was 8 years for CCER patients, 40 years for AMN and 7 years for asymptomatic patients. The control group was obtained from healthy age matched individuals. Samples were kept frozen until analysis.

Clinical symptoms of CCER patients included leukodystrophy, learning difficulty, seizures and hyperactivity. Patients with the AMN phenotype presented spastic paraparesis, limb weakness and behavior disturbances.

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

### 2.3. Plasma preparation

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

### 2.4. Thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS)

Thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) were determined according to the method described by Ohkawa et al. (1979) using a Hitachi U-2001 double-beam spectrophotometer. Briefly, in a properly labeled tube was added 100  $\mu\text{l}$  of plasma, 50  $\mu\text{l}$  of sodium dodecyl sulfate (SDS) 8%, 375  $\mu\text{l}$  of acetic acid 20% pH 3.5 and 375  $\mu\text{l}$  of 0.8% thiobarbituric acid. The test tube was incubated at  $100^\circ\text{C}$  for 60 min. The mixture was allowed to cool on water for 5 min. The samples were centrifuged at  $1000 \times g$  for 10 min. The resulting pink stained TBA-RS were determined in a spectrophotometer at 535 nm. Calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane subjected to the same treatment as that of the samples. TBA-RS were calculated as nmol TBA-RS/mg protein.

### 2.5. Total antioxidant status (TAS)

TAS was assayed with a kit from RANDOX laboratories using a Hitachi U-2001 double-beam spectrophotometer with temperature control. The plasma sample was incubated with ABTS<sup>®</sup> (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphinate]) plus a peroxide (metmyoglobin) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  to produce the cation ABTS<sup>®+</sup>. A relatively stable blue-green color resulted and was measured at  $37^\circ\text{C}$  at 600 nm. Antioxidants in the added sample cause suppression of this color production to a degree, which is proportional to their concentration (Miller et al., 1993; Yu and Ong, 1999). The results were expressed as mmol/l plasma.

### 2.6. Protein determination

Protein concentrations were determined by the biuret method (Gornall et al., 1949), using albumin as standard.

### 2.7. Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation and analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan multiple range test when *F*-value was significant. A *p*-value less than 0.05 was considered significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer.

## 3. Results

Fig. 1 shows that TBA-RS measurement was significantly increased in plasma from CCER patients (97%), AMN patients

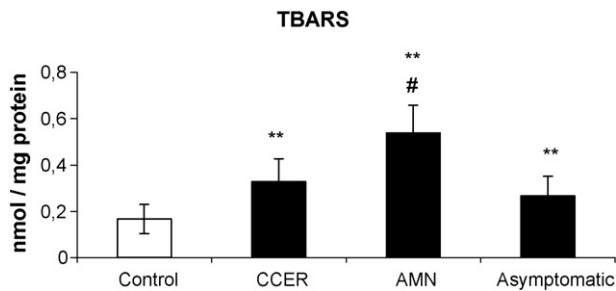


Fig. 1. Plasma thiobarbituric-acid reactive substances (TBA-RS) from X-ALD patients (8 CCER, 5 AMN and 9 asymptomatic) and controls ( $n = 9$ ). Data represent the mean  $\pm$  S.D. Significant differences from controls were calculated by one-way ANOVA followed by the Duncan multiple range test, \*\* $p < 0.01$ , different from controls; # $p < 0.05$ , different from CCER and asymptomatic groups.

(227%) and asymptomatic individuals (58%) compared to controls [ $F(3,27) = 19.19$ ,  $p < 0.01$ ]. Interestingly, AMN patients presented significantly higher levels of lipid peroxidation than the other groups. These results indicate that lipid peroxidation is stimulated in symptomatic and asymptomatic phenotypes of X-ALD.

We also verified that the total antioxidant status was significantly decreased in CCER (29%) and AMN (45%) patients, but not in asymptomatic individuals with X-ALD [ $F(3,19) = 4.349$ ,  $p < 0.05$ ] (Fig. 2). The data indicate that the total amount of antioxidants was depleted in symptomatic X-ALD patients.

#### 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). Affected patients accumulate VLCFA in tissues and body fluids (Moser, 1997; Moser et al., 2001). 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.

In a previous study, we verified a significant increase of chemiluminescence and TBA-RS and a significant decrease of TAR measurements in plasma of symptomatic X-ALD patients (Vargas et al., 2004). These data suggested that oxidative stress

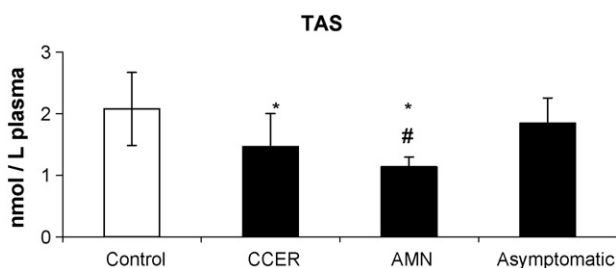


Fig. 2. Plasma total antioxidant status (TAS) from X-ALD patients (6 CCER, 5 AMN and 6 asymptomatic) and controls ( $n = 6$ ). Data represent the mean  $\pm$  S.D. Significant differences from controls were calculated by one-way ANOVA followed by the Duncan multiple range test, \* $p < 0.05$ ; # $p < 0.05$ , different from CCER and asymptomatic groups.

might be involved in the pathophysiology of X-ALD. In a subsequent study, we extended this investigation and evaluated whether oxidative stress parameters were altered in plasma and erythrocytes from treated with Lorenzo's Oil and non-treated asymptomatic and symptomatic X-ALD patients (Deon et al., 2006). We verified that TBA-RS measurement was significantly increased in plasma of symptomatic and asymptomatic patients, as compared to controls and that LO treatment did not significantly reduce this parameter (Deon et al., 2006). Furthermore, since TBA-RS measurement was similarly increased in all individuals (CCER and asymptomatic), it may be presumed that oxidative stress already occurs in the pre-symptomatic stage of the disorder.

In the present study, we compared various parameters of oxidative stress in patients with different X-ALD clinical forms (CCER, AMN and asymptomatic). We first demonstrated a significant increase of TBA-RS in plasma from all variant forms, being these values much higher in AMN patients than in the other groups tested. Considering that TBA-RS reflects the amount of malondialdehyde formation, a product of membrane fatty acid peroxidation (Halliwell and Gutteridge, 2001), our data indicate that lipid peroxidation is induced in plasma of symptomatic and asymptomatic X-ALD individuals.

We also observed that TAS measurement, which represents the quantity of the tissue antioxidants, was significantly reduced in plasma of CCER and AMN patients but not in plasma of asymptomatic individuals, when compared to controls. Besides, we found that TAS was significantly reduced in AMN patients when compared to the CCER group. These data indicate that the non-enzymatic antioxidant defenses are reduced in plasma of symptomatic but not in plasma of asymptomatic X-ALD individuals and that these defenses are possibly preserved in asymptomatic patients because the amount of non-enzymatic antioxidant defenses is probably sufficient to counterbalance the free radical generated. Furthermore, we cannot at the present establish the exact mechanisms by which AMN patients, which are less affected than CCER patients, presented a higher lipid peroxidation level and reduced antioxidant defenses, but this could be possibly due to their more advanced age. On the other hand, these data indicate that other causes related to the severity of the X-ALD variants needs investigation.

On the other hand, our present results may be associated with the fact that the progression of the neurological symptoms in X-ALD is related to astrocyte activation and cytokine pro-inflammatory induction, in which reactive species production is accelerated. In this context, oxidative stress is an important mediator of neurodegeneration since brain has relatively low levels of antioxidant defenses, high lipid content, specially unsaturated fatty acids and catecholamines, which are highly susceptible to reactive oxygen species attack (Halliwell and Gutteridge, 2001). This is in line with the fact that free radical damage seems to be involved in a large number of neurological diseases like Parkinson's disease, Alzheimer's disease, strokes, multiple sclerosis and epilepsy, etc. (Reznick and Packer, 1993; Przedborski et al., 1996; Bem-Menachem et al., 2000; Halliwell and Gutteridge, 2001).

Therefore, taken together our present data showing a significant increase of TBA-RS levels (lipid peroxidation) and a reduction of TAS (quantity of the tissue non-enzymatic antioxidants) in CCER and AMN patients, it is proposed that free radical generation is involved in the pathophysiology of the tissue damage found in these symptomatic clinical forms of X-ALD. Furthermore, it might be also presumed that one of the reasons by which some X-ALD patients are asymptomatic is due to their normal antioxidant defenses, being these patients to a certain extent able to overcome reactive species generation. Otherwise, it could be postulated that when these defenses are decreased because of the high rate of free radical synthesis, these patients are more prone to tissue oxidative attack and therefore to develop symptoms.

Another interesting observation of our study was that the levels of lipid peroxides did not correlate with the severity of the clinical variants in the affected patients since AMN patients, which are less affected, were shown to have higher peroxides and lower TAS than CCER patients, which have a more severe clinical phenotype. It could be therefore presumed that oxidative stress solely does not explain accurately the intensity of the various X-ALD clinical forms, and probably other factors may be more important to determine the severity of this disorder.

Finally, in case our present findings are confirmed in other biological fluids like CSF with a larger spectrum of techniques used to measure biological oxidations, we could presume that oxidative stress may act synergistically with other underlying mechanisms involved in the pathophysiology of the tissue damage found in X-ALD patients.

## Acknowledgements

This work was supported in part by grants from Capes, FAPERGS, CNPq, PROPESQ/UFRGS and FIPE/HCPA, Brazil.

## References

- Bem-Menachem, E., Kyllerman, R., Markleind, S., 2000. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase function in progressive myoclonus epilepsies. *Epilepsy Res.* 40, 33–39.
- Berger, J., Gärtner, J., 2006. X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, biochemical and pathogenetics aspects. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 1721–1732.
- 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.
- Deon, M., Wajner, M., Sirtori, L., Fitarelli, D., Coelho, D.M., Sitta, A., Barschak, A., Ferreira, G.C., Haeser, A., Giugliani, R., Vargas, C.R., 2006. The effect of Lorenzo's oil on oxidative stress in X-linked adrenoleukodystrophy. *J. Neurol. Sci.* 247, 157–164.
- 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 diphenyl-iodonium on free radical release in C6 glial cells enriched in hexacosanoic acid. *Neurochem. Res.* 30 (2), 215–223.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M., 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177, 751–766.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (Eds.), 2001. *Free radicals in Biology and Medicine*. third ed. Oxford University Press, Oxford.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A., 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84, 407–412.
- Moser, H.W., 1997. Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain* 120, 1485–1508.
- Moser, H.W., 2006. Therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. *NeuroRx* 3, 246–253.
- Moser, H.W., Moser, A.B., 1991. Measurement of saturated very long chain fatty acid in plasma. In: Hommes, F.A. (Ed.), *Techniques of diagnostic human biochemical genetics*. Wiley, New York, pp. 177–191.
- Moser, H.W., Smith, K.D., Watkins, P.A., Powers, J., Moser, A.B., 2001. X-linked adrenoleukodystrophy. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. eighth ed. McGraw-Hill Inc., New York, pp. 3257–3301.
- 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., 2005a. Follow-up of 89 asymptomatic patients with adrenoleukodystrophy treated with Lorenzo's oil. *Arch. Neurol.* 62 (7), 1073–1080.
- Moser, H.W., Raymond, G.V., Dubey, P., 2005b. Adrenoleukodystrophy—new approaches to a neurodegenerative disease. *JAMA* 294, 3131–3134.
- Ohkawa, H., Chishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissue of thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Przedborski, S., Donaldson, D.B.S., Jakowec, M., Kish, J.S., Guttman, M., Rosoklija, G., Hays, A.P., 1996. Brain superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 39, 158–165.
- Reznick, A.Z., Packer, L., 1993. Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In: Poli, G., Albano, E., Dianzani, M.U. (Eds.), *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*. Basel, Birkhäuser Verlag, pp. 425–437.
- Van Geel, B.M., Assies, J., Wanders, R.J.A., Barth, P.G., 1997. X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, presentation, diagnosis and therapy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 63, 4–14.
- Vargas, C.R., Wajner, M., Sirtori, L.R., Goulart, L., Chiochetta, M., Coelho, D., Latini, A., Llesuy, S., Belló-Klein, A., Giugliani, R., Deon, M., Mello, C.F., 2004. Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim. Biophys. Acta* 1688, 26–32.
- Yu, T.-W., Ong, Ch.N., 1999. Lag-time measurement of antioxidant capacity using myoglobin and 2,29-azino-bis(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid): rationale, application and limitation. *Anal. Biochem.* 275, 217–223.

### 3.3 Capítulo 3 – Artigo 3

*Oxidative stress is induced in female carriers of X-linked adrenoleukodystrophy.*

Marion Deon, Angela Sitta, Alethea G. Barschak, Daniela M. Coelho, Thatiana Terroso, Graziela O. Schmitt, Hector Y.C. Wanderley, Laura B. Jardim, Roberto Giugliani, Moacir Wajner, Carmen R. Vargas.

Este trabalho foi desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, ICBS, UFRGS.

Periódico: Journal of the Neurological Sciences.

Status: Publicado

## Oxidative stress is induced in female carriers of X-linked adrenoleukodystrophy

Marion Deon<sup>a,c,\*</sup>, Angela Sitta<sup>a,c</sup>, Alethea G. Barschak<sup>a,c</sup>, Daniela M. Coelho<sup>a</sup>,  
Thatiana Terroso<sup>a,b</sup>, Graziela O. Schmitt<sup>a</sup>, Hector Y.C. Wanderley<sup>a</sup>, Laura B. Jardim<sup>a</sup>,  
Roberto Giugliani<sup>a,c</sup>, Moacir Wajner<sup>a,c</sup>, Carmen R. Vargas<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Serviço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, PPGCF, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

Received 14 June 2007; received in revised form 23 August 2007; accepted 30 August 2007

Available online 2 October 2007

### Abstract

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is a peroxisomal disease biochemically characterized by the accumulation of very long chain fatty acids (VLCFA), particularly hexacosanoic (C26:0) and tetracosanoic acids (C24:0) in different tissues and in biological fluids and clinically characterized by central and peripheral demyelination and adrenal insufficiency. A considerable number of heterozygotes (HTZ) for X-ALD develop neurological symptoms like spinal cord involvement resembling milder forms of adrenomyeloneuropathy. However, the mechanisms of brain damage in hemizygotes and heterozygotes X-ALD individuals are poorly understood. Considering that oxidative stress was involved in various neurodegenerative disorders and that in a previous study we showed evidence that oxidative stress is probably involved in the pathophysiology of X-ALD symptomatic patients, in the present study we evaluated various oxidative stress parameters, namely thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), total antioxidant status (TAS) and total antioxidant reactivity (TAR) in plasma of HTZ individuals for X-ALD. It was observed that female carriers present a significant increase of TBA-RS measurement, indicating a stimulation of lipid peroxidation, as well as a decrease of TAR, reflecting a deficient capacity to rapidly handle an increase of reactive species. These results indicate that oxidative stress is involved in the pathophysiology of heterozygotes for X-ALD.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Oxidative stress; Free radicals; Lipid peroxidation; X-ALD; Female carriers

### 1. Introduction

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD, [MIM 300100]) is a severe progressive demyelinating disease caused by a defect in peroxisomal beta oxidation [1], leading to accumulation of saturated very long chain fatty acid (VLCFA) in tissues and body fluids [2]. It is the most frequent peroxisomal disorder with an estimated incidence of 1:21,000 for

hemizygotes only and of 1:14,000 for heterozygotes (HTZ) [3].

X-ALD is a heterogeneous disease with seven different phenotypes in male patients (i.e., childhood cerebral form (CCER), juvenile cerebral form, adult cerebral form, adrenomyeloneuropathy (AMN), isolated Addison disease, olivo-ponto-cerebellar and asymptomatic patients) and five (asymptomatic, mild myelopathy, moderate to severe myeloneuropathy, cerebral involvement and clinically evident adrenal insufficiency) in female carriers [1]. The most common variants in males are the childhood cerebral form (CCER) and adrenomyeloneuropathy (AMN) [4]. Approximately 50% of female carriers over 40 years of age may develop mild neurological abnormalities such as an impaired

\* Corresponding authors. Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350. CEP 90.035-003, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Tel.: +55 51 21018011; fax: +55 51 21018010.

E-mail addresses: marion\_deon@yahoo.com.br (M. Deon), crvargas@hcpa.ufrgs.br (C.R. Vargas).

vibration sense and hyperreflexia in the legs as age advances, and 20% of carriers over the age of 40 years develop an AMN-like syndrome, which is often misdiagnosed as multiple sclerosis [1,5]. In contrast, the majority of the HTZ younger than 30 years of age are asymptomatic, and cerebral involvement and adrenal insufficiency are rare (1%) at this age [6,7].

The diagnosis of X-ALD hemizygotes and of female carriers (HTZ) is usually carried out by increased concentrations of the very long chain fatty acids hexacosanoic acids (C26:0), tetracosanoic acids (C24:0) and docosanoic acid (C22:0) in serum, as well as by high C24:0/C22:0 and C26:0/C22:0 ratios [8]. False negative results may occur in 15–20% of the determinations for HTZ individuals. Thus mutation analysis is considered to be the best method to establish the carrier status in women [1,5].

At this time, there is no cure for X-ALD and many therapies have been tried for this disease. The current treatment is limited on three modes of therapy: adrenal hormone replacement for adrenal insufficiency (present in about 70% of male patients), Lorenzo's Oil (LO) therapy for asymptomatic boys with X-ALD who have normal cerebral magnetic resonance imaging (MRI) and bone marrow or hematopoietic stem cell transplantation for boys with cerebral involvement at an early stage of development [2,7,9]. Female carriers with neurological symptoms may also benefit from a general supportive care [1].

Free radicals seem to be involved in a large number of neurological diseases like Parkinson's disease, Alzheimer's disease, stroke, multiple sclerosis and epilepsy, etc. In this context, oxidative stress is believed to be an important mediator of neurodegeneration since brain has relatively low levels of antioxidant defenses, high content of lipids, specially unsaturated fatty acids, which are highly susceptible to reactive oxygen species attack [10,11]. Oxidative damage occurs in various inborn errors of metabolism [12,13], including maple syrup urine disease [14,15], glutaric acidemia type I [16] and phenylketonuria [17,18].

Preliminary results from our laboratory have shown a significant increase of lipid peroxidation (TBA-RS and chemiluminescence) and a decrease of the tissue capacity to handle free radical formation (TAR) in plasma of symptomatic X-ALD patients. We also found a significant increase of erythrocyte GPx activity, catalase and superoxide dismutase activities in fibroblasts, indicating that oxidative stress is involved in this disease [19]. In a subsequent study, we observed that lipid peroxidation occurs in symptomatic and asymptomatic X-ALD and that LO treatment does not attenuate or prevent free radical generation in these patients [20].

Our objective in the present study was to evaluate various parameters of oxidative stress, such as thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), total antioxidant status (TAS) and total antioxidant reactivity (TAR), in plasma of X-ALD female carriers in order to verify whether free radicals are elicited in these individuals.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

All chemicals were of PA purity and were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), except by thiobarbituric acid, which was purchased from Merck (Darmstadt, Germany), 2, 2'-azo-bis-(2-aminidinopropane) (ABAP), which was purchased from Wako Chemicals (Richmond, VA, USA) and a kit for TAS measurement that was obtained from Randox Laboratories (Antrim, United Kingdom).

### 2.2. Subjects

Eight asymptomatic obligatory female carriers of X-ALD (mothers of X-ALD patients) aged between 33 and 44 years were used to evaluate the parameters of oxidative stress. Blood samples were obtained at the time of the diagnosis of the index cases in our laboratory, which was performed by increased plasma levels of VLCFA using gas chromatography [8]. Eight healthy age matched individuals were used as controls.

### 2.3. Plasma preparation

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

### 2.4. Thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS)

Thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) were determined according to the method described by Ohkawa et al. [21] using a Hitachi U-2001 double-beam spectrophotometer. Briefly, in a properly labeled tube was added 100  $\mu\text{l}$  of plasma, 50  $\mu\text{l}$  of sodium dodecyl sulfate (SDS) 8%, 375  $\mu\text{l}$  of acetic acid 20% pH 3.5 and 375  $\mu\text{l}$  of 0.8% thiobarbituric acid. The test tube was incubated at  $100^{\circ}\text{C}$  for 60 min. The mixture was allowed to cool on water for 5 min. The samples were centrifuged at 1000 g for 10 min. The resulting pink stained TBA-RS were determined in a spectrophotometer at 535 nm. Calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane subjected to the same treatment as that of the samples. TBA-RS were calculated as nmol TBA-RS/mg protein.

### 2.5. Total antioxidant reactivity (TAR)

TAR was determined by measuring the luminol chemiluminescence intensity induced by 2, 2'-azo-bis-(2-aminidinopropane) (ABAP) according to the method of Lissi et al. [22], using a beta liquid scintillation spectrometer (Wallac model 1409). The background chemiluminescence was measured by adding 4 ml of 2 mM ABAP (in 0.1 M glycine buffer, pH 8.6) into a glass scintillation vial. Ten microliters of luminol

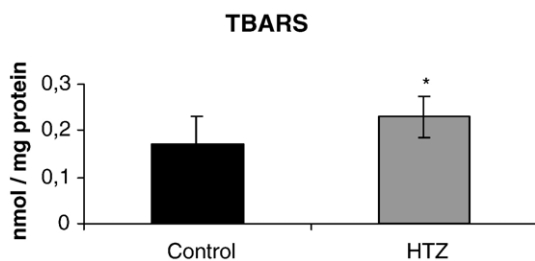


Fig. 1. Thiobarbituric acid-reactive species (TBA-RS) in plasma from HTZ individuals for X-ALD and controls. Data represent the mean $\pm$ SD ( $n=8$ ). Difference from control, \*  $p<0.05$  (Student  $t$  test for unpaired samples).

(4 mM) were added to each vial and the chemiluminescence was measured. This was considered to be the basal value. Ten microliters of 25–200  $\mu$ M Trolox (curve calibration) or plasma was then added and the chemiluminescence was measured during 60 s. The rapid reduction in luminol intensity is considered as a measure of the TAR capacity. TAR was calculated as nmol Trolox/mg protein.

#### 2.6. Total antioxidant status (TAS)

TAS was assayed by using a kit from RANDOX laboratories using a Hitachi U-2001 double-beam spectrophotometer with temperature control. The plasma sample was incubated with ABTS<sup>®</sup> (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) plus a peroxide (metmyoglobin) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to produce the cation ABTS<sup>®+</sup>. A relatively stable blue-green color occurred and was measured at 37 °C at 600 nm. Antioxidants in the added sample cause suppression of this color production to a degree which is proportional to their concentration [23,24]. The results were expressed as mmol/l plasma.

#### 2.7. Protein determination

Protein concentrations were determined by the biuret method from Labest [25], using albumin as standard.

#### 2.8. Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. The Student  $t$  test for non-paired samples was used to compare

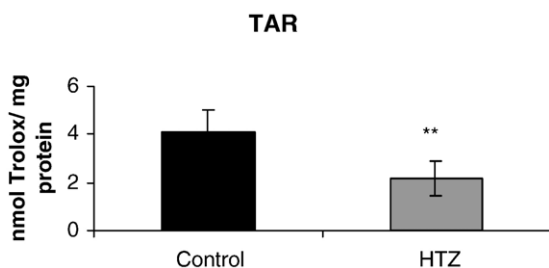


Fig. 2. Total antioxidant reactivity (TAR) in plasma from HTZ individuals for X-ALD and controls. Data represent the mean $\pm$ SD ( $n=7$ ). Difference from control, \*\*  $p<0.01$  (Student  $t$  test for unpaired samples).

means from controls and HTZ individuals for X-ALD. Correlations were carried out using the Pearson correlation coefficient. A  $p$  value less than 0.05 was considered to be significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL) software in a PC-compatible computer.

### 3. Results

#### 3.1. Thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS)

TBA-RS values, a parameter of lipid peroxidation, were determined in plasma of X-ALD female carriers and controls. Fig. 1 shows that TBA-RS measurement was significantly increased 36% in plasma of HTZ as compared to controls [ $t(14)=-2.369$ ,  $p<0.05$ ]. These results indicate that lipid peroxidation is stimulated in HTZ. We found no significant correlation between TBA-RS values and C26:0 [ $r=-0.331$ ,  $p>0.05$ ] or C26:0/C22:0 [ $r=0.286$ ,  $p>0.05$ ] levels in plasma of HTZ individuals.

#### 3.2. Total antioxidant reactivity (TAR)

TAR, which is a measure of the tissue capacity to react with free radicals, was determined in plasma of X-ALD female carriers and controls. TAR measurement was reduced 53% in plasma of HTZ subjects as compared to controls [ $t(12)=4.126$ ,  $p<0.01$ ] (Fig. 2). These data indicate a deficient capacity to modulate the damage associated with the enhanced production of reactive species in females carriers. We observed no significant correlation between TAR measurement and C26:0 [ $r=-0.254$ ,  $p>0.05$ ] or C26:0/C22:0 [ $r=0.072$ ,  $p>0.05$ ] levels in plasma of HTZ individuals.

#### 3.3. Total antioxidant status (TAS)

TAS, which represents the quantity of the tissue antioxidants, was measured in plasma of X-ALD female carriers and controls. We also observed that the total antioxidant status was not changed in plasma of HTZ, as compared to controls [ $t(15)=0.738$ ,  $p>0.05$ ] (Fig. 3).

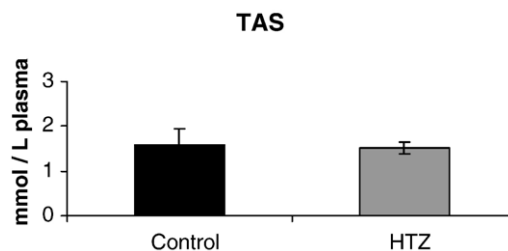


Fig. 3. Total antioxidant status (TAS) in plasma from HTZ individuals for X-ALD and controls. Data represent the mean $\pm$ SD ( $n=8$ ). No significant differences between means were found (Student  $t$  test for unpaired samples).



#### 4. Discussion

X-ALD is caused by genetic defects in the ABCD1 gene that maps to Xq 28 and codes for a peroxisomal membrane protein (ALDP) which belongs to the superfamily of the ATP-bound carrier proteins and leads to accumulation of VLCFA in tissues and body fluids [1,4]. Neurological symptoms and brain abnormalities are characteristic of patients with X-ALD. Furthermore, approximately 20–50% of all female carriers develop neurological symptoms in middle age or later and approximately 1% of HTZ individuals for X-ALD presents adrenal insufficiency and a cerebral inflammatory phenotype [1,26]. Women heterozygous for X-ALD may develop spastic paraparesis with bowel and bladder difficulties and this appears to be a function of age. Interestingly, most of HTZ individuals for X-ALD who presented paraparesis were previously misdiagnosed with multiple sclerosis [1]. Schmidt et al. [27] performed a detailed clinical, neuroimaging and electrophysiological analysis of eight symptomatic female carriers of X-ALD and reported that spastic paraparesis and decreased vibration sense in the lower extremities were the most frequent clinical findings and that their symptoms were mainly confined to the central nervous system. In this context, brain magnetic resonance imaging (MRI) studies carried out in 76 female carriers of X-ALD revealed that brain involvement demonstrable by MRI is rare, including those who have clinical evidence of spinal cord involvement [28].

Very little is known about the pathomechanisms involved in the tissue damage of X-ALD. However, it has been proposed that tissue accumulation of VLCFA probably contributes to the pathogenesis in this disorder [29]. In a previous study we showed evidence that oxidative stress is probably involved in the pathophysiology of symptomatic patients with X-ALD. In the present study we investigated various parameters of oxidative stress in plasma of X-ALD female carriers.

We observed a significant increase of TBA-RS measurement in plasma from these patients. Considering that TBA-RS reflects the amount of malondialdehyde formation, an end product of membrane fatty acid peroxidation [11], our data indicate that lipid peroxidation is induced in plasma of HTZ individuals for X-ALD.

It was observed that a significant decrease of TAR measurement, reflecting a deficient capacity to rapidly handle an increase of reactive species. It should be noted that TAR corresponds to a useful index of the capacity of a given tissue to modulate the damage associated with an increased production of free radicals and reflects the quality of antioxidants (given by its reactivity) [22]. In contrast, the total antioxidant status (TAS) was not altered in plasma of HTZ individuals, indicating that the decrease of antioxidant defenses was probably due to specifically very reactive components of this system.

We also correlated TBA-RS or TAR values with VLCFA (C26:0 and C26:0/C22:0) levels in plasma from the X-ALD HTZ individuals. No correlation occurred between TBA-RS or TAR values and the plasma VLCFA concentrations,

indicating that VLCFA levels are not directly associated with the degree of oxidative stress encountered in plasma of HTZ individuals.

Therefore, taken together our present data showing a significant increase of TBA-RS levels (lipid peroxidation) and a diminution of TAR (capacity to react with free radicals) in plasma of X-ALD female carriers, it is proposed that free radical generation is also involved in the pathophysiology of the tissue damage found in HTZ individuals for X-ALD.

In this context, it should be emphasized that cerebral X-ALD is essentially a neuroinflammatory disorder and that inflammation generally elicits stimulation of reactive species synthesis and oxidative stress is believed to be an important mediator of brain damage in neurodegenerative disorders, such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease, multiple sclerosis as well as in epileptic seizures and demyelination [1,11].

Thus, it may be presumed that antioxidant might be used as an adjuvant therapy for these patients, and studies should be initially carried out to test this treatment in X-ALD animal models [30,31]. This therapy should be considered since the administration of antioxidants maybe could prevent the appearance of neurological symptoms in HTZ individuals for X-ALD.

#### Acknowledgements

This work was supported in part by grants from Capes, FAPERGS, CNPq and FIPE/HCPA — Brazil.

#### References

- [1] Moser HW, Smith KD, Watkins PA, Powers J, Moser AB. X-linked adrenoleukodystrophy. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th edition. New York: McGraw-Hill Inc.; 2001. p. 3257–301.
- [2] Moser HW, Raymond GV, Lu SE, Muenz LR, Moser AB, Xu J, et al. Follow-up of 89 asymptomatic patients with adrenoleukodystrophy treated with Lorenzo's oil. Arch Neurol 2005;62(suppl 7):1073–80.
- [3] Bezman L, Moser AB, Raymond GV, Rinaldo P, Watkins PA, Smith KD, et al. Adrenoleukodystrophy: incidence, new mutation rate, and results of extended family screening. Ann Neurol 2001;49:512–7.
- [4] Moser HW. Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. Brain 1997;120:1485–508.
- [5] Maier EM, Kammerer S, Muntau AC, Wichers M, Braun A, Roscher AA. Symptoms in carriers of Adrenoleukodystrophy relate to skewed X inactivation. Ann Neurol 2002;52(suppl 5):683–8.
- [6] Moser HW, Raymond GV, Dubey P. Adrenoleukodystrophy — new approaches to a neurodegenerative disease. JAMA 2005;294:3131–4.
- [7] Berger J, Gärtner J. X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, biochemical and pathogenetics aspects. Biochim Biophys Acta 2006;1763:1721–32.
- [8] Moser HW, Moser AB. Measurement of saturated very long chain fatty acid in plasma. In: Hommes FA, editor. Techniques in diagnostics human biochemical genetics. New York: Wiley-Liss; 1991. p. 177–91.
- [9] Moser HW. Therapy of X-Linked adrenoleukodystrophy. NeuroRx 2006;3:246–53.
- [10] Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen radicals and nervous system. Trends Neurosci 1996;8:22–6.
- [11] Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. Free radicals in biology and medicine. 3rd Edition. Oxford: Oxford University Press; 2001.

- [12] Colome C, Vilaseca MA, Sierra C. Congenital errors of metabolism: cause of oxidative stress? *Med Clin* 2000;115:111–7.
- [13] Wajner M, Latini A, Wyse AT, Dutra-Filho CS. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J Inher Metab Dis* 2004;27:427–48.
- [14] Bridi R, Araldi J, Sgarbi MB, Testa CG, Durigon K, Wajner M, et al. Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Int J Devl Neurosci* 2003;21:327–32.
- [15] Barschak A, Sitta A, Deon M, Oliveira MH, Haeser A, Dutra-Filho CS, et al. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis* 2006;21:279–86.
- [16] Latini A, Rosa RB, Scussiato K, Llesuy S, Belló-Klein A, Wajner M. 3-Hydroxyglutaric acid induces stress and decreases the antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats. *Brain Res* 2002;956:367–73.
- [17] Sirtori LR, Dutra-Filho CS, Fitarelli D, Sitta A, Haeser A, Barschak A, et al. Oxidative stress in patients with phenylketonuria. *Biochim Biophys Acta* 2005;1740:68–73.
- [18] Sitta A, Barschak A, Deon M, Terroso T, Pires R, Giugliani R, et al. Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. *Metab Brain Dis* 2006;21:287–96.
- [19] Vargas CR, Wajner M, Sirtori LR, Goulart L, Chiochetta M, Coelho D, et al. Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim Biophys Acta* 2004;1688:26–32.
- [20] Deon M, Wajner M, Sirtori L, Fitarelli D, Coelho DM, Sitta A, et al. The effect of Lorenzo's oil on oxidative stress in X-linked adrenoleukodystrophy. *J Neurol Sci* 2006;247:157–64.
- [21] Ohkawa H, Chishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue of thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351–8.
- [22] Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, Del Castillo MD. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Rad Biol Med* 1995;18:153–8.
- [23] Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 1993;84:407–12.
- [24] Yu TW, Ong ChN. Lag-time measurement of antioxidant capacity using myoglobin and 2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid): rationale, application and limitation. *Anal Biochem* 1999;275:217–23.
- [25] Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 1949;177:751–66.
- [26] Restuccia D, Lazzaro VDi, Valeriani M, Oliviero A, Le Pera D, Colosimo C, et al. Neurophysiological abnormalities in adrenoleukodystrophy carriers — evidence of different degrees of central nervous system involvement. *Brain* 1997;120:1139–48.
- [27] Schmidt S, Traber F, Block W, Keller E, Pohl C, Von Oertzen J, et al. Phenotype assignment in symptomatic female carriers of X-linked adrenoleukodystrophy. *J Neurol* 2001;248(suppl1):36–44.
- [28] Fatemi A, Barker PB, Ulug AM, Nagae-Poetscher LM, Beauchamp NJ, Moser AB, et al. MRI and MRSI in women heterozygous for X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurology* 2003;60(suppl8):1301–7.
- [29] Moser HW, Dubey P, Fatemi A. Progress in X-linked adrenoleukodystrophy. *Curr Opin Neurol* 2004;17:263–9.
- [30] Lu JF, Lawler AM, Watkins PA, Powers JM, Moser AB, Moser HW, et al. A mouse model for X-linked adrenoleukodystrophy. *Proc Nat Acad Sci U S A* 1997;94:9366–71.
- [31] Pujol A, Hindelang C, Callizot N, Bartsch U, Schaschner M, Mandel JL. Late onset neurological phenotype of X-ALD gene inactivation in mice: a mouse model for adrenomyeloneuropathy. *Hum Mol Genet* 2002;11(suppl5):499–505.

### 3.4 Capítulo 4 – Artigo 4

*Changes in total thiol content and lipid peroxidation in Zellweger Spectrum disorders*

Marion Deon, Giovana B. Biancini, Angela Sitta, Alethea G. Barschak, Daniella M. Coelho, Camila S. Vanzin, Anderson B. Oliveira, Roberto Giugliani, Moacir Wajner, Carmen. R. Vargas.

Este trabalho foi desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, ICBS, UFRGS.

Periódico: Metabolic Brain Disease

Status: submetido

## **CHANGES IN TOTAL THIOL CONTENT AND LIPID PEROXIDATION IN ZELLWEGER SPECTRUM DISORDERS**

Marion Deon<sup>1,3\*</sup>, Giovana B. Biancini<sup>1</sup>, Angela Sitta<sup>1,3</sup>, Alethea G. Barschak<sup>1</sup>  
Daniella M. Coelho<sup>1</sup>, Camila S. Vanzin<sup>1</sup>, Anderson B. Oliveira<sup>1</sup>, Roberto  
Giugliani<sup>1,3</sup>, Moacir Wajner<sup>1,3</sup>, Carmen. R. Vargas<sup>1,2,3\*</sup>.

<sup>1</sup>Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, PPGCF, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas:Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

**Running head: Protein and lipid oxidation in Zellweger spectrum disorders.**

### **\*Corresponding authors:**

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: crvargas@hcpa.ufrgs.br (Carmen R. Vargas)

marion\_deon@yahoo.com.br (Marion Deon)

**Abstract**

The importance of peroxisomes for human health became more evident when severe disorders in which functional peroxisomes are absent were identified. Defects in peroxisomal functions are associated with major, and often fatal, changes in human neurological development. The peroxisomal disorders are subdivided into two major categories: those with abnormal formation organelle (the peroxisomal biogenesis disorders – PBD) and those that are associated with defects of a single peroxisomal protein (the single peroxisomal enzyme (transporter) deficiencies – PED). Although neurological symptoms and brain abnormalities are characteristic of patients with PBD, very little is known about the pathomechanisms involved in the tissue damage of these disorders. In the present work we evaluated various oxidative stress parameters, namely thiobarbituric acid-reactive species (TBA-RS), total antioxidant status (TAS) and total thiol content in plasma from patients affected by Zellweger spectrum disorders (ZSD). It was observed a significant increase of plasma TBA-RS measurement, suggesting a stimulation of lipid peroxidation, as well as a decrease of membrane protein thiol content, which is indicative of protein oxidation. TAS measurement was not changed in plasma of ZSD patients, as compared to controls. It is therefore proposed that lipid peroxidation and protein oxidation may be involved in the pathophysiology of the Zellweger spectrum disorders.

**Key words:** oxidative stress, Zellweger spectrum disorders, thiobarbituric acid-reactive species, protein oxidation, lipid peroxidation.

## Introduction

The peroxisome is a small cellular organelle involved in both oxygen and lipid metabolism. The importance of the peroxisome is emphasized by the existence of various disorders associated with defects in this organelle (Wanders et al. 1995; Singh 1997). Defects in peroxisomal functions are associated with major, and often fatal, changes at the neurological level during human development (Gould et al. 2001; Wanders and Waterhan 2004).

All these disorders are genetically determined and so far 21 diseases with abnormalities in peroxisomal functions have been identified (Baumgartner and Saudubray 2002). Their combined incidence is estimated to be 1 in 20,000 or greater (Wanders et al. 1995). The peroxisomal disorders are divided in two categories, including: the single peroxisomal enzyme (transporter) deficiencies (PED) and the peroxisome biogenesis disorders (PBD). The first category is the disorders resulting from a defect in a single peroxisomal enzyme or in a single transporter deficiency and therefore only affect a single peroxisomal metabolic pathway. These disorders include hyperoxaluria type I, Refsum's disease, X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD), rhizomelic chondrodysplasia punctata (RCDP) types II and III and the beta-oxidation disorders (Steinberg et al. 2006; Wanders and Waterhan 2006).

The PBD group is characterized by abnormal formation or absent of peroxisome, which affects several or all peroxissomal functions and includes the Zellweger syndrome (ZS), neonatal adrenoleukodystrophy (NALD), infantile

Refsum disease (IRD) and Rhizomelic chondrodysplasia punctata (RCDP) type I. Taken together, PBD can result from mutations in any of at least 14 genes, known as PEX (peroxins) genes (Wanders and Waterhan 2004; Steinberg et al. 2006; Wanders and Waterhan, 2006). The first three disorders (ZS, NALD and IRD) are collectively called the Zellweger spectrum disorders (ZSD) that form a spectrum of overlapping features with the most severe being the ZS and the least severe IRD. These three diseases result in variable neurodevelopmental delay, retinopathy, perceptive deafness, dysmorphic cranial and facial features and liver disease. The ZS patients are severely hypotonic and weak from the birth and have distinct facial features, peri-articular calcifications, severe brain dysfunction associated with disturbance of neuronal migration and usually die within the first year. In NALD, the life span is slightly longer, but rarely longer than 5 years. Patients with NALD present hypotonia, seizures and progressive white matter disease and sometimes polymicrogyria. Patients with IRD may have external features reminiscent of ZS, but no alterations of neuronal migration disorder and no progressive white matter disease. The cognitive and motor development varies between severe and moderate learning disabilities with deafness and visual impairment due to retinopathy (Gould et al. 2001; Wanders and Waterhan 2004; Steinberg et al. 2006; Wanders and Waterhan 2006). Treatment focuses on symptomatic therapy, in general, attempting to limit the intake of very long fatty acids (VLCFA) and/or phytanic acid and no curative therapy is presently available for ZSD. The use of docosahexaenoic acid (DHA) has been suggested in patients with milder forms of ZSD and is undergoing evaluation (Martinez et al. 1993; Martinez et al. 2000).

RCDP type I is clinically different from the Zellweger spectrum disorders (ZSD), although there are some features shared by RCDP type I and the ZSD including the cranial facial (broad low nasal bridge, epicanthus, high arched palate, dysplastic external ears and micrognathia) and ocular abnormalities. Most RCDP patients die in the first decade of life (Steinberg et al. 2006; Wanders and Waterhan 2006).

All four of the above disorders share morphological and biochemical abnormalities. The absence of normal peroxisomes in the cells of these patients results in both the cytosolic localization and in the diminished activities of most peroxisomal matrix enzymes. For instance, in these patients there is a reduced synthesis of plasmalogens, reduced degradation of VLCFA, reduced plasma cholesterol levels, and an accumulation of bile acid intermediates, all of which reflect the absence or reduced activity of independent peroxisomal enzymatic pathways (Olivier and Krisans 2000). Also, the VLCFA accumulated in plasma from those patients, specially hexacosanoic acid, is higher than those found in plasma from X-ALD patients (Wanders et al. 1995).

Free radical damage seems to be involved in a large number of neurological diseases like Parkinson's disease, Alzheimer's disease, strokes, multiple sclerosis and epilepsy (Reznick and Packer 1993; Przedborski et al. 1996; Ben-Menachem et al. 2000; Dröge 2002; Halliwell and Gutteridge 2007). Oxidative stress also occurs in various inborn errors of metabolism with prominent neurological features (Colome et al. 2000; Wajner et al. 2004) like maple syrup urine disease (Bridi et al. 2003; Barschak et al. 2006; Barschak et al. 2008), glutaric acidemia type I (Latini et al. 2002), phenylketonuria (Sirtori et al. 2005; Sitta et al. 2006) and peroxisomal diseases like X-ALD.



Previous results from our laboratory have shown a significant increase in lipid peroxidation (TBA-RS and chemiluminescence) and a decrease of the tissue capacity to handle free radical formation (TAR) in plasma from symptomatic X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) patients. Significant increase of erythrocyte GPx activity, and catalase and superoxide dismutase activities in fibroblasts from these symptomatic patients was also observed, indicating that oxidative stress is involved in this disease (Vargas et al. 2004). In a subsequent study, it was demonstrated that lipid peroxidation occurs in symptomatic and asymptomatic X-ALD patients and that *Lorenzo's oil* treatment does not attenuate or prevent free radical generation in these patients (Deon et al. 2006; Deon et al. 2007).

ZS patients excrete in their urine elevated amounts of urinary metabolites of the arachidonic acid cascade such as leukotrienes in comparison with healthy children (Tsikas 1998; Mayatepek and Flock 1999; Fauler et al. 1994). Leukotrienes act to intensify cell permeability and increase oxidative stress, vascular smooth muscle cell migration and arterial tone (Osher et al. 2006).

Considering that the pathophysiology of Zellweger syndrome spectrum is not well established, the objective of the present study was to evaluate various parameters of oxidative stress such as thiobarbituric acid-reactive species (TBA-RS), total antioxidant status (TAS) and membrane protein thiol content in plasma of patients affected by Zellweger spectrum disorders in order to verify whether free radicals may be involved in the pathophysiology of these pathological conditions.

## **Material and Methods**

### *Reagents*

Chemicals were of PA purity and purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), except by thiobarbituric acid, which was purchased from Merck (Darmstadt, Germany), 2,2'-azo-bis-(2-aminidinopropane) (ABAP), which was purchased from Wako Chemicals (Richmond, VA, USA) and TAS measurement kit which was obtained from Randox Laboratories (Antrim, United Kingdom).

### *Patients and controls*

Plasma from seven patients with Zellweger spectrum disorders (3 girls and 4 boys) aged between one and 12 months ( $4.43 \pm 4.20$  months) were used to evaluate the parameters of oxidative stress. Samples were obtained at the time of the diagnosis, which was determined by increased plasma levels of pipecolic acid ( $72.7 \pm 169$   $\mu\text{mol/L}$ ), dihydroxycholestanic acid ( $10.5 \pm 8.6$   $\mu\text{mol/L}$ ), trihydroxycholestanic acid ( $18.4 \pm 21.9$   $\mu\text{mol/L}$ ), hexacosanoic acid ( $6.6 \pm 2.1$   $\mu\text{mol/L}$ ) and elevation of the ratio of hexacosanoic acid/docosanoic acid ( $0.28 \pm 0.08$ ). All specialized biochemical testing above was measured by gas chromatography. Plasma was also obtained from healthy age matched individuals (control group).

Clinical symptoms of ZSD patients included neonatal seizures, generalized hypotonia, weakness, cranial facial abnormalities, hepatomegalia,

retinopathy and variable neurodevelopmental delay. None patient who participated in this study was supplemented with vitamin E.

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

#### *Plasma preparation*

Plasma was prepared from whole blood samples obtained from fasting individuals (controls and ZSD) by venous puncture with heparinized vials. Whole blood was centrifuged at 1,000 g. Plasma was removed by aspiration and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

#### *Thiobarbituric acid-reactive species (TBA-RS)*

Thiobarbituric acid-reactive species (TBA-RS) were determined according to the method described by Ohkawa et al. (1979) using a Hitachi U-2001 double-beam spectrophotometer. Briefly, in a properly labeled tube was added 100  $\mu\text{l}$  of plasma, 50  $\mu\text{l}$  of sodium dodecyl sulfate (SDS) 8%, 375  $\mu\text{l}$  of acetic acid 20% pH 3.5 and 375  $\mu\text{l}$  of 0.8% thiobarbituric acid. The test tube was incubated at  $100^{\circ}\text{C}$  for 60 minutes. The mixture was allowed to cool on water for 5 minutes. The samples were centrifuged at 1,000 g for 10 minutes. The resulting pink stained TBA-RS were determined in a spectrophotometer at 535nm. Calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane

subjected to the same treatment as that of the samples. TBA-RS were calculated as nmol TBA-RS/mg protein.

#### *Total Antioxidant Status (TAS)*

TAS was assayed by using a kit from RANDOX laboratories using a Hitachi U-2001 double-beam spectrophotometer with temperature control. The plasma sample was incubated with ABTS® (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) plus a peroxide (metmyoglobin) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to produce the cation ABTS®<sup>+</sup>. A relatively stable blue-green color occurred and was measured at 37°C at 600 nm. Antioxidants in the added sample cause suppression of this color production to a degree which proportional to their concentration (Miller et al. 1993; Yu and Ong 1999). The results were expressed in mmol/L plasma.

#### *Total thiol content*

Total thiol content was determined using the 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) method (DTNB), as described by Aksenov and Markesbery (2001) with some modification. Briefly, 20 µl of the sample was mixed with 980 µl of phosphate buffer saline (PBS), pH 7.5, containing 1 mM EDTA. The reaction was started by the addition of 30 µl of 10 mM DTNB stock solution in PBS. After 30 min of incubation at room temperature, the absorbance at 412 nm was measured and the amount of TNB formed was calculated. Data were adjusted by protein content.

### *Protein determination*

Plasma protein concentrations were measured by the biuret method from Labtest kit (Gornall et al. 1949), using bovine serum albumin as standard.

### *Statistical analysis*

Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. The Student *t* test for non-paired samples was used to compare results from controls and Zellweger spectrum disorders patients. A *p* value less than 0.05 was considered significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer.

## Results

Initially, TBA-RS, a parameter of lipid peroxidation, was determined in plasma of ZSD patients. Figure 1 shows that TBA-RS measurement was significantly increased from 0.105 to 0.283 nmol/mg protein (169%) in plasma of ZSD patients compared to controls [ $t(17) = -4.013$ ,  $p < 0.01$ ]. This result indicates that lipid peroxidation is stimulated in ZSD individuals. We also found a significant positive correlation between TBA and C26 serum levels in this patients [ $r = 0.870$ ,  $p < 0.05$ ].

Next, we evaluated the total thiol content in which was significantly reduced from 4.146 to 1.875 nmol TNB/mg protein (54%) in plasma of ZSD patients compared to controls [ $t(17) = 3.366$ ,  $p < 0.01$ ] indicating protein oxidative damage (Figure 2).

We also verified that the total antioxidant status, which represents the total quantity of the tissue antioxidants, was not significantly changed in plasma of ZSD patients, as compared to controls [ $t(14) = 1.270$ ,  $p > 0.05$ ], although there was a decrease of the measure in ZSD patients (31%) (Figure 3).

## Discussion

Neurological symptoms and brain abnormalities are characteristic of patients with peroxisomal biogenesis disorders (PBD) (Steinberg et al. 2006; Wanders and Waterhan 2004). However, very little is known about the pathomechanisms involved in the tissue damage of these disorders (Wanders et al. 1995; Wanders and Waterhan 2004; Steinberg et al. 2006; Wanders and Waterhan 2006). Since peroxisomes are involved in oxidative reactions and are the most important site where oxygen radicals are alike produced and scavenged, in particular  $H_2O_2$  (Singh 1997), in the present study we investigated various parameters of oxidative stress in plasma from ZSD patients in order to clarify the underlying mechanisms of these disorders. We demonstrated a highly significant increase of TBA-RS in plasma from these patients. Considering that TBA-RS reflects the amount of malondialdehyde formation, an end product of membrane fatty acid peroxidation (Halliwell and Gutteridge, 2007) it is feasible that lipid peroxidation is induced in ZSD. It is important to emphasize that there is a very high concentration of the hexacosanoic acid in tissues from ZSD patients and we observed a positive correlation between hexacosanoic acid and TBARS plasma levels. The TBA-RS results presented in this study are in agreement with other study that observed high levels of 8-iso-prostaglandin F<sub>2</sub>alpha (8-iso-PGCFalpha) in urine of children with Zellweger syndrome (Tsikas et al. 1998). 8-iso-PGCFalpha is an important product of lipid peroxidation and its measurement is probably the gold standard

available assay of lipid peroxidation in biological samples (Halliwell and Gutteridge 2007; Nourooz-Zadeh 2008). However, our findings are different from other data in literature which have not found evidence for the presence of lipid peroxidation in PBD patients (Ferdinandusse et al. 2003). It should be stressed that, the patients from this study were supplemented with vitamin E (100mg per day). It is important to emphasize that vitamin E is the major lipid-soluble antioxidant in the cell antioxidant defense system and is exclusively obtained from the diet. The major biological role of vitamin E as antioxidant is believed to be an inhibitor of lipid peroxidation in vivo (Brown et al. 1994; Wang 1999; Kaikkonen et al. 2001; Saeed et al. 2005).

Next, we evaluate total thiol content as an index of protein oxidative damage (Aksenov and Markesbery 2001). It was observed a significant decrease of total thiol content in plasma of ZSD patients compared to controls, reflecting that protein oxidation was altered in ZSD patients probably secondary to free radical generation.

In contrast, we verified that plasma TAS measurement was not significantly altered in ZSD patients, although there was a 31% of reduction of TAS parameter as compared to the control group.

Therefore, our present results showing increased lipid and protein oxidation are indicative of free radical effects ZSD patients.

At this point it should be emphasized that the brain has low antioxidant defenses compared with other tissues, a fact that makes this tissue more vulnerable to increased reactive species (Dröge 2002; Halliwell and Gutteridge 2007). Therefore, in case the results of oxidative damage found in plasma from ZSD patients also occur in the brain, it may be presumed that this damage may



also compromise the brain of patients affected by ZSD, similarly to what occurs in other neurodegenerative disorders.

We have previously demonstrated that oxidative stress is probably involved in X-ALD, the most frequent peroxisomal beta oxidation demyelinating disorder (Vargas et al. 2004). It was verified that lipid peroxidation occurs in symptomatic and asymptomatic X-ALD patients (Deon et al. 2007).

Baumgart et al. (2001) showed that the changes of mitochondrial respiratory chain enzymes are accompanied by a marked increase of mitochondrial manganese superoxide dismutase, suggesting increased production of reactive oxygen species in mitochondria. Our findings are in line with the evidence signed by these investigators that increased oxidative stress induced probably by defective peroxisomal antioxidant mechanisms combined with accumulation of lipid intermediates of peroxisomal beta oxidation system could contribute significantly in the pathogenesis of multiple organ dysfunction in Zellweger syndrome (Baumgart et al. 2001). In this context, the role of peroxisomal oxidative stress in cellular function was highlighted by the loss of metabolic functions in peroxisomes of mutant cell lines (Zellweger syndrome like cells), where catalase is mistargeted to the cytoplasm, but restored to peroxisomes by genetic manipulation (Sheikh et al. 1998). Kawada et al. (2004) support that the mislocalization of catalase to cytoplasm instead in the matrix of peroxisomes creates excessive oxidative stress and peroxisomal dysfunction in human skin fibroblast from Zellweger syndrome-like patients and this defect can be reversed by the use of vitamin E. An important role of peroxisomes in defense against reactive oxygen species is demonstrated by the high sensitivity to UV-irradiation of cells from patients with peroxisome biogenesis disorders

with low levels of plasmalogens (Hoefler et al. 1991; Kremser et al. 1995; Spisni et al. 1998). Surdacki et al. (2003) assume that NO produced in excessive amounts in ZS patients could interact with superoxide forming toxic peroxinitrite, thus exacerbating damage and the progression of the disease.

In conclusion, it is proposed that free radical generation is involved in the pathophysiology of the tissue damage found in ZSD. However, further studies should be conducted with other techniques to measure oxidative stress, as well as other biological samples like cerebrospinal fluid (CSF) and fibroblasts could be used to measure these parameters in order to confirm our present results. Finally, since so far no effective therapy for ZSD has been proven to be successful it may be presumed that the administration of antioxidants should be considered as an adjuvant therapy for these patients.

**Acknowledgements**

This work was supported in part by grants from Capes, FAPERGS, CNPq and FIPE/HCPA – Brazil. The authors are grateful to Dr. Ronald J.A Wanders (Laboratory of Genetic and Metabolic Diseases, Academic Medical Center, University of Amsterdam, The Netherlands) for measuring VLCFA, dihydroxycholestanoic acid (DHCA), trihydroxycholestanoic acid (THCA) and Pipecolic acids using gas chromatography.

## References

- Aksenov, M.Y. and 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.
- 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.
- Baumgart, E., Vanhorebeek, I., Grabenbauer, M., Borgers, M., Declercq, P.E., Fahimi, H.D. and Baes, M. (2001). Mitochondrial Alterations Caused by Defective Peroxisomal Biogenesis in a Mouse Model for Zellweger Syndrome (PEX5 Knockout Mouse). *Am. J. Pathol.* 159:1477–1494.
- Baumgartner, M.R., Saudubray, J.M. (2002). Peroxisomal disorders. *Semin. Neonatol.* 7:85-94.
- Ben-Menachem, E., Kyllerman, R. and Markleind S. (2000). Superoxide dismutase and glutathione peroxidase function in progressive myoclonus epilepsies. *Epilepsy Res.* 40:33–39.
- Bridi, R., Araldi, J., Sgarbi, M.B., Testa, C.G., Durigon, K., Wajner, M. and Dutra-Filho, C.S. (2003). Induction of oxidative stress in rat brain by the

metabolites accumulating in maple syrup urine disease. *Int. J. Dev. Neuroscience* 21:327-332.

Brown, K.M., Morrice, P.C., Duthie, G.G. (1994). Vitamin E supplementation suppresses indexes of lipid peroxidation and platelet counts in blood of smokers and nonsmokers but plasma lipoprotein concentrations remain unchanged. *Am. J. Clin. Nutr.* 60:383-387.

Colome, C., Vilaseca, M.A. and Sierra, C. (2000). Congenital errors of metabolism: cause of oxidative stress? *Med. Clin.* 115: 111-117.

Deon, M., Wajner, M., Sirtori, L., Fitarelli, D., Coelho, D.M., Sitta, A., Barschak, A., Ferreira, G.C., Haeser, A., Giugliani, R. and Vargas, C.R. (2006). The effect of Lorenzo's oil on oxidative stress in X-linked adrenoleukodystrophy. *J. Neurol. Sci.* 247:157-164.

Deon, M., Sitta, A., Barschak, A.G., Coelho, D.M., Pigatto, M., Schmitt, G.O., Jardim, L.B., Giugliani, R., Wajner, M. and Vargas, C.R. (2007). Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Int. J. Dev. Neurosci.* 25(7):441-444.

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82:47-95.

Ferdinandusse, S., Finckh, B., De Hingh, Y.C., Stroomer, L.E.M., Denis, S., Kohlschütter, A. and Wanders, R.J.A. (2003). Evidence for increased oxidative stress in peroxisomal D-bifunctional protein deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 79(4):281-287.

Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and David, M.M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177:751-766.

- Gould, S.J, Raymond, G.V. and Valle, D. (2001). The Peroxisome Biogenesis Disorders. In: (Scriver, C.R., Beaudt, A.L., Sly, W.S., Valle, D., ed.), The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill Inc.; pp. 3181-3217.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., editors. (2007). Free radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, Oxford.
- Hoefler, G., Paschke, E., Hoefler, S., Moser, A.B. and Moser, H.W. (1991). Photosensitized killing of cultured fibroblasts from patients with peroxisomal disorders due to pyrene fatty acid-mediated ultraviolet damage. *J. Clin. Invest.* 88:1873–1879.
- Kaikkonen, J., Porkkala-Sarataho, E., Morrow, J.D., Roberts, L.J., Nyssönen, K., Salonen, R., Tuomainen, T.-P., Ristonmaa, U., Poulsen, H. E. and Salonen, J.T. (2001). Supplementation with vitamin E but not with vitamin C lowers lipid peroxidation in vivo in mildly hypercholesterolemic men. *Free Radical Res.* 35(6):967-978.
- Kawada, Y., Khan, M., Sharma, A.K., Ratnayake, D.B., Dobashi, K., Asayama, K., Moser, H.W., Contreras, M.A. and Singh, I. (2004). Inhibition of peroxisomal functions due to oxidative imbalance induced by mistargeting of catalase to cytoplasm is restored by vitamin E treatment in skin fibroblasts from Zellweger syndrome-like patients. *Mol. Genet. Metab.* 83:297–305.
- Kremser, K., Kremser-Jezik, M. and Singh, I. (1995). Effect of hypoxia-reoxygenation on peroxisomal functions in cultured human skin fibroblasts from control and Zellweger syndrome patients. *Free Radical Res.* 22:39–46.

- Latini, A., Rosa, R.B., Scussiato, K., Llesuy, S., Belló-Klein, A. and Wajner, M. (2002). 3-Hydroxyglutaric acid induces stress and decreases the antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats. *Brain Res.* 956:367-373.
- Martínez, M., Pineda, M., Vidal, R., Conill, J. and Martín, B. (1993). Docosahexaenoic acid – A new therapeutic approach to peroxisomal-disorder patients: Experience with two cases. *Neurology* 43:1389–1397.
- Martínez, M., Vázquez, E., García-Silva, M.T., Manzanares, J., Bertran, J.M., Castelló, F. and Mougán, I. (2000). Therapeutic effects of docosahexaenoic acid ethyl ester in patients with generalized peroxisomal disorders. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(1 Suppl):376S-385S.
- Mayatepek, E. and Flock, B. (1999). Increased urinary excretion of LTB<sub>4</sub> and omega-carboxy-LTB<sub>4</sub> in patients with Zellweger syndrome. *Clin. Chim. Acta.* 282(1-2):151-155.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V. and Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84:407-412.
- Moser, H.W. and Moser, A.B. (1991). Measurement of saturated very long chain fatty acid in plasma. In (F.A. Hommes, ed.), *Techniques of diagnostic human biochemical genetics*, Willy-liss, New York, pp. 177-191.
- Nourooz-Zadeh, J. (2008). Key issues in F<sub>2</sub>-isoprostane analysis. *Biochem. Soc. Trans.* 36: 1060–1065.
- Ohkawa, H., Chishi, N. and Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissue of thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95:351-358.

- Olivier, L.M. and Krisans, S.K. (2000). Peroxisomal protein targeting and identification of peroxisomal targeting signals in cholesterol biosynthetic enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1529:89-102.
- Osher, E., Weisinger, G., Limor, R., Tordjman, K. and Stern, N. (2006). The 5 lipoxygenase system in the vasculature: Emerging role in health and disease. *Mol. Cell. Endocrinol.* 252(1-2): 201-206.
- Przedborski, S., Donaldson, D.B.S., Jakowec, M., Kish, J.S., Guttman, M., Rosoklija, G. and Hays, A.P. (1996). Brain Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase Activities in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann. Neurol.* 39:158–165.
- Reznick, A.Z. and Packer, L. (1993). Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. (In: Poli G, Albano E, Dianzani MU, ed.), *Free Radicals: from Basic Science to Medicine*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 425-437.
- Saeed, S.A., Urfy, M.Z.S., Aly, T.M., Khimani, F.W., Gilani, A. (2005). Antioxidant: Their role in health and disease. *Intl. J. Pharmacol.* 1(3):226-233.
- Sheikh, F.G., Pahan, K., Khan, M., Barbosa, E. and Singh, I. (1998). Abnormality in catalase import into peroxisomes leads to severe neurological disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2961–2966.
- Singh, I. (1997) Biochemistry of peroxisomes in health and disease. *Mol. Cell. Biochem.* 167:1–29.
- 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.



- and 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. and Vargas, C.R. (2006). Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. *Metab. Brain Dis.* 21:287-296.
- Spisni, E., Cavazzoni, M., Griffoni, C., Calzolari, E. and Tomasi, V. (1998). Evidence that photodynamic stress kills Zellweger fibroblasts by a nonapoptotic mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1402:61–69.
- Steinberg, S.J., Dodt, G., Raymond, G.V., Braverman, N.E., Moser, A.B. and Moser, H.W. (2006). Peroxisome biogenesis disorders. *Biochim. Biophys. Acta* 1763:1733–1748.
- Surdacki, A., Tsikas, D., Mayatepek, E. and Frölich, J.C. (2003). Elevated urinary excretion of nitric oxide metabolites in young infants with Zellweger syndrome. *Clin. Chim. Acta* 334(1-2):111-115.
- Tsikas, D., Schwedhelm, E., Fauler, J., Gutzki, F.M., Mayatepek, E. and Frölich, J.C. (1998). Specific and rapid quantification of 8-iso-prostaglandin F2alpha in urine of healthy humans and patients with Zellweger syndrome by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 716(1-2):7-17.
- Vargas, C.R., Wajner, M., Sirtori, L.R., Goulart, L., Chiochetta, M., Coelho, D., Latini, A., Llesuy, S., Belló-Klein, A., Giugliani, R., Deon, M. and Mello, C.F. (2004). Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim. Biophys. Acta* 1688:26-32.

- Yu, T.-W., Ong, C.N. (1999). Lag-time measurement of antioxidant capacity using myoglobin and 2,29-azino-bis(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid): rationale, application and limitation. *Anal. Biochem.* 275:217-223.
- Wajner, M., Latini, A., Wyse, A.T. and 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. and Barth, P.G. (1995). Peroxisomal disorders: a review. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 17:726-739.
- Wanders, R.J.A. and Waterhan, H.R. (2004). Peroxisomal disorders I: biochemistry and genetics of peroxisome biogenesis disorders. *Clin. Genet.* 67:107–133.
- Wanders, R.J.A. and Waterhan, H.R. (2006). Peroxisomal disorders: The single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochim. Biophys. Acta* 1763:1707–1720.
- Wang, X. and Quinn, P.J. (1999). Vitamin E and its function in membranes. *Progress in Lipid Research.* 38:309-336.

## Figure legends

**Figure 1.** Thiobarbituric acid-reactive species (TBA-RS) in plasma from ZSD patients (n=7) and controls (n=12). Data represent the mean  $\pm$  SD. Difference from control, \*\*  $p < 0.01$  (Student' *t* test for unpaired samples).

**Figure 2.** Total thiol content in plasma from ZSD patients (n=7) and controls (n=12). Data represent the mean  $\pm$  SD. Difference from control, \*\*  $p < 0.01$  (Student' *t* test for unpaired samples).

**Figure 3.** Total antioxidant status (TAS) in plasma from ZSD patients (n=6) and controls (n=10). Data represent the mean  $\pm$  SD. No significance differences between means were found (Student' *t* test for unpaired samples).

Figure 1

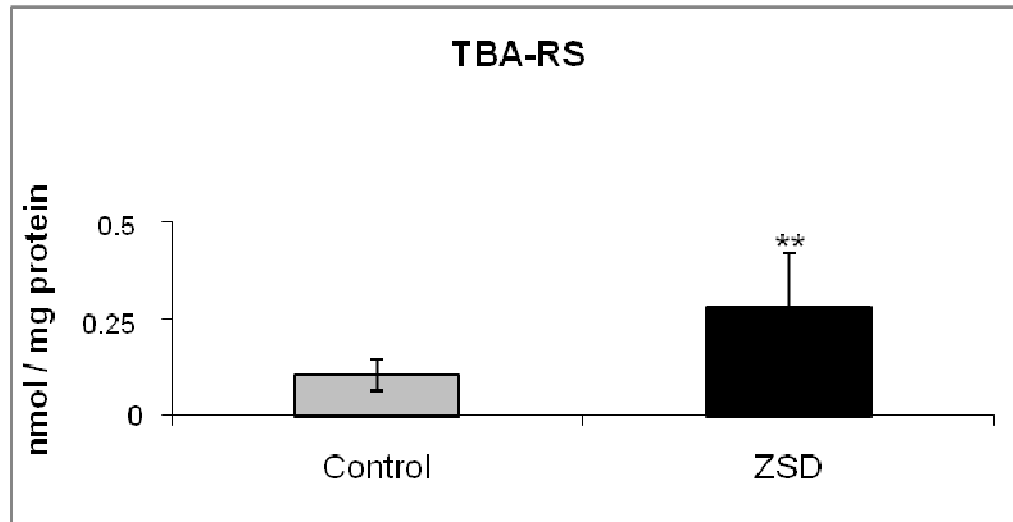


Figure 2

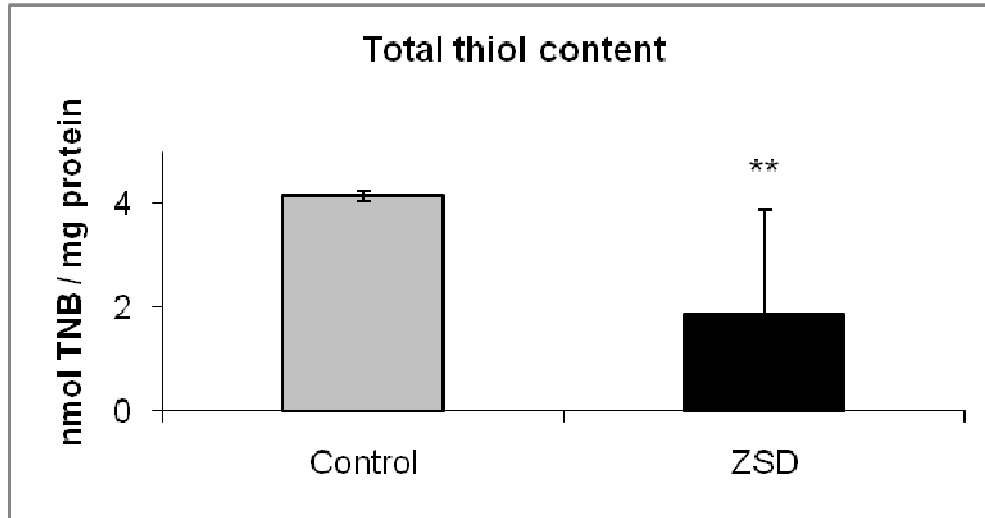
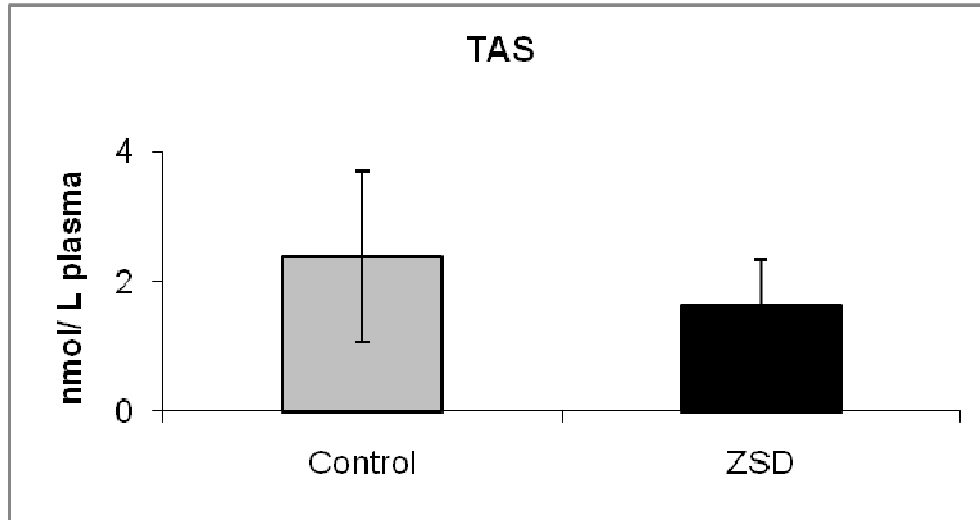


Figure 3



## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 X-ALD

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são defeitos hereditários, quase sempre devidos à deficiência de uma atividade enzimática, resultando em um bloqueio de rota metabólica em acúmulo de produtos tóxicos. Tal bloqueio, dependendo da via afetada, repercute clinicamente de maneira bastante variável no indivíduo, sendo geralmente de sintomatologia grave e muitas vezes letal (Scriver *et al.*, 2001). Os EIM podem ser classificados em três grandes grupos, sendo um deles o grupo dos distúrbios na síntese ou degradação de macromoléculas complexas. Os sintomas destas doenças pertencentes a este grupo são permanentes, progressivos, não-dependentes de eventos intercorrentes e não está relacionado à ingestão alimentar. Fazem parte deste grupo as doenças lisossômicas de depósito e as doenças peroxissomais (ex: adrenoleucodistrofia ligada ao X (X-ALD), doença de Refsum, síndrome de Zellweger etc.) (Saudubray e Charpentier, 2001).

Estudos *in vitro* e *in vivo* vêm relacionando EIM com manifestações neurológicas ao dano oxidativo e à geração de espécies reativas, sugerindo que o estresse oxidativo contribua de algum modo para a sintomatologia neurológica dessas doenças. Foi verificado que a lipoperoxidação está aumentada e as defesas antioxidantes diminuídas em cérebro de ratos nas acidemias metilmalônica e propiônica (Fontella *et al.*, 2000; Fighera *et al.*, 2003), bem como na acidemia 3-OH-glutárica (Latini *et al.*, 2002; Latini

*et al.*, 2005). Além disso, estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo está induzido em pacientes com tirosinemia tipo I (Bird *et al.*, 1995), com a doença da urina do xarope do bordo (Barschak *et al.*, 2006; Barschak *et al.*, 2007; Barschak *et al.*, 2008) e em pacientes com fenilcetonúria (Sierra *et al.*, 1998; Artuch *et al.*, 2004; Sirtori *et al.*, 2005; Sitta *et al.*, 2006; Sitta *et al.*, 2009).

O cérebro possui níveis relativamente baixos de enzimas antioxidantes e um conteúdo lipídico razoavelmente alto com grandes quantidades de ácidos graxos insaturados e catecolaminas, os quais são substratos suscetíveis ao ataque de espécies reativas (Halliwell e Gutteridge, 2007). Além disso, o envolvimento de radicais livres e do estresse oxidativo na fisiopatologia de várias doenças que comprometem o SNC vem sendo cada vez mais comprovadas. Neste aspecto, um dos pontos abordados e discutidos são as variáveis patológicas que fazem com que os neurônios não afetados diretamente pelo dano primário nestas doenças, sejam, então, afetados por uma cascata de eventos provocada pelo insulto primário. Um dos primeiros fenômenos observados nesta cascata é o processo de lipoperoxidação induzida por radicais livres (Floyd e Carney, 1992).

Já nas doenças genéticas de armazenamento, há menos relatos enfatizando o papel do estresse oxidativo na patogênese das mesmas. X-ALD é um erro inato do metabolismo, caracterizada bioquimicamente pelo acúmulo de VLCFA, principalmente o ácido hexacosanóico (C<sub>26:0</sub>) em tecidos e fluidos corporais e clinicamente por uma desmielinização progressiva. Muito pouco se sabe sobre a fisiopatologia e os mecanismos envolvidos no dano tecidual desta doença (Moser *et al.*, 2001). Em um estudo anterior, investigamos vários parâmetros de estresse oxidativo em plasma, em eritrócitos e em fibroblastos cultivados de pacientes com X-ALD (Vargas *et al.*, 2004). Foram verificados no plasma de pacientes X-ALD sintomáticos um aumento



significativo de quimiluminescência e TBA-RS, indicando que a lipoperoxidação está induzida no plasma de pacientes X-ALD e encontramos também uma diminuição de reatividade antioxidante total (TAR), indicando uma reduzida capacidade de modular a geração de radicais livres. Considerando que um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e as espécies reativas formadas nos tecidos é indicativo de estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2007), foi proposto que a geração de radicais livres esteja envolvida na fisiopatologia do dano tecidual encontrado na X-ALD. Os resultados alterados das atividades enzimáticas antioxidantes nos eritrócitos e nos fibroblastos de pacientes com X-ALD verificados neste trabalho fortemente corroboraram com essa suposição.

Ainda não há um tratamento totalmente efetivo para X-ALD. Um dos tratamentos preconizados para X-ALD, dietoterapia com óleo de Lorenzo (OL) (dieta restrita de VLCFA + OL), resulta numa diminuição tecidual importante dos ácidos graxos de cadeia muito longa acumulados. Entretanto, ainda é questionada a eficácia desse tratamento já que o mesmo apresenta pouco benefício clínico aos pacientes afetados que já apresentem sintomas neurológicos (van Geel *et al.*, 1997; Restuccia *et al.*, 1999; Moser *et al.*, 2001). No entanto, a rápida progressão do dano neurológico da X-ALD parece estar relacionada à ativação de astrócitos e à indução de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, sabe-se que o óleo de Lorenzo (gliceroltrioleato/gliceroltrierucato) não atua sobre o processo neuroinflamatório presente nestes pacientes.

Nesse contexto, avaliamos, em um estudo prévio, o efeito do tratamento com OL sobre diferentes parâmetros de estresse oxidativo em plasma e em eritrócitos de pacientes com X-ALD sintomáticos e assintomáticos tratados e não tratados com OL (Deon *et al.*, 2006). Observamos um aumento significativo de TBA-RS no plasma de

pacientes X-ALD não tratados com OL, que reflete a quantidade de malondialdeído formado. Verificamos também que o tratamento com OL não reverteu esse aumento. Foi observado também que a determinação de TAR no plasma de pacientes X-ALD tratados e não tratados com OL não apresentou alterações significativas em comparação aos controles. Além disso, medida da atividade das enzimas antioxidantes CAT, GPx e SOD, que foi realizada em eritrócitos de pacientes X-ALD de fenótipo assintomático, não se mostrou alterada, antes ou após o tratamento com OL. Portanto, foi observado que o tratamento com óleo de Lorenzo não protege ou atenua a produção de radicais livres em pacientes X-ALD sintomáticos e assintomáticos.

Apesar do tratamento com OL em pacientes X-ALD não ter mostrado efeito sobre o estresse oxidativo, esta terapêutica mostra-se clinicamente eficaz em portadores assintomáticos. Por isso, no presente trabalho, resolvemos avaliar o efeito do tratamento com óleo de Lorenzo por 20 meses em nossos pacientes X-ALD com as formas cALD e assintomática sobre os níveis plasmáticos dos VLCFA. Foi observada uma diminuição significativa das concentrações do  $C_{26:0}$  em pacientes cALD e assintomáticos. Entretanto, os níveis de  $C_{26:0}$  reduziram-se até a faixa de referência somente nos pacientes assintomáticos estudados após os 20 meses de tratamento, sendo que ainda essas concentrações diminuíram significativamente logo após a instituição da dietoterapia com OL. Essa excelente resposta bioquímica ocorreu somente na forma assintomática. Cabe salientar que estes pacientes continuaram sem manifestações clínicas durante o período do estudo. Moser e colaboradores (2005) avaliaram 89 meninos assintomáticos com X-ALD que foram tratados com OL e acompanhados por em média 8 anos. Foi verificado por estes autores que a redução de  $C_{26:0}$  mediante o tratamento com OL estava relacionada com risco reduzido de desenvolvimento do dano cerebral detectado pela ressonância nuclear magnética (RNM).

Sendo assim, mesmo que o tratamento com óleo de Lorenzo não previna nem atenua a geração de radicais livres em pacientes X-ALD sintomáticos e assintomáticos, cabe salientar seus benefícios na normalização dos níveis de  $C_{26:0}$  em indivíduos assintomáticos, o que parece estar relacionado com a redução e/ou a prevenção da progressão dos danos neurológicos.

A X-ALD é uma doença peroxissomal desmielinizante caracterizada por uma ampla variabilidade fenotípica, a qual poderia ser causada por genes modificadores autossômicos ou por fatores não genéticos. Existe uma notável diversidade dos sintomas neurológicos e endocrinológicos em pacientes com X-ALD, com uma correlação pouco clara entre mutações do gene ALD e os diferentes fenótipos neurológicos. Os fenótipos clínicos da X-ALD são: forma cerebral infantil, forma cerebral juvenil, forma cerebral adulta, adrenomieloneuropatia (AMN), insuficiência adrenal isolada sem sintomas neurológicos (Addison Isolado), forma olivo-ponto-cerebelar e indivíduos neurologicamente assintomáticos. Estes vários fenótipos podem ocorrer dentro de uma mesma família. Desde o primeiro caso de X-ALD relatado em 1910 até hoje, muito pouco é conhecido sobre o mecanismo envolvido no dano neurológico desta enfermidade (Moser *et al.*, 2001; Moser *et al.*, 2007).

A forma cerebral infantil da X-ALD (cALD ou CCER) é a mais grave. Esta forma clínica é a mais comum e tem o fenótipo mais grave, com início de comprometimento neurológico normalmente entre 4 e 10 anos de idade, levando a um estado vegetativo e morte dentro de poucos anos. A desmielinização progressiva do SNC está associada a uma resposta inflamatória no cérebro. Uma vez que os sintomas neurológicos manifestam-se, a deterioração é rápida. O intervalo médio entre o primeiro sintoma neurológico e o estado vegetativo é de aproximadamente 2 – 4 anos. Após este período,

em geral o paciente está acamado, incapaz de ver e falar e alimentando-se por sonda (Moser, 1997; Moser *et al.*, 2001).

A segunda forma mais comum de X-ALD é a adrenomieloneuropatia (AMN), que é subdividida em dois fenótipos: a forma não inflamatória AMN “pura” e a forma AMN “cerebral”. Na forma clínica AMN “puro”, o início dos sintomas ocorre em média após os 21 anos de idade, envolvendo principalmente a medula espinhal e os nervos periféricos, levando a paraparesia progressiva e disfunção esfinteriana (Dubois-Dalcq *et al.*, 1999). Em contraste com as formas cerebrais da X-ALD, a AMN “pura” parece ser uma axonopatia que envolve mais severamente os aspectos distais dos axônios com a perda da mielina da medula espinhal. A incapacidade neurológica é lentamente progressiva, de modo que dentro de 5 a 15 anos após o início da doença os distúrbios do andar tornam-se graves e requerem o uso de bengala ou de cadeira de rodas (Moser *et al.*, 2001). Aproximadamente 40% dos pacientes AMN também podem desenvolver a forma AMN “cerebral”, com evolução semelhante a da forma cerebral adulta, em que ocorre algum grau de envolvimento cerebral tanto no desenvolvimento de sintomatologia clínica, quanto na apresentação de evidência de comprometimento neuroinflamatório (Mahmood *et al.*, 2005).

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

Em estudos anteriores, verificamos alteração em vários parâmetros de estresse oxidativo em plasma, eritrócitos e fibroblastos de pacientes sintomáticos com X-ALD com os fenótipos cALD e AMN (Vargas *et al.*, 2004). Deve ser destacado que na maioria dos testes foram utilizados quase que exclusivamente plasma, eritrócitos e

fibroblastos de pacientes com a forma cerebral infantil (cALD). Assim, as conclusões obtidas a partir desses resultados foram direcionadas para este fenótipo. Entretanto, especificamente nas medidas de TBA-RS e de TAR foram usadas amostras de pacientes com os fenótipos clínicos cALD e AMN. Neste caso, aparentemente não houve diferença entre os valores obtidos para estes parâmetros nesses dois fenótipos, sugerindo que o estresse oxidativo também ocorresse no fenótipo AMN. Posteriormente, analisamos o efeito do tratamento com OL sobre parâmetros de estresse oxidativo (Deon *et al.*, 2006). Verificamos que o tratamento com OL não protegeu ou atenuou a produção de radicais livres em pacientes X-ALD, lembrando que neste estudo foram utilizadas amostras de pacientes com fenótipo cALD e com fenótipo assintomático. A partir destes resultados, viu-se a importância de investigar mais profundamente os parâmetros de estresse oxidativo nas diferentes formas clínicas da X-ALD.

Desta forma, no presente trabalho, avaliamos em plasma de pacientes com X-ALD de diferentes formas clínicas (cALD, AMN e assintomáticos) a lipoperoxidação e as defesas antioxidantes não enzimáticas. Verificamos um aumento significativo da medida de TBA-RS em plasma de pacientes sintomáticos (cALD e AMN) e assintomáticos com X-ALD, uma vez que este parâmetro reflete a quantidade de malondialdeído formado, um produto final da peroxidação de ácidos graxos da membrana. Observamos aumento da lipoperoxidação em plasma de pacientes X-ALD, independentemente dos fenótipos e da manifestação de sintomas.

Além disso, foi observada uma diminuição do status antioxidante total (TAS) em plasma de pacientes sintomáticos (cALD e AMN), porém nenhuma alteração do TAS foi observada no plasma de pacientes assintomáticos. Este parâmetro é um indicativo da quantidade total de antioxidante, possibilitando a avaliação dos componentes biológicos

com atividade antioxidante no plasma (Miller *et al.*, 1993; Halliwell e Gutteridge, 2007). Considerando, pois, que o status antioxidante total plasmático está preservado em indivíduos assintomáticos, pode-se supor que a ausência de sintomas possa estar relacionada com o nível normal dessas defesas antioxidantes que são capazes de combater a geração de espécies reativas. Ainda, foi observada uma diminuição mais acentuada do TAS em pacientes AMN relativamente aos com cALD, bem como um maior aumento de TBA-RS no grupo AMN em relação aos outros grupos (controle, assintomático e cALD). Os mecanismos pelos quais os pacientes AMN parecem ser mais afetados pela alteração desses parâmetros, apresentando maior lipoperoxidação e maior redução da quantidade de antioxidantes não enzimáticos, ainda não podem ser totalmente explicados, mas isto poderia ser devido à idade mais avançada destes pacientes. Por outro lado, estes dados indicam que outras causas relacionadas a gravidade das variantes X-ALD necessitam investigação. Além disso, cabe salientar que não há dados na literatura que mostrem a avaliação de estresse oxidativo nas diferentes formas clínicas da X-ALD.

A ampla variabilidade fenotípica característica da X-ALD também inclui 5 fenótipos clínicos para mulheres heterozigotas (HTZ) para X-ALD que são: forma assintomática, mieloneuropatia branda, mieloneuropatia moderada a severa, forma cerebral e insuficiência adrenal (Moser *et al.*, 2001). A forma assintomática caracteriza-se por mulheres que apresentam níveis elevados de VLCFA e mutação no gene X-ALD, nenhuma manifestação neurológica e estão na faixa etária abaixo dos 30 anos de idade. Por muito tempo, acreditou-se que a X-ALD afetava apenas os homens, porém nos últimos 15 anos tem-se visto que mais da metade dessas mulheres heterozigotas para X-ALD desenvolvem sintomas. Com o avançar da idade, a frequência com que as HTZ se tornam sintomáticas aumenta muito. Tais sintomas costumam iniciarem a partir da

quarta década de vida, enquanto a manifestação dos sintomas na infância é extremamente rara. Os principais sintomas que acometem essas mulheres são os neurológicos, atingindo a medula espinhal e resultando em paraparesia progressiva, anormalidade do controle esfinteriano e distúrbios sensoriais, afetando principalmente os membros inferiores. A sintomatologia apresentada pelas HTZ é bastante semelhante a da forma de adrenomieloneuropatia (AMN) em homens e sua gravidade varia de branda a severa (Moser *et al.*, 2001). Já os comprometimentos cerebral e adrenal são muito raros, bem como as alterações na substância branca vista por RMN (Schmidt *et al.*, 2001; Fatemi *et al.*, 2003). Quando não há uma história familiar de X-ALD, essas mulheres são erroneamente diagnosticadas como portadoras de esclerose múltipla devido a presença de sintomas e alterações em testes cognitivos e raramente na RNM (Moser *et al.*, 2001).

Tendo em vista que não há dados na literatura sobre a investigação de estresse oxidativo em mulheres portadoras de X-ALD, estudamos vários destes parâmetros nesse grupo populacional. Observamos em nosso estudo em plasma de mulheres heterozigotas para X-ALD um aumento significativo da medida de TBA-RS e uma diminuição da reatividade antioxidante total (TAR), indicando dano oxidativo a lipídios e uma capacidade deficiente em rapidamente combater um aumento das espécies reativas. Por outro lado, a medida do TAS não apresentou alteração no plasma destas mulheres, indicando possivelmente que a diminuição das defesas antioxidantes detectada na medida de TAR seja devido a componentes muito reativos e específicos. Foram também correlacionados os níveis plasmáticos de VLCFA com as medidas de TAR e TBA-RS, mas nenhuma associação foi evidenciada entre  $C_{26:0}$  e  $C_{26:0}/C_{22:0}$  e os parâmetros de estresse oxidativo estudados, o que indica que a geração de espécies reativas observadas nas mulheres heterozigotas para X-ALD não está relacionada com os níveis elevados de

VLCFA. Entretanto, o aumento de TBA-RS e a diminuição de TAR em HTZ sugerem que a geração de radicais livres esteja envolvida na fisiopatologia tecidual encontrada em mulheres HTZ para X-ALD. Cabe salientar que a X-ALD cerebral é uma doença essencialmente neuroinflamatória e que a inflamação geralmente leva ao estímulo da produção de espécies reativas.

Tomando em seu conjunto, nossos resultados mostraram que no plasma dos pacientes cALD, AMN, assintomáticos e heterozigotas para X-ALD ocorre a elevação dos níveis de TBA-RS que indicam dano peroxidativo aos fosfolipídios de membrana. Nesse contexto, a oxidação de lipídios da membrana celular de neurônios pode alterar sua fluidez, bem como provocar mudanças em receptores potencialmente causando morte celular (Mahadik *et al.*, 2001; Halliwell e Gutteridge, 2007). Vários estudos em diversos tecidos indicam que a peroxidação lipídica e a geração de radicais livres estejam presentes na X-ALD (Vargas *et al.*, 2004; Powers *et al.*, 2005; Deon *et al.*, 2006). Além disso, há evidências que malondialdeído-lisina (MDAL), um produto do dano lipoxidativo a proteínas, se acumula na medula espinhal dos camundongos nocaute (KO) ABCD1 e em fibroblastos de pacientes X-ALD (Fourcade *et al.*, 2008). Por outro lado, foi verificado um aumento de radicais livres em células gliais enriquecidas com C<sub>26:0</sub>, principal ácido graxo de cadeia muito longa acumulado na X-ALD (Di Biase *et al.*, 2004). Segundo os autores, a liberação desses produtos oxidativos indica que os radicais livres tem papel importante na patogênese da resposta neuroinflamatória na X-ALD.

Ainda, Yanagisawa *et al.* (2008) observaram em macrófagos de camundongos KO para X-ALD aumento dos níveis de VLCFA, da produção de nitrato, de ERO e de citocinas pró-inflamatórias. Estes resultados sugerem que o aumento de VLCFA em macrófagos pode contribuir na patogênese inflamatória da doença através do aumento



das respostas inflamatórias e oxidativas. Semelhante estudo foi realizado em linfoblastos de pacientes com X-ALD por Uto e colaboradores (2008). Neste estudo foi observado que estas células produzem altos níveis de óxido nítrico e citocinas e também geram elevadas quantidades de espécies reativas de oxigênio, que podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento e progressão da neuroinflamação na X-ALD.

Resultados semelhantes aos nossos encontrados em plasma humano também foram verificados em cérebro de pacientes com X-ALD. Powers *et al.* (2005), em estudos *post mortem* com córtex adrenal e cérebro de pacientes com X-ALD, demonstraram evidências de estresse oxidativo. O estresse oxidativo foi demonstrado através do aumento da expressão de vários parâmetros como nas enzimas manganês-superóxido dismutase e hemoxigenase-1, componentes do sistema antioxidante. O dano oxidativo foi observado através do aumento da produção de malondialdeído, 4-hidroxinonal e de proteínas nitrosiladas nas lesões desmielinizantes. Portanto, pode-se presumir que o estresse oxidativo pode comprometer o cérebro na X-ALD, de modo semelhante ao que ocorre em outras enfermidades neurodegenerativas.

O estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia de várias doenças como neoplasias, esclerose amiotrófica lateral, ataxia de Friedreich e etc (Reznick *et al.*, 1993; Karelson *et al.*, 2001; Méndez-Álvarez *et al.*, 2001; Halliwell e Gutteridge, 2007). Em vista disto, diversos estudos vêm sendo realizados no intuito de estudar o papel dos antioxidantes e/ou de drogas antioxidantes na prevenção e/ou tratamento de diversas das mesmas (Matés e Sánchez-Jiménez, 2000; Schulz *et al.*, 2000; Graf *et al.*, 2005; Di Prospero *et al.*; 2007).

Em condições de normalidade, a ação de vários antioxidantes, que compõem o sistema de defesa antioxidante seja os enzimáticos ou não-enzimáticos, protegem o nosso organismo contra o dano oxidativo induzidos por ERO e/ou ERN (Halliwell e

Gutteridge, 2007). As defesas antioxidantes não-enzimáticas são substâncias de baixo peso molecular que em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retardam ou previnem a oxidação desse substrato. Essas substâncias preservam e protegem as biomoléculas contra a oxidação (Halliwell e Gutteridge, 2007). Dentre esses vários antioxidantes, pode-se destacar a vitamina E e a N-acetilcisteína.

O termo vitamina E designa todos os tocoferóis (principalmente,  $\alpha$ -tocoferol) que são efetivos na inibição da peroxidação dos lipídios de membrana, agindo principalmente sobre os radicais peroxil formando o radical tocoferoxil. Este tocoferoxil inibe a propagação da reação em cadeia envolvida na lipoperoxidação e pode ser regenerado a  $\alpha$ -tocoferol pelo ácido ascórbico ou pela GSH (Halliwell e Gutteridge, 2007). O  $\alpha$ -tocoferol, uma substância lipossolúvel, está presente nas membranas celulares, mitocôndrias e em lipoproteínas plasmáticas. Devido as suas propriedades antioxidantes, acredita-se no seu potencial na prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo, como câncer e enfermidades neurológicas (Brown *et al.*, 1994; Wang, 1999; Kaikkonen *et al.*, 2001; Saeed *et al.*, 2005; Halliwell e Gutteridge, 2007)

A substância N-acetilcisteína (NAC) é um composto tiólico que tem ação mucolítica, sendo comumente usada em tratamento de doenças respiratórias e pulmonares. Devido a sua estrutura química foi demonstrado que a NAC funciona como antioxidante, tendo sido propostos dois possíveis mecanismos para sua ação antioxidante: direta e indiretamente. Diretamente, a NAC age como um potente removedor de espécies reativas, como superóxido, hidroxila, peróxido nítrico, e indiretamente como precursor da glutatona, o qual é substrato da enzima antioxidante GPx (Arakawa e Ito, 2007; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Foi também demonstrado que a NAC, um agente antioxidante, inibe a produção de superóxido e de nitritos em células gliais de ratos adicionadas de C<sub>26:0</sub>, um modelo *in*

*vitro* para X-ALD (Di Biase *et al.*, 2005). Tolar e colaboradores (2007) evidenciaram que administração de NAC durante o processo de transplante de células hematopoiéticas protegia 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.

Por outro lado, Fourcade *et al.* (2008) observaram que trolox, um análogo da vitamina E, reverte lesões oxidativas *in vitro* em tecidos de animais KO e em fibroblastos de pacientes X-ALD tornando-se, portanto, assim como a NAC, uma possível estratégia terapêutica para X-ALD.

Ainda, considerando os resultados encontrados neste estudo e em outros, quanto ao efeito do tratamento com OL sobre os níveis de C<sub>26:0</sub> nos pacientes assintomáticos com X-ALD e, já que nenhuma terapia para X-ALD tem sido totalmente eficaz e bem sucedida, pode-se propor que a instituição desse tratamento em indivíduos X-ALD assintomáticos deva ser usada já que retarda nestes indivíduos o aparecimento dos sintomas neurológicos. A terapia adjuvante com antioxidantes associados ao OL poderia ser benéfica as diferentes formas clínicas da X-ALD e em especial aos pacientes assintomáticos, cujas defesas antioxidantes parecem estar preservadas.

Além disso, foi proposto por vários autores que o dano neurológico que ocorre na X-ALD pode ser mediado pela ativação de astrócitos e pela indução de citocinas pró-inflamatórias (Powers *et al.*, 1992; McGuinness *et al.*, 1997). Como os radicais livres também estão envolvidos na resposta inflamatória e na fisiopatologia de várias doenças neurodegenerativas, os resultados aqui apresentados podem estar refletindo o mesmo fenômeno.

## 4.2 Espectro Zellweger

Os peroxissomos são organelas que se encontram em todas as células nucleadas de mamíferos. Foi assim denominada, “peroxissomo”, devido à formação de peróxido de hidrogênio em consequência da respiração celular catalisada por oxidases e catalase (Wanders *et al.*, 1995; Singh, 1997). Foi verificado que as manifestações clínicas que ocorrem na carência e/ou ausência dessa organela sugerem que esta desempenha papel importante na mielinização e na migração neuronal (Wanders e Waterhan, 2004). Essa organela apresenta também importante função na desintoxificação de produtos gerados por espécies reativas de oxigênio (Schrader e Fashimi, 2006).

Os distúrbios peroxissomais são caracterizados, bioquimicamente, pelo acúmulo dos metabólitos que normalmente são degradados no peroxissomo nos líquidos biológicos. O envolvimento neurológico é a principal característica em 18 dos 21 distúrbios peroxissomais já descritos (Powers e Moser, 1998; Wanders *et al.* 2001; Baumgartner e Saudubray, 2002). O manejo terapêutico para estas enfermidades é essencialmente sintomático, não havendo ainda um tratamento curativo.

O Espectro Zellweger é composto por três fenótipos de maior a menor grau de seriedade clínica, respectivamente: a síndrome de Zellweger (SZ), a adrenoleucodistrofia neonatal e a doença de Refsum infantil. Todas essas doenças são congênitas, herdadas de forma autossômica recessiva e apresentam sintomas neurológicos. Sabe-se que essas doenças se caracterizam pela deficiência na biogênese do peroxissomo, porém os mecanismos pelos quais os danos neurológicos ocorrem ainda não estão bem esclarecidos. A deficiência na biogênese do peroxissomo com a formação anormal ou ausência da organela resulta em algumas disfunções, tais como:

na degradação dos ácidos graxos de cadeia muito longa devido ao defeito na beta oxidação peroxissomal; na biossíntese de plasmalógenos (éter de fosfolipídios); na formação dos lipídios intermediários do metabolismo dos ácidos biliares; no catabolismo do ácido pipecólico e oxidação do ácido fitânico. Esses defeitos resultam no acúmulo dos VLCFA, dos ácidos pristânico, fitânico, pipecólico e biliares (ácidos triidroxicolestanóico - THCA e diidroxicolestanóico - DHCA) e também na ausência da síntese de plasmalógenos detectada nas hemácias (Gould *et al.*, 2001; Olivier e Krisans, 2000; Steinberg *et al.*, 2006). Todas as enfermidades em que ocorre alguma anormalidade na metabolização lipídica peroxissomal apresentam disfunções neurológicas com diferentes graus de gravidade. Nas doenças do Espectro Zellweger, há três tipos característicos de envolvimento no SNC: alterações na migração neuronal, na substância branca e envolvimento neuronal seletivo (Gould *et al.*, 2001; Steinberg *et al.*, 2006).

O estresse oxidativo parece estar envolvido em diversas patologias que afetam o sistema nervoso central, como vários EIM, entre os quais a adrenoleucodistrofia ligada ao X, a mais freqüente doença peroxissomal (Colomé *et al.*, 2000; Wajner *et al.*, 2004; Vargas *et al.*, 2004; Powers *et al.*, 2005; Deon *et al.*, 2006). Além disso, os mecanismos de dano neurológico e a fisiopatologia das doenças do Espectro Zellweger ainda não estão bem estabelecidos. Sendo assim, com o propósito de verificar se o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia das doenças do Espectro Zellweger, investigamos alguns parâmetros de estresse oxidativo como as medidas de TBA-RS, TAS e do conteúdo total de tióis em plasma destes pacientes.

A lipoperoxidação é um processo contínuo que ocorre nas membranas celulares decorrente da ação dos radicais livres, que como conseqüência leva a mudanças na estrutura e na fluidez de membrana e a alterações nos receptores de membranas,

podendo causar a morte celular, principalmente a neuronal (Mahadik *et al.*, 2001; Halliwell e Gutteridge, 2007). Por isso, realizamos a medida de TBA-RS que é um parâmetro indicativo de lipoperoxidação e verificamos um aumento significativo desta determinação no plasma destes pacientes quando comparado ao grupo controle. Além disso, encontramos uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos de C<sub>26:0</sub> e a medida de TBA-RS nos indivíduos portadores de doenças do Espectro Zellweger, indicando que o ácido hexacosanóico possa ser responsável pela lipoperoxidação. Isto pode ser influenciado pelas altas concentrações plasmáticas do C<sub>26:0</sub> encontradas nestes pacientes. Entretanto, não foi observada correlação entre os demais parâmetros bioquímicos alterados nestes pacientes e os parâmetros de estresse oxidativo.

Estudos *in vitro* em que C<sub>26:0</sub> é adicionado a culturas de células gliais e neurônios de hipocampo de rato e a cultura de fatias de medula espinhal de camundongos nocaute ABDC1 evidenciam que a concentração do ácido hexacosanóico está diretamente relacionada com a geração de radicais livres e danos oxidativos (Di Biase *et al.*, 2004; Foucarde *et al.*, 2008; Hein *et al.*, 2008).

Assim, nossos resultados estão de acordo com observações feitas em pacientes com síndrome de Zellweger. Evidências de lipoperoxidação foram observadas em urina de pacientes com síndrome de Zellweger através da detecção dos altos níveis de 8-iso-prostaglandina-F<sub>2</sub>alfa, um importante produto de lipoperoxidação (Tiskas *et al.*, 1998). A medida dos níveis de 8-iso-prostaglandina-F<sub>2</sub>alfa é considerada uma determinação padrão ouro para lipoperoxidação (Halliwell e Gutteridge, 2007). Além disso, também foi postulado que o aumento de estresse oxidativo induzido por mecanismos antioxidantes peroxissomais defeituosos combinados ao acúmulo de lipídios intermediários ao sistema de beta oxidação peroxissomal poderia contribuir

significativamente na patogênese a disfunção de múltiplos órgãos (cérebro, fígado, rins e ossos) observada na síndrome de Zellweger (Baumgart *et al.*, 2001).

Também observamos em nosso estudo uma redução significativa do conteúdo total de tióis no plasma destes pacientes. Este ensaio é baseado na redução do ácido ditionitrobenzóico (DTNB) por tióis presentes no plasma, gerando o ácido tionitrobenzóico (TNB), logo uma diminuição do conteúdo total de tióis indica a oxidação de grupamentos sulfidríla (principalmente, resíduos de cisteína) presentes nas proteínas plasmáticas a pontes de dissulfetos (Aksenov e Markesbery, 2001). Os grupamentos sulfidríla presentes no plasma são sensíveis a oxidação das ERO e/ou ERN, sendo assim a determinação do conteúdo total de tióis é inversamente proporcional ao dano oxidativo a proteínas. (Aksenov e Markesbery, 2001; Halliwell e Gutteridge, 2007). Assim, nossos resultados indicam que o dano oxidativo a proteínas esteja aumentado em plasma de pacientes com Espectro Zellweger. Algumas das conseqüências da oxidação protéica são redução ou inativação da atividade enzimática, dano a receptores, bem como a vias de transdução de sinais e transporte pela membrana celular (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Quanto às defesas antioxidantes não enzimáticas, foi por nós analisado o status antioxidante total no plasma destes indivíduos, o qual não mostrou diferença significativa em comparação aos controles, apesar de estarem 31% diminuídas.

Plasmalógenos compreendem os fosfolipídios que se formam quando um ácido graxo sofre uma ligação éter, em vez de uma ligação éster, no carbono 1 da molécula central de glicerol. Estes compostos estão presentes de forma abundante em alguns tecidos como o cérebro, pois constituem 20% dos lipídeos das membranas dos neurônios. As duas primeiras enzimas envolvidas na biossíntese dos plasmalógenos encontram-se nos peroxissomos. Estes fosfolipídios estão relacionados a diversos processos biológicos que

podem afetar a fluidez de membrana, mediar a transdução de sinal e proteger contra estresse oxidativo (Wanders e Waterham, 2006). Alguns estudos mostram que há uma estreita relação entre os níveis de plasmalógenos detectáveis nas lipoproteínas plasmáticas e as taxas de reações oxidativas, sendo observada uma degradação seletiva dos plasmalógenos, quando expostas as reações oxidativas (Han *et al.*, 2001; Goodenowe *et al.* 2007; Maeba *et al.*, 2007). Ainda, as ERO e inflamação são fatores de riscos para diversas doenças cerebrais, pois as ERO produzidas localmente podem modificar substratos lipídicos, tendo como um dos principais alvos os plasmalógenos (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Por outro lado, foi observado que células de pacientes com ZS e com baixos níveis de plasmalógenos são extremamente sensíveis a radiação ultravioleta, o que evidencia a importância dos peroxissomos na defesa contra espécies reativas de oxigênio (Hoefler *et al.*, 1991; Kremser *et al.*, 1995; Spisni *et al.*, 1998).

Neste particular, Kawada *et al.* (2004) verificaram que catalase a localizada no citoplasma ao invés da matriz peroxissomal cria excessivo estresse oxidativo e disfunção peroxissomal em fibroblastos de pacientes com síndrome de Zellweger e este efeito pode ser revertido pelo uso de vitamina E.

Os resultados de dano lipídico e protéico no plasma dos nossos pacientes com Espectro Zellweger, que provavelmente ocorrem devido aumento de geração de radicais livres e ação oxidativa, permitem supor que as espécies reativas de oxigênio estejam envolvidas na fisiopatologia das doenças do espectro Zellweger. Desta forma, considerando que ocorra o estresse oxidativo nas doenças do Espectro Zellweger, o uso de antioxidantes como tratamento ou terapêutica auxiliar talvez deva ser considerado nestes pacientes, já que o manejo para estas enfermidades é essencialmente sintomático, não havendo ainda um tratamento curativo.



## 5. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

### Capítulo 1:

- ✓ O tratamento com óleo de Lorenzo em pacientes com X-ALD durante 20 meses reduz os níveis plasmáticos de  $C_{26:0}$  em 42% em pacientes com a forma cALD e em 65% em pacientes assintomáticos.
- ✓ A marcante redução à faixa da normalidade dos níveis plasmáticos do  $C_{26:0}$  na forma assintomática demonstra a efetividade da terapia dietética na redução das concentrações teciduais desse ácido graxo potencialmente tóxico.

### Capítulo 2:

- ✓ O parâmetro de lipoperoxidação (TBA-RS) está significativamente aumentado em plasma de pacientes sintomáticos (cALD e AMN) e assintomáticos com X-ALD comparado ao grupo controle.
- ✓ A medida do status antioxidante total está significativamente reduzida em plasma de pacientes com X-ALD sintomáticos (cALD e AMN) comparado ao grupo controle.
- ✓ Na medida do status antioxidante total, não houve diferença significativa entre os grupos assintomáticos com X-ALD e controle.

### Capítulo 3:

- ✓ O parâmetro de lipoperoxidação (TBA-RS) está significativamente aumentado em plasma de mulheres heterozigotas para X-ALD em relação ao grupo controle.
- ✓ A medida da reatividade antioxidante total (TAR) está significativamente reduzida em plasma de mulheres heterozigotas para X-ALD em relação ao grupo controle.
- ✓ A medida do status antioxidante total (TAS) não diferiu significativamente em plasma de mulheres heterozigotas para X-ALD do grupo controle.
- ✓ Não foi observada correlação entre os níveis plasmáticos VLCFA ( $C_{26:0}$ ;  $C_{26:0}/C_{22:0}$ ) e as medidas de TBA-RS e de TAR em plasma de mulheres heterozigotas para X-ALD.

### Capítulo 4:

- ✓ A medida de lipoperoxidação (TBA-RS) está significativamente aumentada em plasma de pacientes do Espectro Zellweger em relação ao grupo controle.
- ✓ Foi observada correlação positiva entre a medida de TBA-RS e os níveis plasmáticos de  $C_{26:0}$  em pacientes com Espectro Zellweger, indicando que este ácido graxo de cadeia muito longa possa provocar dano oxidativo a lipídios nestes pacientes.
- ✓ A medida de conteúdo de tióis totais está significativamente reduzida em plasma de pacientes do Espectro Zellweger em relação ao grupo controle.

- ✓ A medida de reatividade antioxidante total (TAR) em plasma de pacientes do Espectro Zellweger não diferiu significativamente do grupo controle.

### Conclusão geral

O óleo de Lorenzo demonstrou ter altíssima efetividade na redução de C<sub>26:0</sub> plasmático de pacientes assintomáticos com X-ALD, atingindo níveis de normalidade, sendo, desta forma, recomendado no tratamento deste grupo de pacientes.

A lipoperoxidação parece estar presente na X-ALD independentemente do fenótipo e da manifestação dos sintomas, uma vez que aparece induzida no plasma de pacientes assintomáticos (forma assintomática e heterozigotas) e sintomáticos (cALD e AMN), sendo os pacientes AMN aparentemente os mais afetados por este processo. Ainda, pôde-se observar um aumento da lipoperoxidação em pacientes portadores de doenças do Espectro Zellweger, bem como dano a proteína nestes indivíduos. Isto evidenciou que a lipoperoxidação possa de alguma forma estar envolvida com fisiopatologia das doenças peroxissomais estudadas.

Os resultados obtidos mostraram redução das defesas antioxidantes em pacientes cALD, AMN e em heterozigotas para X-ALD. Entretanto, em indivíduos assintomáticos as defesas antioxidantes mostraram-se preservadas, permitindo supor que estes pacientes estejam protegidos contra o estresse oxidativo. Ainda, cabe salientar que não foi verificada correlação entre os parâmetros de estresse oxidativo estudados e os VLCFA acumulados em heterozigotas, o que permite supor que outros fatores que não os ácidos graxos de cadeia muito longa poderiam contribuir para o estresse oxidativo na X-ALD. Já em pacientes com Espectro Zellweger, acredita-se que as altas

concentrações de  $C_{26:0}$  encontradas nos tecidos, maiores do que aquelas detectadas em indivíduos X-ALD, possa estar contribuindo para a ocorrência de lipoperoxidação.

Finalmente, pode-se propor que a administração de antioxidantes deva ser considerada como um adjuvante ou até mesmo uma terapia em potencial para pacientes afetados pelas doenças peroxissomais como X-ALD e Espectro Zellweger.

## 6. PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados neste estudo sobre a avaliação do estresse oxidativo nas doenças peroxissomais: X-ALD e Espectro Zellweger devem ser cautelosamente considerados e confirmados com outras técnicas de determinação de estresse oxidativo. Pretendemos dar continuidade a este trabalho, investigando o efeito das citocinas pró-inflamatórias e do transplante de medula óssea (TMO) sobre vários parâmetros de estresse oxidativo em plasma de pacientes X-ALD com diferentes formas clínicas, bem como o efeito *in vitro* de lovastatina e de alguns antioxidantes (vitaminas C e E, ácido lipóico, N-acetilcisteína) sobre parâmetros de estresse oxidativo em fibroblastos de pacientes com X-ALD e de mulheres heterozigotas para X-ALD. Além disso, pretendemos ver se outros parâmetros de estresse oxidativo podem estar alterados em pacientes com Espectro Zellweger.

Desta forma as perspectivas específicas são:

- ✓ Determinar as concentrações das citocinas pró-inflamatórias em plasma de pacientes X-ALD com diferentes formas clínicas antes e após o TMO, como:
  - Fator de necrose tumoral (TNFalfa).
  - 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 antes e após o TMO através de vários parâmetros, como:
  - Ensaio cometa em leucócitos.
  - Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em plasma.
  - 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.
- ✓ Verificar o efeito *in vitro* da lovastatina sobre parâmetros de estresse oxidativo em 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 fibroblastos de pacientes X-ALD e HTZ para X-ALD.
- ✓ Avaliar outros parâmetros estresse oxidativo em pacientes com Espectro Zellweger, como:
  - Ensaio cometa em leucócitos.
  - Determinação de malondialdeído (MDA) em plasma.
  - Determinação de carbonila em plasma.

- Determinação de glutathione (GSH) em eritrócitos.
- Atividade das enzimas: catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase em eritrócitos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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

ARAKAWA, M.; ITO, Y. (2007). N-acetylcysteine and neurodegenerative diseases: Basic and clinical pharmacology. **Cerebellum.**19:1-7.

ARTUCH, R.; COLOMÉ, C.; SIERRA, C.; BRANDI, N.; LAMBRUSCHINI, N.; CAMPISTOL, J.; UGARTE, D.; VILASECA, M. A. (2004). A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients. **Clin Biochem.** 37(3):198-203.

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.

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

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

BAES, M.; GRESSENS, P.; BAUMGART, E.; CARMELIET, P.; CASTEELS, M.; FRANSEN, M.; EVRARD, P.; FAHIMI, D.; DECLERCQ, P. E.; COLLEN, D.; VAN VELDHOVEN, P. P.; MANNAERTS, G. P. (1997). A mouse model for Zellweger syndrome. **Nat Genet.** 17(1):49-57.

BARSHAK, A.; SITTA, A.; DEON, M.; OLIVEIRA, M. H.; HAESER, A.; DUTRA-FILHO, C. S.; WAJNER, M.; 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.

BARSHAK, A. G.; SITTA, A.; DEON, M.; BARDEN, A. T.; SCHMITT, G. O.; DUTRA-FILHO, C. S.; WAJNER, M.; VARGAS, C. R. (2007). Erythrocyte



glutathione peroxidase activity and plasma selenium concentration are reduced in maple syrup urine disease patients during treatment. **Int J Dev Neurosci.** 25(5):335-338.

BARSCHAK, A.; SITTA, A.; DEON, M.; BARDEN, A. T.; DUTRA-FILHO, C. S.; WAJNER, M.; VARGAS, C. R. (2008). Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. **Metab. Brain Dis.** 23(1):71-80.

BAUMGART, E.; VANHOREBEEK, I.; GRABENBAUER, M.; BORGERS, M.; DECLERCQ, P. E.; FAHIMI, H. D.; BAES, M. (2001). Mitochondrial Alterations Caused by Defective Peroxisomal Biogenesis in a Mouse Model for Zellweger Syndrome (PEX5 Knockout Mouse). **Am. J. Pathol.** 159:1477-1494.

BAUMGARTNER, M. R.; SAUDUBRAY, J. M. (2002). Peroxisomal disorders. **Semin. Neonatol.** 7:85-94.

BEN-MENACHEM, E.; KYLLERMAN, R.; MARKLUND, S. (2000). Superoxide dismutase and glutathione peroxidase function in progressive myoclonus epilepsies. **Epilepsy Research** 40:33-39.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVÁ, Z.; FERENCIK, M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sci.** 65:1865-1874.

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.

BIRD, S.; MILLER, N. J.; COLLINS, J. E.; RICE-EVANS, A. (1995). Plasma antioxidant capacity in two cases of tyrosinaemia type 1: one case treated with NTBC. **J. Inher. Metab. Dis.** 18:123-126.

BRIDI, R., ARALDI, J., SGARBI, M. B., TESTA, C. G., DURIGON, K., WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, C. S. (2003). Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. **Int. J. Dev. Neuroscience** 21:327-332.

BRIDI, R.; LATINI, A.; BRAUM, C. A.; ZORZI, G. K.; WAJNER, M.; LISSI, E.; DUTRA-FILHO, C. S. (2005). Evaluation of the mechanisms involved in leucine-induced oxidative damage in cerebral cortex of young rats. **Free Radic Res.** 39(1):71-79.

BROWN, K. M.; MORRICE, P. C.; DUTHIE, G. G. (1994). Vitamin E supplementation suppresses indexes of lipid peroxidation and platelet counts in blood of smokers and nonsmokers but plasma lipoprotein concentrations remain unchanged. **Am. J. Clin. Nutr.** 60:383-387.

CARTIER, N.; GUIDOUX, S.; ROCCHICCIOLI, F.; AUBOURG, P. (2000). Simvastatin does not normalize very long chain fatty acids in adrenoleukodystrophy mice. **FEBS Lett.** 478(3):205-208.

- CARTIER, N. (2001). Gene therapy strategies for X-linked adrenoleukodystrophy. **Curr. Opin. Mol. Ther.** 4:357-361.
- COLOME, C., VILASECA, M. A.; SIERRA, C. (2000). Congenital errors of metabolism: cause of oxidative stress? **Med. Clin.** 115:111-117.
- CONTRERAS, M.; MOSSER, J.; MEEL, J. L.; AUBOURG, P.; SINGH, I. (1994). The protein coded by the X-linked adrenoleukodystrophy gene is a peroxisomal integral membrane protein. **FEBS Letter.** 344: 211-215.
- DACREMONT, G.; COCQUYT, G.; VINCENT, G. (1995). Measurement of very long chain fatty acids, phytanic and pristanic acid in plasma and cultured fibroblasts by gas chromatography. **J. Inher. Metab. Dis.** 18:76-83.
- DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clin. Chem.** 52(4):601-623.
- DE DUVE, C.; BAUDHUIN, P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles) **Physiol. Rev.** 46:323-357.
- 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 adrenoleukodystrophy. **J Neurol Sci.** 247:157-164.
- 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.** 54:37-42.
- 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.
- DI PROSPERO, N. A.; BAKER, A.; JEFFRIES, N.; FISCHBECK, K. H. (2007). Neurological effects of high-dose idebenone in patients with Friedreich's ataxia: a randomised, placebo-controlled trial. **Lancet Neurol.** 6(10):878-86.
- DRÖGE, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.** 82:47-95.
- DUBOIS-DALCQ, M.; FEIGENBAUM, V.; AUBOURG, P. (1999). The neurobiology of X-linked adrenoleukodystrophy, a demyelinating peroxisomal disorder. **TINS.** 22 (1):4-13.

FATEMI, A.; BARKER, P. B.; ULUG, A. M.; NAGAE-POETSCHER, L. M.; BEAUCHAMP, N. J.; MOSER, A. B.; RAYMOND, G.V.; MOSER, H. W.; NAIDU, S. (2003). MRI and proton MRSI in women heterozygous for X-linked adrenoleukodystrophy. **Neurology**. 60(8):1301-7.

FAUST, P. L.; HATTEN, M. E. (1997). Targeted deletion of the PEX2 peroxisome assembly gene in mice provides a model for Zellweger syndrome, a human neuronal migration disorder. **J Cell Biol**. 139(5):1293-305.

FIGHERA, M. R.; BONINI, J. S.; DE OLIVEIRA, T. G.; FRUSSA-FILHO, R.; ROCHA, J. B.; DUTRA-FILHO, C. S.; RUBIN, M. A.; MELLO, C. F.(2003). GM1 ganglioside attenuates convulsions and thiobarbituric acid reactive substances production induced by the intrastriatal injection of methylmalonic acid. **Int J Biochem Cell Biol**. 35(4):465-73.

FLOYD, R.A.; CARNEY, J. M. (1992). Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. **Ann Neurol**. 32:S22-27.

FONTELLA, F. U.; PULROLNIK, V.; GASSEN, E.; WANNMACHER, C. M. D.; KLEIN, A. B.; WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, C. S. (2000). Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. **Neurochemistry**, 11:541–544.

FORSS-PETTER, S.; WERNER, H.; BERGER, J.; LASSMANN, H.; MOLZER, B.; SCHWAB, M. H.; BERNHEIMER, H.; ZIMMERMANN, F.; NAVE, K. A. (1997). Targeted inactivation of the X-linked adrenoleukodystrophy gene in mice. **J Neurosci Res**. 50(5):829-43.

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.

FOURNIER, B.; SMEITINK, J. A. M. DORLAND, L.; GERGER, R.; SAUDUBRAY, J. M.; POLLTHE, B. T. (1994). Peroxisomal Disorders: A Review. **J. Inher. Metab. Dis**. 17:470-486

GIMENEZ-SANCHEZ, G.; CHILDS, B.; VALLE D. The effect of mendelian disease on human health. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S.; VALLE, D. (Eds.) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, Inc.; 2001.

GIULIVI, C.; PODEROSO, J. J.; BOVERIS, A. (1998). Production of nitric oxide by mitochondria. **J.Biol.Chem**. 273(18):11038-11043.

GOODENOWE, D. B.; COOK, L. L.; LIU, J.; LU, Y.; JAYASINGHE, D. A.; AHIAHONU, P. W.; HEATH, D.; YAMAZAKI, Y.; FLAX, J.; KRENITSKY, K. F.; SPARKS, D. L.; LERNER, A.; FRIEDLAND, R. P.; KUDO, T.; KAMINO, K.; MORIHARA, T.; TAKEDA, M.; WOOD, P. L. (2007). Peripheral ethanolamine

plasmalogen deficiency: a logical causative factor in Alzheimer's disease and dementia. **J Lipid Res.** 48(11):2485-2498.

GOULD, S. J.; RAYMOND, G. V.; VALLE, D. The peroxisome biogenesis disorders. In: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W. S.; VALLE, D. (Eds.) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, Inc.; 2001.

GRAF, M.; ECKER, D.; HOROWSKI, R.; KRAMER, B.; RIEDERER, P.; GERLACH, M.; HAGER, C.; LUDOLPH, A. C.; BECKER, G.; OSTERHAGE, J.; JOST, W. H.; SCHRANK, B.; STEIN, C.; KOSTOPULOS, P.; LUBIK, S.; WEKWERTH, K.; DENGLER, R.; TROEGER, M.; WUERZ, A.; HOGE, A.; SCHRADER, C.; SCHIMKE, N.; KRAMPFL, K.; PETRI, S.; ZIERZ, S.; EGER, K.; NEUDECKER, S.; TRAUPELLER, K.; SIEVERT, M.; NEUNDÖRFER, B.; HECHT, M.; German vitamin E/ALS Study Group. (2005). High dose vitamin E therapy in amyotrophic lateral sclerosis as add-on therapy to riluzole: results of a placebo-controlled double-blind study. **J Neural Transm.** 112(5):649-60.

HALL, J. G.; POWERS, E. K.; MCILVAINE, R. T.; EAN, V. H. (1978). The frequency and financial burden of genetic disease in a pediatric hospital **Am.J. Med. Genet.** 1:417-436.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Meth. Enzymol.** 186:1-63.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. (1996). Oxygen radicals and nervous system. **Trends Neurosci.** 8:22-26.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C (Eds.), *Free radicals in Biology and Medicine*, 3<sup>rd</sup> Edition, Oxford University Press, Oxford, 2007.

HAN, X.; HOLTZMAN, D. M.; MCKEEL JR, D. W. (2001). Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. **J Neurochem.** 77(4):1168-1180.

HEIN, S.; SCHÖNFELD, P.; KAHLERT, S.; REISER, G. (2008). Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy-associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture. **Hum Mol Genet.** 17(12):1750-61.

HOEFLER, G.; PASCHKE, E.; HOEFLER, S.; MOSER, A.B.; MOSER, H.W. (1991). Photosensitized killing of cultured fibroblasts from patients with peroxisomal disorders due to pyrene fatty acid-mediated ultraviolet damage. **J. Clin. Invest.** 88:1873-1879.

KAIKKONEN, J.; PORKKALA-SARATAHO, E.; MORROW, J. D.; ROBERTS, L. J.; NYSSÖNEN, K.; SALONEN, R.; TUOMAINEN, T. P.; RISTONMAA, U.; POULSEN, H. E.; SALONEN, J. T. (2001). Supplementation with vitamin E but not with vitamin C lowers lipid peroxidation in vivo in mildly hypercholesterolemic men. **Free Radical Res.** 35(6):967-978.

KARELSON, E.; BOGDANOVIC, N.; GARLIND, A.; WINBLAD, B.; ZILMER, K.; KULLISAAR, T.; VIHALEM, T.; KAIRANE, C.; ZILMER, M. (2001). The cerebrocortical areas in normal brain aging and in the Alzheimer's Disease: noticeable difference in the lipid peroxidation level and in antioxidant defense. **Neurochem. Res.** 26:353-361.

KAWADA, Y.; KHAN, M.; SHARMA, A. K.; RATNAYAKE, D. B.; DOBASHI, K.; ASAYAMA, K.; MOSER, H. W.; CONTRERAS, M. A.; SINGH, I. (2004). Inhibition of peroxisomal functions due to oxidative imbalance induced by mistargeting of catalase to cytoplasm is restored by vitamin E treatment in skin fibroblasts from Zellweger syndrome-like patients. **Mol. Genet. Metab.** 83:297-305.

KEMP, S.; MOOYER, P. A. W.; BOLHUIS, P. A. (1996). ALDP expression in fibroblasts of patients with X-linked adrenoleukodystrophy. **J. Inherit. Metab. Dis.** 19:667-674.

KOBAYASHI, T.; SHINNOH, N.; KONDO, A.; YAMADA, T. (1997). Adrenoleukodystrophy protein-deficient mice represent abnormality of very long chain fatty acid metabolism. **Biochem Biophys Res Commun.** 232(3):631-6.

KOLKER, S.; AHLEMEYER, B.; KRIEGLSTEIN, J.; HOFFMANN, G. F. (2001). Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neurotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. **Pediatr. Research.** 50(1):76-82.

KORENKE, G. C.; ROTH, C.; KRASEMANN, E.; HÜFRER, M.; HUNNEMAN, D. H.; HANEFELD, F. (1997). Variability of endocrinal dysfunction in 55 patients with X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, laboratory and genetics findings. **Eur. J. Endocrinol.** 137(1):40-47.

KOVACS, W. J.; OLIVIER, L. M.; KRISANS, S. K. (2002). Central role of peroxisomes in isoprenoid biosynthesis. **Progress in Lipid Research.** 41:369-391.

KREMSER, K.; KREMSER-JEZIK, M.; SINGH, I. (1995). Effect of hypoxia-reoxygenation on peroxisomal functions in cultured human skin fibroblasts from control and Zellweger syndrome patients. **Free Radical Res.** 22:39-46.

KRIVIT, W.; SHAPIRO, E.; LOCKMAN, L.; TORRES, F.; STILLMAN, A.; MOSER, A.; MOSER, H. W. Recommendation for treatment of childhood cerebral form of adrenoleukodystrophy. In: HOBBS, J. R.; RICHES, P. G. (Eds.) *Correction of certain genetic diseases by transplantation*. London. CONGENT Trust, pp. 38-39, 1992.

LATINI, A.; ROSA, R. B.; SCUSSIATO, K.; LLESUY, S.; BELLÓ-KLEIN, A.; WAJNER, M. (2002). 3-Hydroxyglutaric acid induces stress and decreases the antioxidant defences in cerebral cortex of young rats. **Brain Res.** 956:367-373.

LATINI, A.; SCUSSIATO, K.; LEIPNITZ, G.; DUTRA-FILHO, C. S.; WAJNER, M. (2005). Promotion of oxidative stress by 3-hydroxyglutaric acid in rat striatum. **J Inherit Metab Dis.** 28(1):57-67.

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.

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.

LU, J. F.; LAWLER, A. M.; WATKINS, P.A.; POWERS, J. M.; MOSER, A. B.; MOSER, H.W.; SMITH, K. D. (1997). A mouse model for X-linked adrenoleukodystrophy. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 94(17):9366-71.

LU, J. F.; BARRON-CASELLA, E.; DEERING, R.; HEINZER, A. K.; MOSER, A. B.; DEMESY BENTLEY, K. L.; WAND, G. S. C.; MCGUINNESS, M.; PEI, Z.; WATKINS, P.A.; PUJOL, A.; SMITH, K. D.; POWERS, J. M. (2007). The role of peroxisomal ABC transporters in the mouse adrenal gland: the loss of *Abcd2* (ALDR), Not *Abcd1* (ALD), causes oxidative damage. **Lab Invest.** 87(3):261-72.

MAEBA, R.; MAEDA, T.; KINOSHITA, M.; TAKAO, K.; TAKENAKA, H.; KUSANO, J.; YOSHIMURA, N.; TAKEOKA, Y.; YASUDA, D.; OKAZAKI, T.; TERAMOTO, T. (2007). Plasmalogens in human serum positively correlate with high-density lipoprotein and decrease with aging. **J Atheroscler Thromb.** 14(1):12-18.

MAHADIK, S. P.; EVANS, D.; LAL, H. (2001). Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 25(3):463-493.

MAHMOOD, M.; DUBEY, P.; MOSER, H. W.; MOSER, A. (2005). X-linked adrenoleukodystrophy: Therapeutic approaches to distinct phenotypes. **Pediatric Transplantation.** 9(7):55-62.

MARTÍNEZ, M.; PINEDA, M.; VIDAL, R.; CONILL, J.; MARTIN, B. (1993). Docosahexaenoic acid – A new therapeutic approach to peroxisomal-disorder patients: Experience with two cases. **Neurology.** 43:1389–1397.

MARTÍNEZ, M.; VÁZQUEZ, E.; GARCÍA-SILVA, M. T.; MANZANARES, J.; BERTRAN, J. M.; CASTELLÓ, F.; MOUGAN, I. (2000). Therapeutic effects of docosahexaenoic acid ethyl ester in patients with generalized peroxisomal disorders. **Am. J. Clin. Nutr.** 71(1 Suppl):376S-385S.

MATÉS, J. M.; PEREZ-GÓMEZ, C.; NÚÑEZ DE CASTRO, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin Biochem.** 32(8):595-603.

MATÉS, J. M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F.M. (2000). Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. **Int J Biochem Cell Biol.** 32(2):157-70.

MCGUINNESS, M. C.; POWERS, J. M.; BIAS, W. B.; SCHMECKPEPER, B. J.; SEGAL, A. H., GOWDA, V. C.; WESSELINGH, S. L.; BERGER, J.; GRIFFIN, D. E.;

SMITH, K. D. (1997). Human leukocyte antigens and cytokine expression in cerebral inflammatory demyelinating lesions of X-linked adrenoleukodystrophy and multiple sclerosis. **J. Neuroimmunol.** 75(1-2):174-82.

MÉNDEZ-ÁLVAREZ, E.; SOTO-OTERO, R.; HERMIDA-AEIJEIRAS, A.; LÓPEZ-REAL, A. M.; LABANDEIRA-GARCÍA, J. L. (2001). Effects of aluminium and zinc on the oxidative stress caused by 6-hydroxydopamine autoxidation: relevance for the pathogenesis of Parkinson's disease. **Biochim. Biophys. Acta.** 1586:155-168.

MIGEON, B. R.; MOSER, A. B.; AXELMAN, J.; SILLENCE, D.; NORUM, R. A. (1981). Adrenoleukodystrophy evidence for X linkage, inactivation and selection favoring the mutant allele in heterozygous cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 78: 5066-5070.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clin. Sci.** 84:407-412.

MOSER, H. W.; MOSER, A. B. Measurement of saturated very long chain fatty acid in plasma. In: Hommes, F. A., (Ed.) *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics*. New York: Wiley. pp. 177-191, 1991.

MOSER, H. W.; MOSER, A. B.; SMITH, K. D.; BERGIN, A.; BOREL, J.; SHANKROFF, J.; STINE, O. C.; MERETTE, C.; OTT, J.; KRIVIT, W.; SHAPIRO, E. (1992). Adrenoleukodystrophy: phenotypic variability and implications for therapy. **J. Inherit. Metab. Dis.** 15:645-664.

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

MOSER, H. W.; SMITH, K. D.; WATKINS, P. A.; POWERS, J.; MOSER, A. B. X-linked adrenoleukodystrophy. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S.; VALLE, D. (Eds.) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, Inc.; 2001.

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(7):1073-1080.

MOSER, H. W.; MAHMOOD, A.; RAYMOND, G. V. (2007). X-linked adrenoleukodystrophy. **Nat Clin Pract Neurol.** 3(3):140-151.

MOSSER, J.; DOUAR, A. M.; SARDE, C. O.; KIOSCHIS, P.; FEIL, R.; MOSER, H. W.; POUTSKA, A. M.; MANDEL, J. M.; AUBORG, P. (1993). Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. **Nature.** 361:726-730.

OLIVIER, L. M.; KRISANS, S. K. (2000). Peroxisomal protein targeting and identification of peroxisomal targeting signals in cholesterol biosynthetic enzymes.

**Biochim Biophys Acta.** 1529:89-102.

PAI, G. S.; KHAN, M.; BARBOSA, E.; KEY, L. L.; CRAVER, J. R.; CURE, J. K.; BETROS, R.; SINGH, I. (2000). Lovastatin Therapy for X-Linked Adrenoleukodystrophy: Clinical and Biochemical Observations on 12 Patients. **Mol Genetic Metab.** 69(4):312-322.

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(6):630-43.

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.

PRYOR, W. A.; JIN, X.; SQUADRITO, G. L. (1994). One- and two-electron oxidations of methionine by peroxynitrite. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 91:11173-11177.

PRZEDBORSKI, S.; DONALDSON, D. B. S.; JAKOWEC, M.; KISH, S. J.; GUTTMAN, M.; ROSOKLIJA, G.; HAYS, A. P. (1996). Brain Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase Activities in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Annals of Neurology.** 39:158-165.

RAINE, D.N. (1974). Inherited metabolic disease. **Lancet.** 2(7887):996-998.

RESTUCCIA, D.; LAZZARO, V.; VALERIANI, M.; OLIVIERO, A.; PERA, D.; BARBA, C.; CPPA, M.; BERTINI, E.; CAPUA, M.; TONALI, P. (1999). Neurophysiologic follow-up of long-term dietary treatment in adult-onset adrenoleukodystrophy. **Neurology.** 52:810-815.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Free Radicals and Antioxidants in Muscular and Neurological Diseases and Disorders. In: POLI, G.; ALBANO, E.; DIANZANI, M. U. (eds) *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*, Birkhäuser Verlag Basel/ Switzerland, 1993. pp 425-437.

RIZZO, W. B.; LESHNER, R. Y.; ODONE, A.; DAMMANN, A. L.; CRAFT, D. A.; JENSEN, M. E.; JENNINGS, S. S.; DAVIS, S.; JAITLY, R.; SGRO, J. A. (1989). Dietary erucic acid therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. **Neurology.** 39(11): 14150-1422.



RHODIN, J. Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed tubule cells of the mouse kidney. Doctoral Thesis, Karolinska Institutet, Stockholm, Atkitbolaget, Godvil, 1954.

SAEED, S. A.; URFY, M. Z. S.; ALY, T. M.; KHIMANI, F. W.; GILANI, A. (2005). Antioxidant: Their role in health and disease. **Intl. J. Pharmacol.** 1(3):226-233.

SAUDUBRAY, J. M.; CHARPENTIER, C. Clinical phenotypes: diagnosis/algorithms. In: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S.; VALLE, D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, Inc.; 2001.

SCHMIDT, S.; TRÄBER, F.; BLOCK, W.; KELLER, E.; POHL, C.; VON OERTZEN, J.; SCHILD, H.; SCHLEGEL, U.; KLOCKGETHER, T. (2001). Phenotype assignment in symptomatic female carriers of X-linked adrenoleukodystrophy. **J Neurol.** 248(1):36-44.

SCHRADER, M.; FAHIMI, H. D. (2006). Peroxisome and oxidative stress. **Biochim. Biophys. Acta.** 1763:1755-1766.

SCHULZ, J. B.; DEHMER, T.; SCHÖLS, L.; MENDE, H.; HARDT, C.; VORGERD, M.; BÜRK, K.; MATSON, W.; DICHGANS, J.; BEAL, M. F.; BOGDANOV, M. B. (2000). Oxidative stress in patients with Friedreich ataxia. **Neurology.** 55(11):1719-21.

SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S.; VALLE, D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, Inc.; 2001.

SENECA, S.; LISSENS, W. (1995). DNA diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy. **J. Inherit. Metab. Dis.** 18:34-44.

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.

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.

SINGH, I. (1997) Biochemistry of peroxisomes in health and disease. **Mol. Cell. Biochem.** 167:1-29.

SINGH, I.; KHAN, M.; KEY, L.; PAI, S. (1998a). Lovastatin for X-linked adrenoleukodystrophy. **N. Eng. J. Med.** 339(10):702-703.

SINGH, I.; PAHAD, K.; KHAN, M. (1998b). Lovastatin and sodium phenylacetate normalize the levels of very long chain fatty acids in skin fibroblasts of X-adrenoleukodystrophy. **FEBS Letters.** 426:342-346.

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.

SOUTHORN, P.A.; POWIS, G. (1988). Free radicals in medicine I. Chemical nature and biological reactions. **Mayo Clin. Proc.** 63:381-389.

SPISNI, E.; CAVAZZONI, M.; GRIFFONI, C.; CALZOLARI, E.; TOMASI, V. (1998). Evidence that photodynamic stress kills Zellweger fibroblasts by a nonapoptotic mechanism. **Biochim. Biophys. Acta.** 1402:61-69.

STEFANELLO, F. M.; FRANZON, R.; TAGLIARI, B.; WANNMACHER, C.; WAJNER, M.; WYSE, A. T. (2005). Reduction of butyrylcholinesterase activity in rat serum subjected to hyperhomocysteinemia. **Metab Brain Dis.** 20(2):97-103.

STEINBERG, S. J.; DODT, G.; RAYMOND, G. V.; BRAVERMAN, N. E.; MOSER, A. B.; MOSER, H. W. (2006). Peroxisome biogenesis disorders. **Biochim. Biophys. Acta** 1763:1733-1748.

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.

STRECK, E. L.; VIEIRA, P. S.; WANNMACHER, C. M.; DUTRA-FILHO, C. S.; WAJNER, M.; WYSE, A. T. (2003). In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. **Metab Brain Dis.** 18(2):147-54.

STUMPF, D. A.; HAYWARD, A.; HAAS, R. SCHAUMBURG, H. H. (1981). Adrenoleukodystrophy. Failure of immunosuppression to prevent neurological progression. **Arch. Neurol.** 38(1):48-49.

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.

TOLAR, J.; ORCHAD, 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.

TRAVACIO, M.; LLEUSUY, S. (1996). Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress conditions. **Free Radical Research in Latin America** 48(1/2):9-13.

TSIKAS, D.; SCHWEDHELM, E.; FAULER, J.; GUTZKI, F. M.; MAYATEPEK, E.; FRÖLICH, J. C. (1998). Specific and rapid quantification of 8-iso-prostaglandin F2alpha in urine of healthy humans and patients with Zellweger syndrome by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.** 716(1-2):7-17.

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, M. A.; GILG, A. G.; SINGH, I. (2008). Oxidative imbalance in nonstimulated X-adrenoleukodystrophy-derived lymphoblasts. **Dev. Neurosci.** 30:410-418.

VAN DUYN, M. A.; MOSER, A. B.; BROWN III, F. R.; SACKTOR, N.; LIU, A.; MOSER, H. W. (1984). The design of a diet restricted in saturated very long chain fatty acids: therapeutic application in adrenoleukodystrophy. **Am. J. Clin. Nutr.** 40:227-284.

VAN GEEL, B. M.; ASSIES, J.; WANDERS, R. J.; BARTH, P. G. (1997). X-linked adrenoleukodystrophy: clinical presentation, diagnosis, and therapy. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry** 63(1):4-14.

VARGAS, C. R.; WAJNER, M.; SIRTORI, L. R.; GOULART, L.; CHIOCHETTA, M.; COELHO, D.; LATINI, A.; LLESUY, S.; BELLÓ-KLEIN, A.; GIUGLIANI, R.; DEON, M.; MELLO, C. F. (2004). Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. **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. Inher. Metab. Dis.** 27:427-448.

WANDERS, R. J. A.; ROERMUND, C. W. T.; SCHUTGENS, R. B. H.; BARTH, P. G.; HEYMANS, H. S. A.; VAN DEN BOSCH, H.; TAGER, J. M. (1990). The inborn errors of peroxisomal  $\beta$ oxidation. **J. Inher. Metab. Dis.** 13:04-36.

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.; VAN GRUNSVEN, E. G.; JASSEN, G. A. (2000). Lipid metabolism in peroxisomes: enzymology, functions and dysfunctions of the fatty acid  $\alpha$  and  $\beta$ oxidation system in humans. **Biochemical Society Transactions** 28(2):141-148.

WANDERS, R. J. A.; VREKEN, P.; FERDINANDUSSE, S.; JASSEN, G. A.; WATERHAM, R.; VAN ROERMUND, C. W. T.; VAN GRUNSVEN, E. G. (2001). Peroxisomal fatty acid  $\alpha$  and  $\beta$ oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. **Biochemical Society Transactions** 29(2):250-267.

WANDERS, R. J. A.; WATERHAN, H. R. (2004). Peroxisomal disorders I: biochemistry and genetics of peroxisome biogenesis disorders. **Clin. Genet.** 67:107-133.

WANDERS, R. J. A.; WATERHAN, H. R. (2006). Peroxisomal disorders: The single peroxisomal enzyme deficiencies. **Biochim. Biophys. Acta** 1763:1707-1720.

WANG, X.; QUINN, P. J. (1999). Vitamin E and its function in membranes. **Progress in Lipid Research.** 38:309-336.

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

YAMADA, T.; SHINNOH, N.; TANIWAKI, T.; OHYAGI, Y.; ASAHARA, H.; HORIUCHI, K.; KIRA, J. (2000). Lovastatin does not correct the accumulation of very long-chain fatty acids in tissues of adrenoleukodystrophy protein-deficient mice. **J Inherit Metab Dis.** 23(6):607-614.

YANAGISAWA, N.; SHIMADA, K.; MIYAZAKI, T.; KUME, A.; KITAMURA, Y.; SUMIYOSHI, K.; KIYANAGI, 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 in health and disease.** 7:48.

ZINKHAM, W. H.; KICKLER, T.; BOREL, J.; MOSER, H. W. (1993). Lorenzo's oil and thrombocytopenia in patients with adrenoleukodystrophy. **N. Engl. J. Med.** 328(15):1126-1127.

## **Anexo 1**

### ***Lista de Tabelas***

Tabela 1 Fenótipos clínicos em X-ALD.....	16
Tabela 2 Valores referenciais de VLCFA para o plasma em $\mu\text{mol/L}$ .....	19