

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

**DISTÚRBIOS DO METABOLISMO DE ÁCIDOS  
GRAXOS DE CADEIA MUITO LONGA EM  
PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA  
ADRENAL E TETRAPARESIA**

**Carmen Regla Vargas**

Orientador: Prof. Roberto Giugliani

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica para a obtenção do título de Doutor.

Porto Alegre

Abril / 2000

À minha mãe, ao Fer, à Paula e ao Zé, pelo eterno amor,  
base de tudo, pelo estímulo e carinho.

À Laura e a Nathália, razão do meu viver, pela pureza e  
alegria de seus corações.

Ao Iran, pelo amor e força de uma união que transcende  
o bem e o mal.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Roberto Giugliani, pesquisador ativo e incansável, pela clareza de suas idéias, pela orientação criteriosa, pela confiança no trabalho desenvolvido no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e pela oportunidade da realização desta pesquisa.

Ao Prof. Moacir Wajner, médico, pesquisador, profissional obsessivamente dedicado a todas as atividades que desempenha, pela amizade, apoio, sensibilidade para entender o que parece obscuro, pelos ensinamentos e por acreditar em mim e apostar no meu trabalho.

Ao grupo de trabalho do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo e do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial à Dra. Carolina de Souza pela entusiástica colaboração e discussão dos casos clínicos.

Ao grupo de trabalho do Laboratório de Análise de Metabólitos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, à Vivian, à Ana Paula, à Patrícia, à Andrea e a todos os bolsistas que trabalharam arduamente nas análises de VLCFA, além das outras metodologias realizadas neste laboratório, permitindo que esta pós-graduanda tivesse disponibilidade de tempo para realizar este trabalho.

À bioquímica Daniella de Moura Coelho, amiga e competente profissional, pelo ombro amigo e pela substituição nos momentos de ausência.

À farmacêutica Alethea Gatto Barschak pela exímia colaboração na confecção do banco de dados, gráficos, figuras, discussões técnicas de problemas das metodologias laboratoriais e pelas palavras de apoio nas horas de desespero.

Ao Prof. Ruud Schutgens, chefe do Laboratório de Doenças Metabólicas do Departamento de Pediatria, University Hospital Amsterdam, pela oportunidade na realização do treinamento na dosagem de ácidos graxos de cadeia muito longa no seu laboratório e pela acolhedora atenção.

À minha família por ter tolerado todos os momentos de ausência e cansaço para que esta tese fosse realizada.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	04
LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	06
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1. ERROS INATOS DO METABOLISMO.....	15
1.2. PEROXISSOMAS.....	16
1.3. DOENÇAS PEROXISSOMAIS.....	19
1.4. ADRENOLEUCODISTROFIA.....	20
1.5. ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AO X.....	23
1.5.1. APRESENTAÇÃO CLÍNICA.....	23
1.5.2. DIAGNÓSTICO.....	28
1.5.3 . DETECÇÃO DE PORTADORES E ACONSELHAMENTO GENÉTICO....	32
1.5.4. DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL.....	32
1.5.5. TRATAMENTO.....	33
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>46</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>48</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
4.1. AMOSTRA ESTUDADA.....	49

4.2. TRATAMENTO EMPREGADO.....	50
4.3. METODOS EMPREGADOS.....	50
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
4.5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	52
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>102</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>116</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>120</b>
<b>9. TERMO DE CONSENTIMENTO.....</b>	<b>136</b>
<b>10. PUBLICAÇÕES.....</b>	<b>138</b>
10.1. X-linked Adrenoleukodystrophy: Clinical and Laboratorial Findings in 15 Brazilian Patients.....	138
10.2. Clinical and Biochemical Findings in 7 Patients With X-linked Adrenoleukodystrophy treated with Lorenzo's Oil.....	138

**ABREVIATURAS:**

$\mu\text{mol/L}$	- micromol por litro
3-OH-HMG-CoA	- 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A
aALD	- adrenoleucodistrofia – forma cerebral adulta
AAINE	- anti-inflamatório não esteróide
ACTH	- hormônio adrenocorticotrófico
AI	- insuficiência adrenal
ALD	- adrenoleucodistrofia
ALDRP	- proteína relacionada à adrenoleucodistrofia
AMN	- adrenomieloneuropatia
C16:0	- ácido palmítico
C18:0	- ácido esteárico
C22:0	- ácido docosanóico ou behênico
C22:1	- ácido erúcido
C24:0	- ácido tetracosanóico ou lignocérico
C24:1	- ácido nervóico
C26:0	- ácido hexacosanóico ou cerótico
C27:0	- ácido tetracosanóico
cALD	- adrenoleucodistrofia – forma cerebral infantil
cAMP	- adenosina monofosfato cíclico
CCD	- cromatografia em camada delgada
CO <sub>2</sub>	- monóxido de carbono

CoA	- coenzima A
CRH	- hormônio liberador de corticotrofina
DNA	- ácido desoxirribonucléico
EIM	- erro inato do metabolismo
FISH	- <i>fluorescence "in situ" hybridization</i>
GTE	- gliceroltrierucato
GTO	- gliceroltrioleato
H <sub>2</sub> O	- água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- peróxido de hidrogênio
PKA	- proteína quinase A
RNA <sub>m</sub>	- ácido ribonucleico mensageiro
RNM	- ressonância nuclear magnética
SNC	- sistema nervoso central
TC	- tomografia computadorizada
TMO	- transplante de medula óssea
Tnf-alfa	- fator de necrose tumoral alfa
VLCFA	- ácidos graxos de cadeia muito longa
X-ALD	- adrenoleucodistrofia ligada ao X



**LISTA DE TABELAS E FIGURAS**

página

**TABELAS**

Tabela 1 – Valores referenciais de VLCFA para o plasma em $\mu\text{mol/L}$ .....	30
Tabela 2 – Frequência de casos de ALD e adrenomieloneuropatia em pacientes com insuficiência adrenal e tetraparesia/paraparesia.....	53
Tabela 3 – Resultados da investigação dos familiares de 13 pacientes X-ALD.....	54
Tabela 4 – Idade do aparecimento dos sintomas, do diagnóstico e do início da terapia dos 17 pacientes com X-ALD.....	55
Tabela 5 – Frequência de sinais e sintomas observada nos 17 pacientes com X-ALD.....	57
Tabela 6 – Doses de Óleo de Lorenzo utilizada nos pacientes X-ALD sob tratamento dietético e tempo de uso da terapia.....	59
Tabela 7 – Concentração média do ácido hexacosanóico ( $\text{C}_{26:0}$ ) no plasma durante o período de terapia .....	60
Tabela 8 – Evolução clínica dos pacientes X-ALD sob tratamento com Óleo de Lorenzo.....	61
Tabela 9 – Curso clínico dos pacientes portadores de X-ALD tratados com Óleo de Lorenzo.....	62
Tabela 10 – Frequência dos fenótipos de X-ALD em diversos estudos.....	105

**FIGURAS**

Figura 1 - Ativação e subsequente $\beta$ -oxidação peroxissomal dos ácidos graxos de cadeia muito longa.....	35
Figura 2 - Elongamento das gorduras saturadas e monoinsaturadas.....	36
Figura 3 - Heredograma da família 1.....	64
Figura 4 - Heredograma da família 2.....	65

Figura 5 - Heredograma da família 3.....	66
Figura 6 - Heredograma da família 4.....	67
Figura 7 - Heredograma da família 5.....	68
Figura 8 - Heredograma da família 6.....	69
Figura 9 - Heredograma da família 7.....	70
Figura 10 - Heredograma da família 8.....	71
Figura 11 - Heredograma da família 9.....	72
Figura 12 - Heredograma da família 10.....	73
Figura 13 - Heredograma da família 11.....	74
Figura 14 - Heredograma da família 12.....	75
Figura 15 - Heredograma da família 13.....	76
Figura 16 a - Níveis plasmáticos do ácido docosanoico (C <sub>22:0</sub> ) em diferentes momentos da terapia dietética de pacientes com X-ALD.....	77
Figura 16 b - Níveis plasmáticos do ácido tetracosanoico (C <sub>24:0</sub> ) em diferentes momentos da terapia dietética de pacientes com X-ALD.....	78
Figura 16 c - Níveis plasmáticos do ácido hexacosanoico (C <sub>26:0</sub> ) em diferentes momentos da terapia dietética de pacientes com X-ALD.....	79
Figura 16 d - Níveis plasmáticos da razão C <sub>24:0</sub> /C <sub>22:0</sub> em diferentes momentos da terapia dietética de pacientes com X-ALD.....	80
Figura 16 e - Níveis plasmáticos da razão C <sub>26:0</sub> /C <sub>22:0</sub> em diferentes momentos da terapia dietética de pacientes com X-ALD.....	81
Figura 17 a - Níveis plasmáticos do ácido docosanoico (C <sub>22:0</sub> ) em pacientes com X-ALD.....	82
Figura 17 b - Níveis plasmáticos do ácido tetracosanoico (C <sub>24:0</sub> ) em pacientes com X-ALD.....	83
Figura 17 c - Níveis plasmáticos do ácido hexacosanoico (C <sub>26:0</sub> ) em pacientes com	

X-ALD.....	84
Figura 17 d - Níveis plasmáticos da razão $C_{24:0}/C_{22:0}$ em pacientes com X-ALD.....	85
Figura 17 e - Níveis plasmáticos da razão $C_{26:0}/C_{22:0}$ em pacientes com X-ALD.....	86
Figura 18 a - Níveis plasmáticos do ácido docosanóico ( $C_{22:0}$ ) em pacientes com insuficiência adrenal ou tetraparesia/paraparesia sem diagnóstico de X-ALD.....	87
Figura 18 b - Níveis plasmáticos do ácido docosanóico ( $C_{24:0}$ ) em pacientes com insuficiência adrenal ou tetraparesia/paraparesia sem diagnóstico de X-ALD.....	88
Figura 18 c - Níveis plasmáticos do ácido hexacosanóico ( $C_{26:0}$ ) em pacientes com insuficiência adrenal ou tetraparesia/paraparesia sem diagnóstico de X-ALD.....	89
Figura 18 d - Níveis plasmáticos da razão $C_{24:0}/C_{22:0}$ em pacientes com insuficiência adrenal ou tetraparesia/paraparesia sem diagnóstico de X-ALD.....	90
Figura 18 e - Níveis plasmáticos da razão $C_{26:0}/C_{22:0}$ em pacientes com insuficiência adrenal ou tetraparesia/paraparesia sem diagnóstico de X-ALD.....	91
Figura 19 a - Níveis plasmáticos de $C_{22:0}$ em mulheres heterozigotas para X-ALD.....	92
Figura 19 b - Níveis plasmáticos de $C_{24:0}$ em mulheres heterozigotas para X-ALD.....	93
Figura 19 c - Níveis plasmáticos de $C_{26:0}$ em mulheres heterozigotas para X-ALD.....	94
Figura 19 d - Níveis plasmáticos da razão $C_{24:0}/C_{22:0}$ em mulheres heterozigotas para X-ALD.....	95
Figura 19 e - Níveis plasmáticos da razão $C_{26:0}/C_{22:0}$ em mulheres heterozigotas para X-ALD.....	96

Figura 20 a - Níveis plasmáticos de $C_{22:0}$ em familiares não afetados por X-ALD.....	97
Figura 20 b - Níveis plasmáticos de $C_{24:0}$ em familiares não afetados por X-ALD.....	98
Figura 20 c - Níveis plasmáticos de $C_{26:0}$ em familiares não afetados por X-ALD.....	99
Figura 20 d - Níveis plasmáticos da razão $C_{24:0}/C_{22:0}$ em familiares não afetados por X-ALD.....	100
Figura 20 e - Níveis plasmáticos da razão $C_{26:0}/C_{22:0}$ em familiares não afetados por X-ALD.....	101

## **RESUMO:**

A adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (X-ALD) é um distúrbio hereditário do metabolismo peroxissomal, bioquimicamente caracterizado pelo acúmulo dos ácidos graxos de cadeia muito longa ("very long chain fatty acids" - VLCFA) em diferentes tecidos. O acúmulo destes ácidos graxos está associado com desmielinização cerebral, anormalidades em nervos periféricos e insuficiência adrenocortical e testicular. A incidência desta condição é estimada em 1 para 25.000 homens. Pelo menos seis fenótipos podem ser distinguidos, sendo adrenoleucodistrofia cerebral infantil (cALD) e adrenomieloneuropatia (AMN) os mais freqüentes. O gene X-ALD foi identificado e diversas mutações identificadas, mas a relação genótipo-fenótipo não parece clara. O diagnóstico é relativamente fácil e o diagnóstico pré natal é possível em famílias afetadas. Embora não exista ainda um tratamento específico para a doença, várias opções terapêuticas são utilizadas nestes casos.

Neste trabalho foram analisados 21 indivíduos com insuficiência adrenal e 26 indivíduos com tetraparesia ou paraparesia com suspeita de X-ALD, todos do sexo masculino. Dezesete casos de X-ALD (13 ALD e 4 AMN) foram diagnosticados, dos quais 7 aderiram a protocolos de tratamento. Treze famílias (incluindo 88 familiares) foram investigadas, tendo sido encontrados 5 casos adicionais de X-ALD (1 ALD e 4 AMN) ainda assintomáticos e 35 mulheres heterozigotas. Cinquenta e sete por cento dos pacientes encaminhados por insuficiência adrenal e 19% dos pacientes referidos por tetraparesia/paraparesia foram identificados como afetados por X-ALD. Leucodistrofia foi o sintoma mais freqüente, ocorrendo em 80% dos casos.

Deficiências na visão, na fala, na escrita e no aprendizado, convulsões, e distúrbios de comportamento foram sinais também freqüentes. A idade média de diagnóstico foi de 10 anos para ALD e de 29 anos para AMN, sendo o intervalo entre os primeiros sintomas e o diagnóstico de 2,4 anos para ALD e de 7 anos para AMN. O grande intervalo observado entre o aparecimento dos sintomas e o diagnóstico parece indicar que os neurologistas e outros especialistas parecem não estar familiarizados com as muitas facetas da X-ALD, mas podem também refletir as dificuldades enfrentadas para o diagnóstico laboratorial da doença em nosso meio.

Nossas principais conclusões foram: a) a X-ALD é bastante freqüente em homens com insuficiência adrenal (57%) e com tetraparesia/paraparesia (19%), e que estes sinais são importantes para levantar a suspeita diagnóstica; b) a freqüência de mulheres heterozigotas detectada foi alta, assim como foi significativa a ocorrência de portadores assintomáticos, o que justifica a investigação familiar de X-ALD para a prevenção e tratamento precoce da doença; c) diferentes formas clínicas foram encontradas em diferentes membros das famílias estudadas, o que confirma a heterogeneidade fenotípica da doença; d) leucodistrofia foi o sintoma mais freqüente, sendo, portanto, o mais importante para a suspeita diagnóstica; e) os médicos devem estar mais atentos às diferentes facetas da X-ALD, o que permitirá diagnósticos mais precoces; f) não parece haver uma clara correlação entre efeitos bioquímicos e clínicos na X-ALD, sendo que o tratamento com dieta e óleo de Lorenzo produz um efeito bioquímico relativamente adequado com resposta clínica pobre, não revertendo a sintomatologia pré-existente; g) novas terapias mais eficazes são necessárias para que se possa obter um melhor prognóstico para os pacientes com X-ALD, sendo para

tanto fundamental o desenvolvimento de centros de referência como o estabelecido ao longo deste trabalho.

**ABSTRACT:**

The X-linked adrenoleucodistrophy (X-ALD) is a hereditary disorder of the peroxisomal metabolism, biochemically characterized by the accumulation of very long chain fatty acids (VLCFA) in distinct tissues. The accumulation of these fatty acids is associated with cerebral demyelination, peripheral nerve abnormalities and adrenocortical and testicular failure. The incidence of this condition is estimated in 1 to 25.000 men. At least six different phenotypes can be distinguished. The two most frequent are cerebral infantile adrenoleucodistrophy (cALD) and adrenomyeloneuropathy (AMN). The X-ALD gene and several mutations were identified, but the genotype-phenotype relation seems yet unclear. The diagnosis is generally easy and prenatal diagnosis is possible in affected families. Although a specific treatment for this disease is not yet available, several therapeutic options can be used in these cases.

In this study, 21 patients with adrenal insufficiency and 26 patients with tetraparesis or paraparesis with suspected X-ALD, all males, were analyzed. Seventeen cases of X-ALD (13 ALD and 4 AMN) were confirmed, of which seven joined the treatment protocols. Thirteen families (including 88 people) were investigated. Five additional cases of X-ALD (1 ALD and 4 AMN), still asymptomatic, as well as 35 heterozygote women, were found. Fifty seven percent of the patients referred for adrenal insufficiency and 19% of those with tetraparesis/paraparesis were identified as affected for X-ALD. Leucodistrophy, which occurred in 80% of cases, was the most frequent symptom. Visual, speaking, spelling and learning



deficiencies, seizures and behavior disorders were also frequent signs. The average age at diagnosis was of 10 years old for ALD and of 29 years old for AMN. The interval between the first symptoms and the diagnosis was of 2,4 years for ALD and of 7 years for AMN. This large gap between the appearance of symptoms and the diagnosis seems to indicate that neurologists and other specialists may not be aware with the multiple aspects of X-ALD, but can also reflect the many difficulties related to the laboratorial diagnosis of this disease in our conditions.

Our main conclusions were: a) X-ALD is very frequent in men with adrenal insufficiency (57%) and with teraparesy/paraparesy (19%), and that these signs are important to raise the diagnostic suspicion; b) the frequency of heterozygote women detected was high, as well the significant occurrence of asymptomatic carriers, which justifies a familial investigation of X-ALD aiming prevention and early treatment of the disease; c) different clinic forms were found in different members of the investigated families, which confirms the phenotypic heterogeneity of the disease; d) leucodystrophy was the most frequent signal, being therefore the most important for the diagnostic suspicion; e) doctors should be more alert to the different aspects of X-ALD, allowing an earlier diagnosis; f) there does not seem to be a clear correlation between clinical and biochemical effects in X-ALD; the treatment with diet and Lorenzo's oil, which has a reasonable biochemical effect, is not clinically effective, and results in no improvement of pre-existing symptoms; g) more effective therapies are needed to achieve a better prognosis in X-ALD patients, being an essential step to the development of reference centers as the one established during this study.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Erros Inatos do Metabolismo**

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são defeitos bioquímicos hereditários, quase sempre devidos à deficiência de uma atividade enzimática. A ausência ou marcada deficiência na atividade enzimática leva a um bloqueio metabólico com repercussão variável no indivíduo, sendo geralmente grave e muitas vezes letal. Os EIM já foram descritos em todas as áreas do metabolismo (aminoácidos, ácidos orgânicos, lipídios, carboidratos, etc.) e sua identificação tem freqüentemente contribuído para o melhor conhecimento do metabolismo humano normal (SCRIVER *et al*, 1995).

Estas doenças são relativamente raras quando analisadas como entidades isoladas na população em geral, mas sua freqüência aumenta consideravelmente quando investigadas como grupo em amostras pré-selecionadas (RAINE, 1974; HALL *et al*, 1978). A detecção desses distúrbios pode ser, portanto, mais compensadora quando são estudados pacientes de alto risco, definidos a partir de critérios clínicos, genéticos, étnicos ou geográficos (WATTS, 1978).

A variabilidade no quadro clínico apresentado por esses pacientes permite supor uma ampla heterogeneidade genética, a qual vem sendo paulatinamente confirmada pelos progressos na análise das mutações associadas a estas doenças. Programas de detecção de EIM em pacientes de alto risco, hoje rotina nos países desenvolvidos, geralmente utilizam técnicas que permitem a detecção de distúrbios do metabolismo dos aminoácidos, dos carboidratos, das glicoproteínas, dos

esfingolípídios, dos glicosaminoglicanos e dos ácidos orgânicos, incluindo os relacionados com a  $\beta$ -oxidação peroxissomal (GOLPERTZ, 1974; WARRS *et al*, 1975, CHALMERS, 1974).

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

## **1.2 Peroxissomas**

O peroxissoma é uma organela envolvida por uma membrana, sem estrutura interna e sem DNA, encontrada em todas as células eucarióticas (com exceção dos eritrócitos maduros) e presente em todos os tecidos, especialmente no fígado e nos rins (LAZAROW *et al*, 1995; MOSER *et al*, 1995a). Tanto a matriz peroxissomal quanto as proteínas da membrana são sintetizadas nos polissomas livres no citosol e levadas pós-tradução para dentro de um peroxissoma pré-existente, o qual cresce e se divide. Defeitos no mecanismo de transporte das proteínas da matriz são relevantes quando se considera as várias desordens peroxissomais (SANTOS *et al*, 1988; BALFE *et al*, 1990; WALTON *et al*, 1992).

A importância dos peroxissomas no metabolismo celular é enfatizada pela existência de um grupo de doenças hereditárias causadas por um dano em uma ou mais funções peroxissomais (TEN BRINK, *et al*, 1993; WANDERS *et al*, 1988).

Os peroxissomas foram primeiramente descritos por RHODIN em 1954 como “corpos esféricos ou ovais” presentes no citoplasma do túbulo renal proximal de camundongo. O trabalho pioneiro de DE DUVE e BAUDHUIN (1966) tornou claro que estas organelas contém um número de enzimas geradoras de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) assim como a catalase, a qual decompõe  $H_2O_2$  em água ( $H_2O$ ) e oxigênio ( $O_2$ ). A associação das enzimas geradoras de  $H_2O_2$  e catalase em uma única organela levou estes autores a introduzir o nome “peroxissoma”.

A principal função dos peroxissomas é catalisar a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e derivados (LAZAROW & MOSER, 1995; MOSER *et al*, 1995a; WANDERS *et al*, 1995; WANDERS *et al*, 1996b). Os substratos que são preferencialmente ou exclusivamente oxidados no peroxissoma incluem os ácidos graxos de cadeia muito longa (“very long chain fatty acids”-VLCFA), os ácidos graxos poliinsaturados, os ácidos graxos dicarboxílicos, as prostaglandinas e a cadeia lateral do colesterol (WANDERS *et al*, 1994). Todas as evidências aceitáveis sugerem que grande parte dos ácidos graxos derivados da dieta sejam oxidados na mitocôndria até  $CO_2$  e  $H_2O$ . No entanto, a mitocôndria não pode metabolizar todos os ácidos graxos. Os peroxissomas fazem o encurtamento da cadeia desses ácidos graxos que, após poucos ciclos de  $\beta$ -oxidação, podem ser captados pelo sistema mitocondrial para a completa oxidação até  $CO_2$  e  $H_2O$  (WANDERS, *et al*, 1994; WANDERS *et al*, 1996a).

Embora inicialmente se acreditasse que os peroxissomas tivessem um papel de menor importância no metabolismo de mamíferos, agora está claro que eles catalisam reações essenciais em um número de diferentes rotas metabólicas e que têm, na verdade, um papel indispensável no metabolismo intermediário. As rotas

metabólicas nas quais os peroxissomas estão envolvidos incluem: a biossíntese de plasmalógenos, ácidos biliares e colesterol; a transaminação do glioxalato; a oxidação de VLCFA, de ácidos de cadeia ramificada, ácidos dicarboxílicos e ácidos graxos poliinsaturados; e, ainda, a oxidação do ácido L-pipecólico e ácido fitânico (FOURNIER *et al*, 1994).

A  $\beta$ -oxidação peroxissomal, como a  $\beta$ -oxidação mitocondrial, ocorre através de sucessivos passos de desidrogenação, hidratação e clivagem tiolítica (figura 1). As enzimas envolvidas, entretanto, são bastante distintas das enzimas mitocondriais correspondentes, exceto a acil-CoA sintetase de ácidos graxos de cadeia longa. Esta, presente no sítio citosólico da membrana peroxissomal, é idêntica àquela presente na membrana mitocondrial externa e na membrana do retículo endoplasmático. Recentemente, verificou-se a presença de uma acil-CoA-sintetase separada envolvida na ativação dos ácidos graxos de cadeia muito longa. Esta atividade enzimática está presente nos peroxissomas e no retículo endoplasmático, mas não na mitocôndria. Parecem haver evidências que sugerem uma relação entre a ativação dos VLCFA na membrana peroxissomal e sua subsequente  $\beta$ -oxidação dentro do peroxissoma. Após sua ativação, os ésteres acil-CoA dos ácidos graxos de cadeia muito longa são, subseqüentemente,  $\beta$ -oxidados pela ação da enzima acil-CoA oxidase, da proteína bifuncional com as enzimas enoil-CoA hidratase e L-3-hidroxi-acil-CoA desidrogenase e da enzima tiolase peroxissomal (WANDERS *et al*, 1990).

### **1.3 Doenças Peroxissomais**

Os distúrbios peroxissomais são caracterizados, bioquimicamente, pelo acúmulo, nos tecidos e fluidos corporais, dos metabólitos que são normalmente degradados no peroxissoma (LAZAROW & MOSER, 1995; WANDERS *et al*, 1991). Os distúrbios peroxissomais reconhecidos atualmente compreendem 17 diferentes situações, 15 delas com envolvimento neurológico. Todos, com exceção da adrenoleucodistrofia ligada ao X (X-ALD), têm padrão de herança autossômica recessiva (FOURNIER *et al*, 1994). As doenças peroxissomais são classificadas conforme o dano celular envolvido: (a) aquelas nas quais os peroxissomas estão virtualmente ausentes, levando a um dano generalizado das funções peroxissomais (ex.: síndrome cerebro-hepato-renal de Zellweger, forma infantil da doença de Refsum, acidemia hiperpipecólica, adrenoleucodistrofia neonatal); (b) aquelas nas quais os peroxissomas estão presentes, mas várias funções peroxissomais estão prejudicadas (ex.: forma rizomélica da condrodissplasia punctata); (c) aquelas nas quais os peroxissomas estão presentes e somente uma única função peroxissomal está prejudicada (ex.: X-ALD) (WANDERS *et al*, 1988).

A maioria das doenças peroxissomais apresenta severas anormalidades neurológicas, incluindo retardo psicomotor, hipotonia, convulsões, deficiência na audição e comprometimento ocular, além de anormalidades craniofaciais, oculares, hepáticas, esqueléticas e gastrintestinais (WANDERS *et al*, 1988). No plasma dos pacientes com estes distúrbios, os VLCFA, o ácido pipecólico, os ácidos biliares, e os ácidos pristânicos e fitânico acumulam-se em graus variados (TEN BRINK *et al*, 1993).

O acúmulo de VLCFA que ocorre na maioria destes distúrbios permite que a identificação de um defeito da  $\beta$ -oxidação peroxissomal possa ser feita pela análise dos VLCFA no plasma, usualmente através da cromatografia gasosa (WANDERS *et al*, 1990).

#### **1.4 Adrenoleucodistrofia**

O termo adrenoleucodistrofia (ALD) refere-se a duas doenças neurológicas degenerativas caracterizadas pelo acúmulo de VLCFA nos tecidos e fluidos biológicos e usualmente acompanhado de desmielinização da substância branca e presença de inclusões lipídicas citoplasmáticas no sistema nervoso central (SNC), células adrenocorticais e células de Schwann (WANDERS *et al*, 1992).

A ALD neonatal, herdada de modo autossômico recessivo, diferencia-se da X-ALD também nos aspectos clínicos e bioquímicos. É uma desordem da biogênese do peroxissoma na qual o número e o tamanho dos peroxissomos estão diminuídos e a função de pelo menos 5 enzimas peroxissomais está prejudicada. Sinais clínicos da doença envolvem hipotonia muscular grave, convulsões, disfunção hepática e sinais dismórficos (MOSER *et al*, 1995a).

A X-ALD é um distúrbio do metabolismo que acomete aproximadamente 1 em cada 25.000 homens. Os VLCFA que se acumulam na X-ALD são quase sempre saturados, sem ramificações, incluindo principalmente aqueles com uma cadeia de 26 carbonos (ácido hexacosanóico, C<sub>26:0</sub>) e de 24 carbonos (ácido tetracosanóico, C<sub>24:0</sub>). O C<sub>26:0</sub> também pode ser chamado de ácido cerótico e o C<sub>24:0</sub>

de ácido lignocérico (MOSER *et al*, 1995a). SENIR e col (1998) demonstraram que, além dos níveis aumentados destes ácidos graxos, também foram observados níveis aumentados do ácido nervóico (C<sub>24:1</sub>), o qual é um ácido graxo de cadeia muito longa monoinsaturado. Este aumento também ocorre em consequência do defeito no processo de  $\beta$ -oxidação deste composto.

A X-ALD é a doença peroxissomal mais comum. O defeito bioquímico nesta afecção presumivelmente envolve um distúrbio no transporte da VLCFA-Coa sintetase na membrana peroxissomal e não uma deficiência na VLCFA-Coa sintetase peroxissomal. O gene da X-ALD mostra identidade importante com a proteína da membrana peroxissomal (FOURNIER *et al.*, 1994) e foi verificado estar parcialmente deletado em 7% de 85 pacientes com X-ALD. LAZO e col. (1993) mostraram que o defeito na X-ALD estaria relacionado à falta de atividade da enzima VLCFA-CoA sintetase nos peroxisomas. No entanto, MOSER e col.(1993) verificaram que o gene responsável pela X-ALD não codifica a VLCFA-CoA sintetase e sim uma proteína homóloga à proteína de membrana peroxissomal de 70Kd pertencente à família dos transportadores ABC. Não se sabe qual a relação entre esta proteína e a VLCFA-CoA sintetase (YAMADA *et al*, 1999). A ausência desta proteína foi detectada em aproximadamente 70% das famílias estudadas por KEMP e col. (1994).

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



Na X-ALD o defeito primário envolve um único gene no cromossomo X que foi mapeado como Xq28 (MOSER *et al*, 1992). Utilizando-se técnicas de clonagem posicional o gene ALD foi isolado (MOSER *et al*, 1993). O gene ALD possui 21 Kb e se divide em 10 exons. Análise com hibridização “in situ” por fluorescência (FISH) mostrou haver sequências homólogas ao gene ALD nos cromossomos 2 e 16 (EICHLER *et al*, 1996), assim como nos cromossomos 10 e 22 (EICHLER *et al*, 1997). A ausência da porção proximal do gene ALD indica que estas cópias autossômicas representam pseudogenes truncados não processados.

A região Xq28 contém muitos genes associados a doenças, incluindo os responsáveis pela hemofilia A, diabetes insipidus, paraplegia espástica ligada ao X, síndrome de MASA e distrofia muscular de Emery-Dreifuss (SENECA and LISSENS, 1995). Em torno de 50% das mulheres heterozigotas apresentam uma forma amena da doença, provavelmente devido a desvios no processo de inativação randômica do alelo da adrenoleucodistrofia. Genes modificadores, genes secundários e fatores imunológicos ou ambientais podem também contribuir para a expressão clínica da doença. A identificação desses fatores secundários hipotéticos pode ser importante não somente para o entendimento da função fisiológica da proteína da X-ALD e das suas rotas metabólicas, mas também pode contribuir para um tratamento mais eficiente.

## **1.5. Adrenoleucodistrofia ligada ao X**

### **1.5.1 Apresentação Clínica**

A apresentação clínica da X-ALD é bastante variável (MOSER, 1997). A forma cerebral infantil é a mais comum e tem o fenótipo mais grave, com início de comprometimento neurológico normalmente entre 5 e 10 anos de idade, levando a um estado vegetativo e morte dentro de poucos anos. Dificuldade escolar e déficit de atenção são sintomas precoces comuns, seguidos de distúrbios visuais e auditivos e quadriplegia, enquanto as convulsões são normalmente uma manifestação mais tardia. A desmielinização progressiva do SNC está associada com uma resposta inflamatória no cérebro. Em 86% dos 167 pacientes com a forma infantil da X-ALD testados no Kennedy Krieger Institute (Baltimore, USA) até 1987, os sintomas neurológicos precederam sinais da insuficiência adrenal, mas 85% dos pacientes com envolvimento neurológico mostraram resposta diminuída do cortisol ao estímulo com hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) na época do diagnóstico neurológico (MOSER *et al*, 1987; MOSER *et al*, 1991b). Na história pregressa, são freqüentemente registrados episódios de vômitos inexplicáveis, desidratação, fraqueza e hiperpigmentação, os quais foram atribuídos à insuficiência adrenal primária (MOSER *et al*, 1991b). As mudanças precoces no comportamento incluem instabilidade emocional, comportamento retraído ou hiperativo e/ou insucesso escolar. A dificuldade em compreender a fala dentro de ambiente barulhento ou ao telefone é um sintoma comum. O dano visual é um sintoma precoce em aproximadamente 1/3 dos pacientes

e inclui campo e acuidade visuais prejudicadas. Num estágio mais avançado da doença, a visão é totalmente perdida e há atrofia óptica. Uma vez que os sintomas neurológicos manifestam-se, a deterioração é rápida. Numa série de 167 pacientes estudados no Kennedy Krieger Institute o intervalo médio entre o primeiro sintoma neurológico e o estado vegetativo foi de aproximadamente 2 anos (MOSER *et al*, 1987). Após este período, em geral o paciente está acamado, incapaz de ver e falar e alimentando-se por sonda (MOSER *et al*, 1991d). A forma cerebral juvenil tem idade de início entre os 11 e 22 anos, sendo que os sintomas e a deterioração que ocorre nestes pacientes são semelhantes àqueles da forma cerebral infantil. Os sintomas mais frequentes incluem dificuldade escolar, distúrbios de comportamento, visão e audição diminuídas, demência, convulsão, hipoatividade e coordenação pobre (MOSER *et al*, 1995a). O termo adrenoleucodistrofia cerebral adulta designa pacientes com o defeito bioquímico da X-ALD e que desenvolvem sintomas cerebrais após os 21 anos de idade, mas que não apresentam envolvimento da medula espinhal. Esta forma adulta é relativamente rara (MOSER *et al*, 1995a). Os afetados desenvolvem distúrbios no comportamento, demência ou outras deficiências neurológicas cerebrais. Esta condição pode ser diagnosticada erroneamente como esquizofrenia, esclerose múltipla, tumor cerebral ou doença de Alzheimer (MOSER *et al*, 1991d). A presença da insuficiência adrenal é um indício do diagnóstico. Os especialistas devem estar alertas para a possibilidade de X-ALD quando da ocorrência de distúrbios psicóticos em pacientes com a insuficiência adrenal, embora eles possam ocorrer na insuficiência adrenal devido a outras causas (ESIRI *et al*, 1984). Lesões na substância branca, demonstradas por tomografia computadorizada ou por ressonância magnética, são freqüentemente o primeiro sinal que conduz ao diagnóstico, que é estabelecido por

ensaios bioquímicos. A X-ALD cerebral adulta também tem um prognóstico sombrio: o intervalo entre o primeiro sintoma neurológico e o estado aparentemente vegetativo ou morte é de 3 a 4 anos (MOSER *et al*, 1995a). As formas cerebrais desenvolvidas na adolescência e na fase adulta são raras e se diferenciam da forma infantil apenas pela idade de início.

A segunda forma mais comum de X-ALD é a adrenomieloneuropatia (AMN). Nesta forma clínica o início dos sintomas ocorre em média após os 21 anos de idade, envolvendo principalmente a medula espinhal e os nervos periféricos, levando a paraparesia progressiva e disfunção esfinteriana. Aproximadamente 40% dos pacientes também apresentam algum grau de envolvimento cerebral e depressão (MOSER *et al*, 1991d). Em contraste com as formas cerebrais da X-ALD, a AMN parece ser uma axonopatia que envolve mais severamente os aspectos distais dos axônios com a perda da mielina da medula espinhal. A incapacidade neurológica é lentamente progressiva, de modo que dentro de 5 a 15 anos após o início da doença os distúrbios do andar tornam-se graves e requerem o uso de bengala ou de cadeira de rodas (MOSER *et al*, 1995a). Nos fenótipos descritos até agora os sintomas de insuficiência adrenal podem preceder, coincidir ou seguir o início do comprometimento neurológico (FOURNIER *et al*, 1994).

Alguns pacientes com o defeito bioquímico da X-ALD manifestam apenas sinais de insuficiência adrenocortical e são referidos como apresentando insuficiência adrenal isolada. Alguns dados obtidos em países desenvolvidos indicam que aproximadamente 40% dos pacientes do sexo masculino com insuficiência adrenal tem o defeito bioquímico da X-ALD, que seria a causa mais freqüente deste quadro em homens. A insuficiência adrenocortical na X-ALD parece ser diretamente atribuída

ao acúmulo dos VLCFA, enquanto a patogênese das lesões no sistema nervoso parece ser mais complexa. Quase 90% dos homens com a forma cerebral infantil da X-ALD ou com AMN tem graus variados de insuficiência adrenal. A insuficiência adrenal isolada pode ser um sinal precoce da forma cerebral infantil ou da AMN, podendo preceder a expressão clínica completa da X-ALD (SENECA and LISSENS, 1995). É provável que adolescentes e adultos com o fenótipo de insuficiência adrenal isolada eventualmente desenvolvam AMN. Entretanto, não existe nenhuma correlação entre a presença ou severidade do envolvimento adrenal e o tipo ou severidade do envolvimento neurológico (MOSER *et al*, 1992). O intervalo entre o início da insuficiência adrenal e o dano neurológico é variável, mas pode ser tão longo quanto 32 anos (MOSER *et al*, 1995a). Embora livres de sintomas neurológicos evidentes, alguns pacientes apresentam anormalidades ao exame clínico-neurológico cuidadoso ou têm alterações do sistema nervoso central na avaliação por ressonância magnética (MOSER *et al*, 1991d).

EL-DEIRY e cols.(1997) estudaram a prevalência da disfunção adrenal em 71 mulheres portadoras do gene da X-ALD. Estas pacientes foram inicialmente identificadas como sendo portadoras obrigatórias deste gene pela história familiar, tendo níveis plasmáticos de VLCFA consistentes com o estado heterozigoto. Todas as pacientes mostraram níveis séricos normais de cortisol estimulado por ACTH, isto é, acima de 20 µg/dL. Entretanto, quatro pacientes (6%) mostraram concentrações de aldosterona estimulada por ACTH subnormais. Três destas mulheres (75%) estavam usando agentes anti-inflamatórios não esteroidais (AANE), enquanto somente quatro das 67 (6%) pacientes com resposta normal à aldosterona usavam AANEs. Então, o uso de AANEs foi associado com aumento do risco de hipoaldosteronismo.

Três destas quatro mulheres tiveram sintomas consistentes com deficiência de mineralocorticóides . Conclui-se que:

- a) insuficiência adrenal cortical raramente desenvolve-se em heterozigotas para ALD;
- b) insuficiência mineralocorticóide isolada pode ocorrer em heterozigotas para ALD, assim como pode ocorrer na disfunção adrenal relacionada à síndrome imunodeficiência adquirida e autoimune;
- c) ser heterozigota para ALD pode predispor ao hipoaldosteronismo relacionado ao uso de AANEs;
- d) uma diminuição subclínica na reserva de glicocorticóide, como medida pelo teste de estímulo com CRH pode estar presente na maioria destas mulheres;
- e) a medida dos níveis de aldosterona deve estar incluída nos testes de estimulação com ACTH quando se procura evidências de insuficiência adrenal em mulheres afetadas;
- f) os AANEs devem ser considerados um fator de risco para o desenvolvimento de hipoaldosteronismo em heterozigotas para ALD.

Existe uma notável variabilidade 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. KORENKE e col (1997) relataram dados endocrinológicos, clínicos, laboratoriais e moleculares de 55 pacientes com X-ALD de 34 famílias. Sintomas de insuficiência adrenal foram observados em 33 (60%) pacientes , 20 dos quais mostraram sintomas neurológicos adicionais de ALD ou AMN. Sintomas neurológicos isolados foram vistos em 12

(22%) pacientes; em 9 (16%) pacientes não haviam sintomas neurológicos nem endocrinológicos. Mutações do gene ALD (n=38) foram detectadas em 50 pacientes (incluindo 9 conjuntos de irmãos) de 32 famílias. Nenhuma correlação foi encontrada entre a mutação para o gene ALD e disfunção endocrinológica. Entretanto, foi encontrado que todos os conjuntos de irmãos eram concordantes para o fenótipo hormonal (síntese de cortisol foi reduzida em 2 conjuntos e normal em 7 conjuntos), enquanto 4 conjuntos mostraram fenótipo neurológico discordante. Aparentemente, fatores hereditários adicionais às mutações do gene da X-ALD podem interferir com o fenótipo hormonal mais fortemente do que com o fenótipo neurológico nesta doença. Assim, a adrenoleucodistrofia é caracterizada por uma ampla variabilidade fenotípica (STRADOMSKA and TYLKI-SZYMANSKA, 1996), a qual poderia ser causada por genes modificadores autossômicos ou por fatores não genéticos (SOBUE *et al*, 1994).

Resumindo, os fenótipos clínicos da X-ALD são: forma cerebral infantil, forma cerebral juvenil, forma cerebral adulta, adrenomielineuropatia (AMN), insuficiência adrenal isolada sem sintomas neurológicos (AI) e ALD em indivíduos neurologicamente e endocrinologicamente assintomáticos (MOSER, 1995b). Cabe salientar que os vários fenótipos podem ocorrer dentro da mesma família (FOURNIER *et al*, 1994).

### **1.5.2. Diagnóstico**

O diagnóstico da X-ALD depende da demonstração de níveis anormalmente altos de VLCFA saturados em fluidos orgânicos como soro ou plasma e/ou em

tecidos acessíveis como fibroblastos cultivados, leucócitos, eritrócitos, fígado e músculo. Pela simplicidade de obtenção, a análise inicial de soro ou plasma tem sido rotineiramente usada. Uma variedade de métodos cromatográficos têm sido descritos para a medida dos VLCFA. Muitos laboratórios utilizam o procedimento original desenvolvido por MOSER & MOSER (1991c), o qual envolve a preparação de um extrato de lipídeos totais, o tratamento desse extrato com ácido clorídrico metanólico (produzindo metilésteres), a purificação dos metilésteres através de cromatografia de camada delgada (CCD) e a quantificação por cromatografia gasosa (DACREMONT *et al*, 1995). O procedimento analítico de escolha é a cromatografia capilar gás-líquido, a qual pode ou não ser combinada com a espectrometria de massa. Para a correta interpretação do resultado das análises é necessário verificar não somente a concentração de C26:0 (ácido hexacosanóico), mas também as razões C26:0/C22:0 (ácido docosanóico) e C24:0 (ácido tetracosanóico)/C22:0. Embora anormalidades nas concentrações de VLCFA sejam menos marcadas em pacientes com X-ALD do que em outras doenças peroxissomais, na maioria dos casos (acima de 90%) todos estes três parâmetros estão mais do que dois desvios padrões acima dos valores médios dos controles (tabela 1). Estudos recentes têm mostrado que em uma minoria destes pacientes somente um (ou dois) destes três parâmetros pode ser anormal. Nestes casos é analisada nova amostra de plasma e, se ainda não esclarecido o diagnóstico, fibroblastos cultivados de pele são indicados para estudos adicionais. Se a concentração de VLCFA no plasma é anormal e o paciente está sob suspeita de sofrer de uma forma variante ou de uma desordem peroxissomal diferente da X-ALD, procedem-se estudos adicionais em plasma, eritrócitos, plaquetas e fibroblastos (WANDERS *et al*, 1992; WANDERS *et al*, 1993, WANDERS *et al*, 1994).



A tabela 1 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 1: Valores referenciais para o plasma, em  $\mu\text{mol/L}$ .

	C22:0	C24:0	C26:0	RAZÃO C24/C22	RAZÃO C26/C22
<b>Indivíduos normais</b>					
(n=30)					
Média	48	10	1,04	0,33	0,02
limite 5%-95%	26-70	5-15	0,56-1,52	0,21-0,45	0,01-0,03
<b>Heterozigotas para X-ALD</b>					
(n=20)					
Média	28	19	1,42	0,50	0,05
limite 5%-95%	7-49	0-39	0,66-2,20	0,32-0,68	0,04-0,06
<b>Pacientes com X-ALD</b>					
(n=20)					
Média	50	36	6,70	0,65	0,11
limite 5%-95%	30-70	5-67	2,86-10,5	0,23-1,07	0,07-0,16

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

A detecção de heterozigotos é possível na X-ALD, através da análise dos VLCFA no soro ou fibroblastos ou pela análise de DNA. Segundo MOSER e col. (1995a) 80% dos heterozigotos obrigatórios mostram níveis anormais de VLCFA no plasma. Esta percentagem é mais alta (95%) se níveis de VLCFA em fibroblastos são considerados, o que sugere que a detecção de heterozigotos pode ser mais sensível se este tecido é analisado (WANDERS *et al*, 1993). STEINBERG e cols. (1994) estudaram 34 mulheres com história familiar de X-ALD tendo encontrado 10 heterozigotas, uma das quais sintomática.

Somente as novas metodologias moleculares de diagnóstico são capazes de identificar a mutação responsável pela X-ALD no afetado, permitindo, assim a identificação precisa da mulher portadora. Como já citado anteriormente, o gene responsável pela X-ALD foi localizado em Xq28 e clonado (MIGUEON *et al*, 1981; AUBOURG *et al*, 1987). Este gene tem 21 kb e 10 exons, codificando uma proteína de 745 amino ácidos (MOSER *et al*, 1992). Mais de 150 diferentes mutações foram descritas até hoje, não sendo possível, entretanto, identificar associações entre mutações específicas e fenótipos clínicos (DODD *et al*, 1997). É importante observar que nenhuma destas mutações determina um fenótipo exclusivo, sendo observada a ocorrência dos mais variados fenótipos associados à diferentes mutações, sendo o inverso também válido, isto é, a ocorrência de diferentes fenótipos numa mesma família. Além disso, inúmeros estudos realizados não sugerem concentração étnica de mutações específicas (BRAUN *et al*, 1995; UCHIYAMA *et al*, 1994; KOK *et al*, 1995). A única mutação considerada freqüente na X-ALD é a deleção AG1415/16 presente no exon 5, detectada em 12 % dos afetados (KEMP *et al*, 1994). Um grande número de mutações está localizada nos exons 1, 5, 6 e 8, mas podem ser encontradas em todos os 10 exons. Aproximadamente 50% das mutações descritas até o momento são mutações de sentido trocado, e o restante se divide em mutações sem sentido (10,9%), microdeleções (16,4%), microinserções (2,7%), deleções de aminoácidos (3,6 %) e inserções de aminoácidos (1,8 %) ( DODD *et al*, 1997).

Ainda não se conhece a função da proteína ALD.

### **1.5.3 Detecção de Portadores e Aconselhamento Genético**

Aos membros da família de um indivíduo com X-ALD deve ser oferecido a dosagem dos VLCFA para detecção de outros possíveis portadores, sejam eles indivíduos do sexo masculino ainda pré-sintomáticos ou mulheres heterozigotas. Os hemizigotos e as heterozigotas, quando for o caso, devem ser alertados sobre o risco (50%) de transmitir o gene aos seus descendentes.

### **1.5.4 Diagnóstico Pré-natal**

As doenças peroxissomais conhecidas são todas potencialmente graves, freqüentemente associadas com alta morbi-mortalidade, justificando quase sempre a possibilidade do diagnóstico pré-natal, para o qual vários métodos estão disponíveis (WANDERS *et al*, 1988). Para o diagnóstico pré-natal de X-ALD é possível fazer análise de VLCFA por cromatografia gasosa e/ou a medida da  $\beta$ -oxidação dos VLCFA em biópsia coriônica ou amniócitos cultivados. É recomendável ter alguns cuidados para minimizar o risco de resultados falso-negativos utilizando-se subculturas em meios apropriados. A análise cromatográfica dos VLCFA pode ser complementada pela medida da  $\beta$ -oxidação dos VLCFA e, em algumas situações, por ensaios imunocitoquímicos para verificar a expressão da ALDP em vilosidades coriônicas. A análise da ALDP somente é útil nos casos em que a ALDP é negativa no caso índice.

Ainda, para fins de diagnóstico pré-natal, pode ser feita a análise molecular direta para a identificação da mutação presente na família (WANDERS *et al*, 1990).

A análise mutacional é o mais adequado procedimento para o diagnóstico pré-natal, quando a natureza da mutação em uma família de risco é conhecida e, especialmente, quando o caso índice é ALDP positivo (MOSER and MOSER, 1999; WANDERS *et al*, 1998).

### **1.5.5 Tratamento**

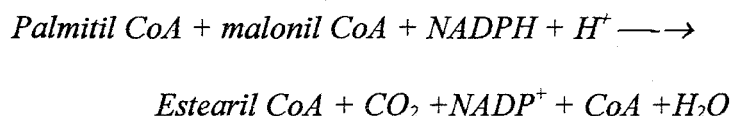
Várias abordagens tem sido utilizadas para tentar oferecer aos pacientes com X-ALD alternativas terapêuticas, incluindo modificações na dieta, uso de drogas e transplante de medula óssea.

O desenvolvimento de uma terapia para X-ALD iniciou como resultado de uma observação feita por KISHIMOTO e col. (1980) que administraram 10 mg por dia de C<sub>26:0</sub> marcado radioativamente por via nasogástrica em um paciente terminal com X-ALD durante os últimos 100 dias de vida. Estudos “post-mortem” mostraram que em uma região cerebral ativamente desmielinizada, 90% do C<sub>26:0</sub> estava marcado radioativamente. Foi concluído que 90% do C<sub>26:0</sub> encontrado no cérebro era oriundo da alimentação do paciente. A demonstração de que o C<sub>26:0</sub> cerebral provinha pelo menos em parte da dieta, levantou a hipótese de que a restrição deste composto da dieta poderia ter um efeito benéfico análogo ao que foi obtido quando a ingestão de ácido fitânico era restringida em pacientes com a doença de Refsum (REFSUM, 1981). Foi desenvolvida, assim, uma terapia que reduzia a ingestão diária de C<sub>26:0</sub> das 12-40 mg de uma dieta usual americana para apenas 3 mg (VAN DUYN *et al*, 1984). Infelizmente, esta medida não diminuiu os níveis de C<sub>26:0</sub> no

plasma e não alterou o índice de progressão clínica nos pacientes com a forma infantil da X-ALD (BROWN *et al*, 1982). A diferença entre os resultados terapêuticos encontrados na doença de Refsum e na X-ALD é que o ácido fitânico é exclusivamente originado da dieta, enquanto que o C<sub>26:0</sub> é também sintetizado endogenamente pelo sistema de elongação microsomal. Por razões desconhecidas, este sistema enzimático mostrou ser mais ativo nas células de pacientes com X-ALD do que em células normais (TSUJI *et al*, 1985).

A síntese dos ácidos graxos com cadeia maior que 16 carbonos é executada por um sistema de elongação dos ácidos graxos. Este sistema ocorre tanto na mitocôndria como nos microsomas (MURAD & KISHIMOTO, 1978).

A estequiometria da reação de elongação no sistema microsomal é :



Com esta reação, um ácido graxo C<sub>16</sub> (palmítico) é elongado à C<sub>18</sub> (esteárico). A síntese dos VLCFA é realizada por adições de malonil CoA. Assim duas unidades de carbono são adicionadas repetidamente até que a cadeia é completada. A ativação e subsequente β-oxidação peroxissomal dos ácidos graxos de cadeia muito longa são processos complexos e altamente regulados envolvendo a ação coordenada de enzimas múltiplas e proteínas acil carreadoras (Figura 1).

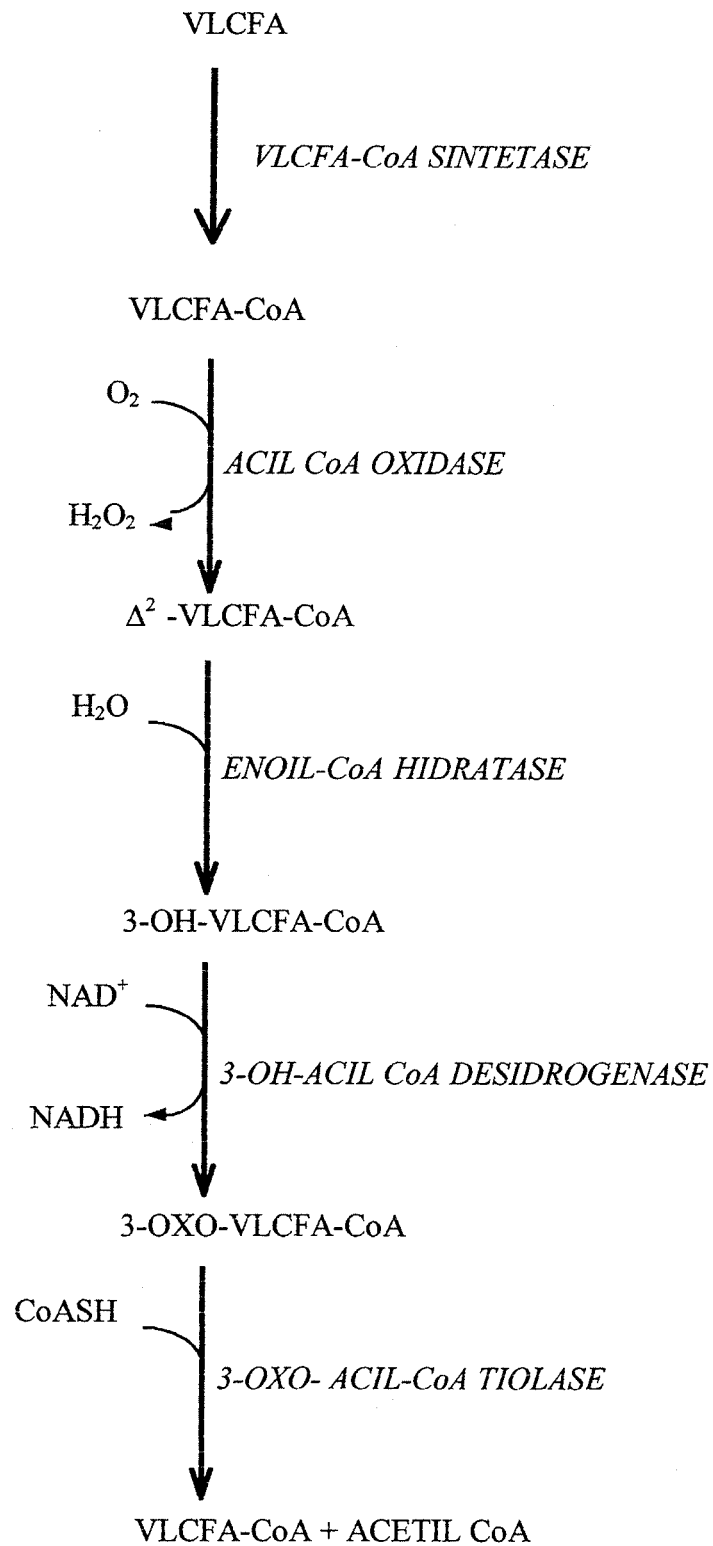


FIGURA 1: Ativação e subsequente  $\beta$ -oxidação peroxissomal dos ácidos graxos de cadeia muito longa (adaptado de WANDERS *et al*, 1990).

BOURRE *et al.* (1976) concluíram que uma única enzima é responsável pela elongação do ácido docosanóico (C<sub>22:0</sub>) e dos monoinsaturados, entre eles o ácido erúcido (C<sub>22:1</sub>) (Figura 2). Este achado foi relevante para o desenvolvimento de uma proposta terapêutica para X-ALD.

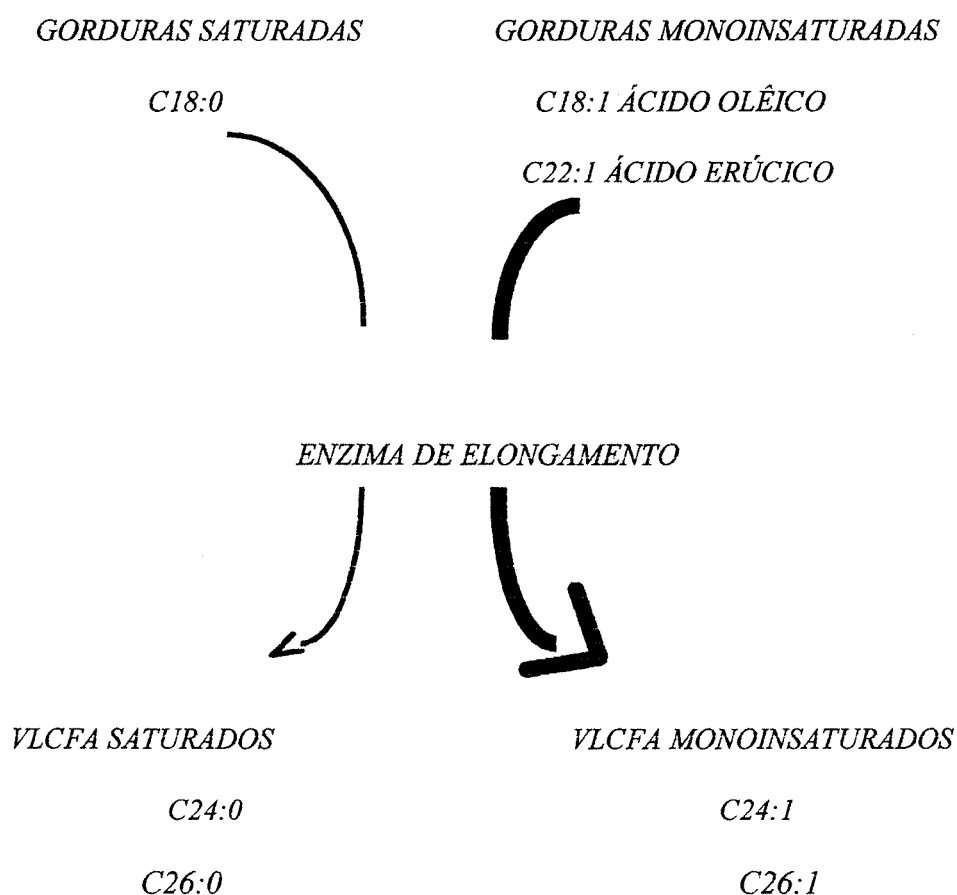


FIGURA 2. Elongamento das gorduras saturadas e monoinsaturadas (Adaptado de BOREL, 1992).

Foi demonstrado que a administração de ácidos graxos monoinsaturados diminui a síntese dos VLCFA saturados (RIZZO *et al.*, 1986). BOURRE *et al.* (1976) demonstraram que um mesmo sistema enzimático alonga ácidos graxos saturados e

monoinsaturados e que a redução na síntese de VLCFA saturados decorre da competição com ácidos graxos monoinsaturados por esse sistema de enzimas (MOSER *et al*, 1995a). O resultado é a diminuição na quantidade de VLCFA saturados produzidos. A quantidade de VLCFA monoinsaturados aumenta, mas eles são menos tóxicos para as células do que os saturados e o organismo parece apto para metabolizá-los (BOREL, 1992). KOIKE *et al* (1991) propuseram que o efeito é devido à inibição do primeiro passo do sistema de alongação microssomal dos ácidos graxos. Estas observações levaram inicialmente ao planejamento de uma dieta que combinou a administração oral de gliceroltrioleato (GTO), em uma dose diária de 1 a 2.5 g/kg de peso corporal, e a restrição da ingestão de VLCFA (RIZZO *et al*, 1987; SINGH *et al*, 1984). Apesar desta dieta ter baixado os níveis do ácido hexacosanóico (C<sub>26:0</sub>) no plasma em torno de 50% em 4 meses, eles ainda eram duas vezes superiores aos normais (MOSER *et al*, 1991a).

Em 1987, RIZZO e col. mostraram que a adição de gliceroltrierucato (GTE) produzia uma diminuição marcante de VLCFA no plasma. Foi demonstrado que uma mistura 4:1 de GTO-GTE normalizava os níveis de C<sub>26:0</sub> no plasma da maioria dos pacientes após um mês de tratamento. O gliceroltrierucato (GTE) é um glicerol esterificado com 3 moléculas de ácido erúico, o qual é um ácido monoinsaturado não ramificado com 22 carbonos na cadeia. O ácido erúico não é uma gordura usual da dieta, exceto em algumas partes da Índia e da China. É um componente do óleo de colza (KRAMER *et al*, 1983), membro da família das mostardas. O gliceroltrioleato (GTO) é um óleo especial purificado contendo em torno de 90% de ácido oléico. Está presente em muitos alimentos como no óleo de milho (25% de ácido oléico), no óleo das sementes de girassol (21% de ácido oléico)



ou no óleo de oliva (71% de ácido oléico). Diferentemente dos outros óleos, o gliceroltrioleato tem apenas traços de VLCFA (BOREL, 1992). O desenvolvimento do óleo GTE foi exaustivamente incentivado por Augusto Odone e sua esposa, pais de Lorenzo, um menino que apresentou a forma infantil da X-ALD. A mistura 4:1 de GTO-GTE foi, então, referida como o “Óleo de Lorenzo”, e passou a ser usada em inúmeros pacientes europeus e norte-americanos, em geral, dentro de estudos prospectivos (MOSER *et al*, 1995a). A dosagem recomendada do óleo é dependente da idade, do peso corporal e das condições clínicas do paciente. Em geral, administra-se 2-3 ml/kg/dia do óleo (VAN DUYN *et al*, 1984). Além disso, o Óleo de Lorenzo é isento de lactose, glúten, proteína, frutose e de sacarose.

Ao Óleo de Lorenzo deve-se associar uma dieta restrita em VLCFA e suplementar com multivitaminas, minerais e com uma fonte adicional de ácidos graxos essenciais (MOSER *et al*, 1992).

Em geral, a restrição na ingestão dos VLCFA pode ser alcançada pelo paciente alimentando-se dos seguintes produtos: laticínios não gordurosos, cortes magros de carnes bovina e suína, aves sem a pele e peixes com baixa gordura, frutas e vegetais .

Os principais alimentos a serem evitados são fontes de gorduras saturadas tais como: gorduras industrializadas (manteiga, cremes, leites, sorvetes), gorduras encontradas nas carnes e derivados e óleos vegetais (BOREL, 1992).

O Kennedy Krieger Institute conduziu um ensaio clínico com o Óleo de Lorenzo em 53 pacientes com X-ALD. A terapia foi aplicada enquanto eles se encontravam neurologicamente assintomáticos. O termo assintomático, nesse estudo, não necessariamente implica na ausência de envolvimento neurológico, uma vez que

pacientes com alterações comportamentais mínimas e/ou com desmielinização incipiente nos estudos de ressonância nuclear magnética também foram incluídos no estudo. A dieta foi administrada e a resposta bioquímica avaliada pela medida dos níveis plasmáticos de C<sub>26:0</sub>, mensalmente durante o primeiro ano e, depois disso, com intervalo de 3 a 6 meses. Os valores obtidos durante o período do tratamento foram medidos e comparados com controles. Os níveis de C<sub>26:0</sub> no plasma foram normalizados ou substancialmente reduzidos em 65% dos pacientes, e moderadamente reduzidos em 23% dos casos (MOSER, 1995b).

Após a administração do tratamento num período de  $38 \pm 27$  meses, foi feita uma avaliação da eficácia clínica do mesmo, quando se pode observar que 45% dos pacientes permaneceram bem, 36% deles mostraram ressonância magnética e comportamento ou função cognitiva ligeiramente anormais, 4% apresentaram ressonância magnética e função cognitiva ou comportamento moderadamente anormais, 6% tiveram piora marcante e 4% foram a óbito (MOSER, 1995b).

Os resultados apresentados por estes 53 pacientes parecem favoráveis e sugeriam que a terapia com o Óleo de Lorenzo poderia reduzir a frequência e gravidade do envolvimento neurológico subsequente em pacientes com X-ALD tratados antes da instalação dos sintomas neurológicos (MOSER, 1995b).

O principal efeito adverso do uso da mistura GTO-GTE é a trombocitopenia, que pode ocorrer em até 40% dos pacientes tratados (ZINKHAM *et al*, 1993). A soma de plaquetas parece estar inversamente relacionada ao níveis do ácido erúcido nos lipídeos plaquetários. Já o GTO, tem pouco ou nenhum efeito sobre as plaquetas. Se a contagem das plaquetas cair abaixo de 100.000 é necessário substituir a mistura GTE-GTO pelo uso do óleo GTO somente. Isto resulta em um

aumento do número de plaquetas dentro de 1 a 2 meses, mas nem sempre permite a normalização completa. Os pacientes tratados também estão sob o risco da deficiência de ácidos graxos essenciais. Parece que esta deficiência pode ser corrigida, pelo menos em parte, por suplementação com compostos tais como o óleo de açafraão (MOSER *et al*, 1995a) e com ácidos graxos  $\omega$ -3 na forma de cápsulas de óleo de peixe (MOSER *et al*, 1992). Os pacientes em tratamento com o Óleo de Lorenzo ainda podem mostrar uma razão alta na concentração dos ácidos trienóico-tetranóico, a qual está associada com a deficiência dos ácidos graxos essenciais (MOSER *et al*, 1992).

A terapia apenas com o Óleo de Lorenzo para pacientes que já estão neurologicamente sintomáticos não parece fornecer um benefício clinicamente significativo e pode não ser justificada devido aos efeitos colaterais, como a redução do número de plaquetas (ZINKHAM *et al*, 1993).

Outras terapias para X-ALD têm sido propostas, incluindo transplante de medula (AUBOURG *et al*, 1990; KRIVIT *et al*, 1992), modulação da resposta inflamatória (POWERS *et al*, 1992) com agentes tais como  $\beta$ -interferon e plasmaferese (PATY, 1993), além da esperada terapia gênica (MOSER *et al*, 1995a).

O transplante de medula óssea (TMO) é uma medida terapêutica na qual o paciente recebe uma infusão de células-tronco do tecido hematopoiético. Essas células alojam-se no espaço medular restabelecendo a hematopoiese. O transplante pode ser do tipo autólogo, no qual as células infundidas são do próprio paciente colhidas anteriormente a uma aplasia medular, podendo esta ser primária (anemia aplástica) ou secundária à radioterapia e quimioterapia; ou alogênico, na qual a medula provém de um doador imunologicamente compatível.

Os primeiros transplantes de medula foram realizados em pacientes que já apresentavam incapacidade neurológica avançada (MOSER *et al*, 1984). Os transplantes resultaram na esperada normalização da degradação dos VLCFA em leucócitos circulantes. Somado a isso, houve uma redução substancial dos níveis de VLCFA no plasma, sugerindo que o suprimento de um número relativamente pequeno de células enzimaticamente competentes foi suficiente para reduzir a carga total dos VLCFA. Apesar desse aspecto animador, os sintomas neurológicos dos pacientes continuaram a avançar possivelmente ainda mais rapidamente do que antes do transplante. Estudos subsequentes (MOSER *et al*, 1992; KRIVIT *et al*, 1992; MOSER, 1995b; WEINBERG *et al*, 1988; MOSER, 1997) confirmam que o transplante de medula em pacientes que já apresentam dano neurológico substancial não melhora o estado neurológico e pode até acelerar a deterioração. Mais de 50 afetados pela ALD foram submetidos ao transplante de medula óssea sendo que somente 20 % deles apresentaram melhora (MOSER *et al*, 1995a).

O interesse em transplantes foi retomado pelo relato de AUBOURG e col (1990), os quais realizaram um transplante em um menino de 8 anos de idade com anormalidades leves na função psicométrica, na função motora, no estado neurológico e na imagem por ressonância magnética. Um gêmeo HLA compatível, não idêntico e não afetado foi o doador. Os níveis plasmáticos dos VLCFA normalizaram. Também a imagem por ressonância magnética, os exames neurológicos e a função psicométrica normalizaram-se (iguais às do gêmeo) um ano depois. Até 1992, haviam sido realizados um total de 16 transplantes de medula em pacientes com X-ALD (MOSER *et al*, 1992; KRIVIT *et al*, 1992). KRIVIT e col (1992) relataram resultados animadores em pacientes com envolvimento neurológico ainda pequeno.

Os mecanismos pelos quais o transplante de medula pode levar à melhora ainda são incertos. Os possíveis fatores são : (a) o suprimento de enzimas normais ao cérebro através de células derivadas do transplante, as quais incluem a microglia; (b) imunossupressão associada com o transplante; (c) a transferência de um gene modificador favorável.

A resposta inflamatória, a qual pode ser mediada através das citocinas inflamatórias ou por mecanismos imunes, parece ter importância central na patogênese das lesões desmielinizantes. Esforços prévios para modificar isto por imunossupressão com ciclofosfamida não obtiveram sucesso (NAIDU *et al*, 1988; STUMPF *et al*, 1981). O uso de imunoglobulinas por via intravenosa foi bem sucedido em um paciente com a forma juvenil da X-ALD (MIKE *et al*, 1989). MOSER e col (1992) testaram esta estratégia em 12 pacientes e observaram ser a mesma eficiente em um paciente, mas sem benefícios claros para os demais. A recente demonstração que o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (tnf  $\alpha$ ) pode estar especificamente envolvido na resposta inflamatória da X-ALD (POWERS *et al*, 1992; McGUINNESS *et al*, 1993) levou ao início de uma terapêutica experimental com pentoxifilina, uma metilxantina que recentemente mostrou inibir a atividade do tnf  $\alpha$  (ALEGRE *et al*, 1991; NOEL *et al*, 1990).

O interferon é um potente inibidor da síntese do fator  $\alpha$  de necrose tumoral e interferon  $\gamma$ , os quais estão em altos níveis nas áreas dismielinizadas do cérebro de afetados pela X-ALD. A eficácia desta terapia ainda não é conhecida, não tendo sido possível observar melhora nos pacientes com ela tratados (KORENKE *et al*, 1995).

KEMP e col. (1998) relataram que o tratamento de células de pacientes com X-ALD, assim como de camundongos “knock-out” para o gene ALD (LU *et al*.,

1997), com 4-fenilbutirato (4PBA) resultou na diminuição dos níveis de VLCFA, assim como no aumento do processo de  $\beta$ -oxidação de VLCFA. Ocorre ainda aumento da expressão da proteína ALDRP, com proliferação de peroxissomos.

Outra droga, o fenofibrato, também altera a expressão dos genes ALDR e RMP70 (ALBET *et al*, 1997), elevando o padrão de expressão dos produtos destes genes principalmente no fígado e intestino.

SINGH e col. (1998 a e b) mostraram o potencial da lovastatina (um inibidor da 3-hidróxi-3-metil-glutaril-coenzima A - HMG-CoA-redutase) e do sal sódico do ácido fenilacético (AFA, um inibidor da mevalonato pirofosfato decarboxilase) para o tratamento da X-ALD. Lovastatina ou AFA sozinhos ou em combinação estimulam a beta-oxidação do ácido lignocérico (C24:0) e normalizam os elevados níveis de VLCFA em fibroblastos de pele cultivados de pacientes com X-ALD, podendo indicar uma nova possibilidade terapêutica para esta doença.

O dano neurológico na X-ALD pode ser mediado por ativação de astrócitos e indução de citocinas próinflamatórias (fator de necrose tumoral  $\alpha$ , interleucina 1  $\beta$  e interleucina 6). O tratamento com Óleo de Lorenzo e dieta não estão direcionados para os aspectos neuroinflamatórios da doença. Em modelos animais, SINGH e col. (1998b) mostraram que a lovastatina e o fenilacetato sódico inibem a indução da sintetase do óxido nítrico e a liberação de citocinas próinflamatórias envolvidas na patogênese do dano neurológico na X-ALD. Eles têm mostrado também que a lovastatina, AFA e compostos que aumentam AMP cíclico intracelular e a atividade da proteína quinase A (PKA) normalizam os níveis de VLCFA em fibroblastos de pele de pacientes com ALD infantil e AMN. Estes autores trataram sete pacientes de três famílias com lovastatina (20 mg/dia por duas semanas, após 40 mg/dia se nenhum

efeito adverso ocorreu) por dois a seis meses. A avaliação foi feita pelos aspectos clínicos e pela dosagem de VLCFA. Um paciente foi retirado do estudo por diarreia persistente e elevação marcada dos níveis séricos de creatina quinase. Outro paciente interrompeu o tratamento. Os níveis plasmáticos de VLCFA diminuíram dos seus valores pré-tratamento dentro de um mês após o início da terapia e permaneceram baixos e dentro da faixa normal por mais de seis meses em cinco pacientes que continuaram o tratamento. A curta duração e o pequeno tamanho do estudo não permitem avaliar se houve benefício clínico. Estes resultados sugerem que tratamento com lovastatina pode representar um meio simples, seguro e efetivo de reduzir o acúmulo plasmático de VLCFA nos pacientes com X-ALD.

PAHAN e col. (1998) relataram que compostos (forskolin, 8-bromo cAMP e rolipram, um inibidor da cAMP fosfodiesterase) que aumentam o cAMP e ativam a PKA parecem estimular a beta-oxidação peroxisomal do ácido lignocérico (C24:0) enquanto que compostos (H-89 e PKI miriostolado) que diminuem o cAMP e a atividade PKA inibem a beta-oxidação peroxisomal do ácido lignocérico em fibroblastos cultivados de pacientes com X-ALD. Consistentemente com a estimulação da beta-oxidação do ácido lignocérico, os ativadores PKA, normalizaram os níveis de VLCFA em fibroblastos cultivados de pacientes com X-ALD. Esta normalização com "forskolin", 8-bromo cAMP ou com rolipram foi feita independente da expressão do RNAm ou da proteína relacionada a ALD, sugerindo que derivados cAMP podem corrigir o defeito metabólico em fibroblastos X-ALD sem envolver o gene da doença. Devido ao fato de que astrócitos e microglia em lesões desmielinizantes do cérebro X-ALD expressam citocinas pró-inflamatórias como o fator alfa de necrose tumoral (tnf- $\alpha$ ) e a interleucina-1 beta, estes autores

avaliaram o efeito dos derivados cAMP ou rolipram na microglia e nos astrócitos primários de ratos estimulados por lipopolisacarídeos e encontraram que derivados cAMP ou rolipram inibem a indução do  $\text{tnf-}\alpha$  e interleucina-1 beta tanto em astrócitos quanto em microglia. A habilidade dos derivados cAMP e rolipram para bloquear a indução do  $\text{tnf-}\alpha$  e da interleucina-1 beta em astrócitos e microglia e normalizar os ácidos graxos patogênicos em fibroblastos de pele da X-ALD claramente identifica análogos de cAMP e rolipram como potenciais candidatos para terapia de pacientes com X-ALD.

Espera-se que a terapia gênica possa conduzir, no futuro, a um tratamento definitivo para esta doença.



## **2. JUSTIFICATIVA:**

Os progressos laboratoriais para o diagnóstico dos distúrbios da  $\beta$ -oxidação peroxissomal têm sido importantes. A identificação destes erros inatos do metabolismo possibilita, algumas vezes, a introdução de um tratamento que poderá permitir uma possível melhor qualidade de vida aos pacientes.

Nos países desenvolvidos, onde programas de detecção de doenças peroxissomais em pacientes suspeitos são hoje rotina, foi verificado que alguns pacientes com o defeito bioquímico da X-ALD manifestam somente sinais de insuficiência adrenocortical e/ou um quadro neurológico mais leve, sem comprometimento cerebral. Assim, a investigação destes distúrbios parece ser relevante uma vez que permite um precoce diagnóstico destas entidades, possibilitando um tratamento mais adequado.

Deve-se ressaltar que as várias formas clínicas de X-ALD podem recorrer na mesma família, podendo os casos de insuficiência adrenal isolada e de tetraparesia servirem como sentinela para indicar a presença do gene, possibilitando o tratamento precoce e a prevenção da ocorrência de formas mais graves.

Há também a necessidade de se identificar famílias grandes com X-ALD, com vistas a melhor avaliação da expressão fenotípica do gene, estudo que é mais viável em países como o Brasil, onde o tamanho familiar é usualmente maior que nos países desenvolvidos.

Considerando os aspectos acima citados, pareceu-nos adequado realizar uma pesquisa para avaliar a presença de casos atípicos de X-ALD em pacientes com insuficiência adrenal e tetraparesia em nosso meio, possibilitando que esta abordagem

fosse dimensionada, e que o estudo das famílias identificadas fosse realizado com vistas a contribuir para o melhor entendimento da variabilidade fenotípica da doença.

Os resultados desta pesquisa poderão contribuir de alguma forma para um melhor prognóstico dos pacientes com X-ALD, uma vez que as famílias afetadas podem ser beneficiadas pelo tratamento precoce, pela detecção de portadores, pelo aconselhamento genético e pelo diagnóstico pré-natal.

### **3. OBJETIVOS**

O presente trabalho teve os seguintes objetivos:

a) averiguar a frequência de X-ALD em pacientes com insuficiência adrenal e em pacientes com tetraparesia;

b) averiguar, nas famílias identificadas, a frequência dos diferentes fenótipos, de X-ALD e de mulheres heterozigotas, estimando o potencial de risco para as múltiplas formas da doença;

c) correlacionar os achados bioquímicos com as características clínicas dos pacientes de forma a tentar contribuir para a melhor caracterização da heterogeneidade das manifestações apresentadas;

d) avaliar a evolução de pacientes X-ALD tratados com a mistura gliceroltrioleato/gliceroltrierucato no que tange aos aspectos bioquímicos e clínico/radiológicos.

Além disso, o projeto tem como objetivo secundário a implantação de um centro de referência para o diagnóstico, tratamento, prevenção e investigação de doenças peroxissomais.

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS:**

##### **4.1. Amostra estudada:**

No presente trabalho foram investigados 21 pacientes com diagnóstico de insuficiência adrenal e 26 pacientes com tetraparesia/paraparesia, encaminhados por diversos serviços de Endocrinologia e Neurologia. Os pacientes com insuficiência adrenal foram incluídos no estudo mediante os seguintes critérios: níveis de cortisol alterados (avaliados pelo teste de estimulação do hormônio adrenocorticotrófico) ou imagem compatível em tomografia computadorizada da glândula adrenal. Para avaliação dos níveis de cortisol foi necessário jejum. Foi colhida amostra de sangue basal (tempo zero) antes da administração de ACTH sintético endovenoso na dose de 0,25mg. Foi feita nova coleta de sangue nos tempos 30,60 e 90 minutos. Na resposta normal ao cortisol o pico plasmático excede a 30µg/dL ou pelo menos 50% em relação ao valor basal (CRAPO *et al.*, 1979). Os pacientes com insuficiência adrenal não apresentaram resposta ao cortisol. Os pacientes com tetraparesia foram incluídos no estudo desde que não tivessem outra etiologia clara previamente identificada. De todos eles foram colhidas amostras de sangue para a análise de VLCFA no plasma. Quando era confirmado o diagnóstico de X-ALD, as famílias eram investigadas com vistas à detecção de outros hemizigotos e de heterozigotas.

Foram utilizados para estabelecimento dos valores de referência 30 indivíduos sadios, em cuja família não existiam casos de X-ALD, insuficiência adrenal ou tetraparesia, dos quais também foram colhidas amostras de sangue para a análise de VLCFA em plasma.

#### **4.2. Tratamento empregado:**

O tratamento pode ser instituído em 7 pacientes nos quais foi diagnosticada X-ALD, o qual seguiu o protocolo empregado no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Resumidamente, o tratamento utilizado pelos pacientes neste estudo consistiu em uma dieta restrita em VLCFA combinada com a utilização do Óleo de Lorenzo, em quantidades específicas para cada paciente de acordo com o peso corporal, número de plaquetas e níveis plasmáticos de VLCFA.

Em alguns pacientes foi prescrita suplementação com multivitaminas, minerais e uma fonte adicional de ácidos graxos essenciais, ácido linoléico e linolênico encontrados no óleo de açafrão e óleo de peixe.

Em geral, a restrição na ingestão de VLCFA pode ser alcançada pelo paciente alimentando-se dos seguintes produtos: laticínios não gordurosos, cortes magros de carne bovina e suínos, aves sem a pele e peixes com baixa gordura, frutas e verduras.

Os principais alimentos a serem evitados são fontes de gorduras saturadas tais como: gorduras industrializadas (manteigas, cremes, leites, sorvetes), gorduras encontradas nas carnes e derivados e óleos vegetais.

A evolução dos pacientes foi aferida por avaliações clínicas, radiológicas e laboratoriais.

#### **4.3. Métodos empregados:**

O sangue foi coletado com anticoagulante (heparina), sendo separado o plasma, que era mantido congelado a - 40°C até o momento das análises. Não foi exigido jejum para a coleta do mesmo.

Foi feita a dosagem dos seguintes VLCFA no plasma: ácido docosanoico (C22:0), ácido tetracosanoico (C24:0) e ácido hexacosanoico (C26:0). Foram também calculadas as razões C26:0/C22:0 e C24:0/C22:0.

O procedimento analítico utilizado foi a cromatografia capilar gás-líquido, baseado no procedimento original de MOSER e MOSER (1991c). Neste método, 0,1 ml de plasma ou 250  $\mu$ l de fibroblastos são utilizados, sendo os lipídios extraídos com clorofórmio-metanol. Após serem secados, são tratados com ácido hidrocólico metanólico, o qual forma metil-ésteres de todos os ácidos graxos. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos são, posteriormente, purificados por cromatografia de camada delgada e, subsequentemente, quantificados pela cromatografia gasosa. O conteúdo de proteína dos fibroblastos foi estimado pelo método de LOWRY *et al* (1951).

Detalhadamente, a dosagem de VLCFA em material biológico utiliza 100 $\mu$ L de plasma ou 250  $\mu$ L fibroblastos adicionados de padrão interno (ácido graxo heptacosanoico - C<sub>27:0</sub>) para medidas do C<sub>22:0</sub>, C<sub>24:0</sub> e do C<sub>26:0</sub>. Nesse primeiro momento faz-se a extração do plasma com uma mistura de clorofórmio : metanol (1:1, v/v) seguida de agitação e centrifugação. Removem-se as proteínas precipitadas e ao sobrenadante adiciona-se 2,5 ml de clorofórmio e 1,5 ml de água bidestilada. Agita-se por meio de um vórtex e novamente leva-se à centrífuga (10 minutos à 3000 rpm). A camada superior é desprezada a fim de remover os lipídeos polares. Seca-se a fase inferior com nitrogênio (N<sub>2</sub>), redissolve-se com 0,5 ml de clorofórmio : metanol (2:1, v/v) e seca-se novamente com nitrogênio (N<sub>2</sub>). A seguir, a cada extrato de lipídeo total seco adiciona-se 0,6 ml de ácido clorídrico metanólico 1 N (400  $\mu$ l de metanol com 200  $\mu$ l de metanol/ácido clorídrico 3 N). Essa mistura fica 16 horas à 75°C para que ocorra a metilação dos ácidos graxos. Após as 16 horas, deixa-se

resfriar à temperatura ambiente, seca-se com nitrogênio, lava-se com a mistura 2:1 de clorofórmio:metanol e seca-se novamente. O passo seguinte é a purificação dos ésteres metílicos através da cromatografia de camada delgada. A amostra é solubilizada e aplicada em uma placa de sílica gel pré-lavada. Depois da aplicação, a placa é colocada em uma cuba contendo a mistura tolueno : dietiléter (97:3, v/v). Após a migração, a placa é revelada com iodo e os pontos correspondentes aos ésteres metílicos dos ácidos graxos são extraídos por raspagem. Essa raspagem é submetida a 3 extrações com hexano, sendo então a fase superior, orgânica, seca com nitrogênio. O resíduo é solubilizado com hexano para, finalmente, ser injetado no cromatógrafo à gás. Este, é equipado com um detector de ionização de chama, com uma coluna capilar de sílica tipo HP-5 (0.20 mm de diâmetro interno; 0.33 µm de filme; 25 m de comprimento), sendo o hélio o gás de arraste utilizado. As áreas dos picos cromatográficos são utilizados para fins de quantificação pelo método da padronização interna.

#### **4.4. Análise Estatística:**

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelos testes de Mann Whitney, Wilcoxon, teste exato de Fisher e Kruskal-Wallis, sendo as diferenças identificadas pelo Dunn. Para tal utilizou-se o programa SPSS versão 6.0. O nível de significância foi de  $p < 0,05$ .

#### **4.5. Considerações Éticas:**

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

## **5. RESULTADOS**

Neste trabalho foram estudados 47 indivíduos, sendo 21 com insuficiência adrenal e 26 com tetraparesia e/ou paraparesia. Nos 21 indivíduos com insuficiência adrenal foram detectados 12 casos de ALD (57,1%). Nos 26 indivíduos com tetraparesia/paraparesia foram detectados 1 caso de ALD (3,8%) e 4 casos de AMN (15,4%), totalizando 5 casos de X-ALD (19,2%). Assim sendo, da amostra total de 47 pacientes com insuficiência adrenal ou tetraparesia/paraparesia foram detectados 17 casos de X-ALD (36,2%). Estes resultados estão resumidos na tabela 2.

**Tabela 2**- Freqüência de casos de adrenoleucodistrofia e adrenomieloneuropatia em pacientes com insuficiência adrenal e tetraparesia/paraparesia.

<u>Indivíduos/casos</u>	<u>Insuficiência adrenal</u>	<u>Tetraparesia/Paraparesia</u>	<u>Todos</u>
ALD	12 (57,1%)	1 (3,8%) -	13 (27,7%)
AMN	-	4 (15,4%)	4 (8,5%)
Normais/não afetados	9 (42,9%)	21 (80,8%)	30 (63,8%)
<b>Total</b>	<b>21 (100%)</b>	<b>26 (100%)</b>	<b>47 (100%)</b>

Também foram estudados 88 familiares (25 homens e 63 mulheres) de 13 famílias destes 17 casos índice. Nos 25 homens foram detectados 1 caso adicional de ALD (4%) e 4 casos adicionais de AMN (16%). Nas 63 mulheres foram identificadas 35 heterozigotas (portadoras) do gene da X-ALD (56%). (tabela 3)



**Tabela 3** – Resultados da investigação dos familiares de 13 pacientes X-ALD.

Família	Homens			Mulheres		Total de familiares estudados
	ALD	AMN	Normais	Heterozigotas	Normais	
1				1	5	6
2			3	4	4	11
3			1	2	3	6
4				3		3
5				2	1	3
6		1		1		2
7				2	4	6
8		1	3	2	2	8
9				1		1
10				2	2	4
11	1					1
12			2	4	2	8
13		2	11	11	5	29
<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>20</b>	<b>35</b>	<b>28</b>	<b>88</b>

As figuras 3 à 15 contém os heredogramas destas 13 famílias. Os heredogramas mostram que diferentes tamanhos familiares foram estudados, sendo a maior família com 29 membros. Pode-se observar pela diferença entre o número de indivíduos testados e o tamanho dos heredogramas que muitas vezes é difícil despertar o interesse familiar pelo estudo.

Os 17 pacientes com diagnóstico de X-ALD tiveram idade média ao diagnóstico de 10 anos para ALD e de 29 anos para AMN. A tabela 4 mostra as idades de início dos sintomas, diagnóstico e do início da terapia, mostrando que foi grande o intervalo entre início dos sintomas, diagnóstico e início da terapia (nos casos em que esta terapia foi instituída).

Os pacientes com ALD tiveram média de idade de aparecimento dos primeiros sintomas de 7,6 anos, enquanto que nos com AMN esta média foi de 22 anos. A idade de início da terapia foi de 10 anos para ALD e 29 anos para AMN. Portanto o

intervalo de tempo entre o aparecimento dos sintomas e o diagnóstico ou a instituição da terapia foi de aproximadamente 2 anos para ALD. Para os pacientes com AMN o intervalo entre o início dos sintomas e o diagnóstico foi de 7 anos e o intervalo entre os primeiros sintomas e o início da terapia foi de 7 anos.

**Tabela 4** - Idade do aparecimento dos sintomas, do diagnóstico e do início da terapia nos 17 pacientes com X-ALD.

Paciente	Idade nos primeiros sintomas (anos)	Idade de diagnóstico (anos)	Idade de início da terapia (anos)	Intervalo entre sintomas e diagnóstico (anos)	Intervalo entre sintomas e início terapia (anos)
<b>ALD</b>					
1	7	9	9	2	2
2	10	11	11	1	1
3	4	9	9	5	5
4	8	9		1	
5	7	8		1	
6	8	10		2	
7	13	15	15	2	2
8	6	8		2	
9	7	8		1	
10	8	8		0	
11	8	20		12	
12	6	6	6	0	0
<b>Média</b>	7,6	10,0	10,0	2,4	2,0
<b>AMN</b>					
1	23	28	28	5	5
2	16	19	19	3	3
3	17	21	21	4	4
4	22	39	39	17	17
5	32	38	38	6	6
<b>Média</b>	22,0	29,0	29,0	7,0	7,0

A tabela 5 relaciona os sintomas e sinais encontrados nos pacientes com X-ALD. Como era de se esperar, devido aos critérios de inclusão, insuficiência adrenal e fraqueza de membros estavam entre os sintomas mais frequentes, aparecendo em 53%

e 40% dos casos, respectivamente. Leucodistrofia foi um sinal muito freqüente, observado em 80% dos casos.

Leucodistrofia, insuficiência adrenal, fraqueza muscular, dificuldade visual e de aprendizado foram os principais sintomas apresentados pelos pacientes com X-ALD como um todo. Leucodistrofia, dificuldade de visão, escolar e da escrita foram mais frequentemente encontradas nos pacientes com ALD. Insuficiência adrenal ocorreu com igual freqüência em ambas as formas clínicas. Fraqueza muscular associada com paraparesia foram muito mais freqüentes nos pacientes AMN ( $p=0,02564$ ). Embora não significativa, uma tendência para dificuldade visual foi observada nos pacientes ALD ( $p=0,09231$ ). Hiperpigmentação, convulsões, tremores, distúrbios de equilíbrio e esfinterianos, e dificuldades na fala apareceram em ambas as formas clínicas com quase a mesma freqüência.

**Tabela 5** - Frequência de sinais e sintomas observada nos 17 pacientes com X-ALD.

Sinais e sintomas	ALD+AMN (%) (n=17)	ALD (%) (n=13)	AMN (%) (n=4)
Leucodistrofia	80	90,9	50
Insuficiência adrenal	53	63,6	75
Fraqueza de membros ( * )	40	18,2	100
Dificuldade de visão	40	54,5	-
Dificuldade escolar	40	45,5	25
Dificuldade na fala	33	45,5	25
Hiperpigmentação	33	36,4	25
Convulsões	33	36,4	25
Paraparesia (*)	27	9,1	75
Dificuldade na escrita	27	36,4	-
Tremor	27	9,1	50
Distúrbio de comportamento	27	18,2	50
Distúrbio de equilíbrio	21	18,2	25
Distúrbio esfinteriano	20	18,2	25
Dor abdominal	13	18,2	-
Deterioração neuronal	13	18,2	-
Dificuldade de audição	13	9,1	25
Hiperatividade	13	9,1	25
Vômito e prostração	13	18,2	-
Faces atípicas	7	9,1	-
Ataxia progressiva	7	9,1	-
Cianose	7	9,1	-
Déficit de atenção	7	9,1	-
Dor de cabeça	7	9,1	-
Microcefalia	7	9,1	-
Hipotrofia	7	-	25
Afasia	7	9,1	-
Edema cerebral	7	9,1	-
Enurese	7	9,1	-
Hiponatremia	7	9,1	-
Hemiparesia	7	9,1	-
Pneumonia	7	9,1	-
Sangramento gastroesofágico	7	9,1	-
Demência leve	7	9,1	-
Idade média início sintomas (anos)	-	8	22
Idade média no diagnóstico (anos)	-	10	29

(\*) Estatisticamente significativo – Teste Exato de Fisher

Comparando-se pelo teste de Mann-Whitney as concentrações de VLCFA dos pacientes ALD + AMN com a sintomatologia mais freqüente apresentada pelos mesmos no momento do diagnóstico (leucodistrofia, insuficiência adrenal, fraqueza muscular, dificuldade de visão, dificuldade escolar, dificuldade de fala, hiperpigmentação, convulsões, paraparesia, dificuldade na escrita, tremor e distúrbio de comportamento) foi verificada uma associação entre as concentrações de VLCFA e alguns sintomas. Constatou-se uma associação entre leucodistrofia e a razão C24:0/C22:0, a qual está aumentada (mediana= 0,94 , p=0,0433), entre dificuldade na escrita e as concentrações de C22:0 e C26:0, que estão diminuídas (medianas=39,2 e 2,54; p=0,0090 e p=0,0367, respectivamente), entre dificuldade de visão e a razão C24:0/C22:0 que está aumentada (mediana =1,48 , p=0,0451) e entre fraqueza muscular e a concentração de C22:0, que está aumentada (mediana=56,9 , p=0,0372). Ainda, verificou-se uma tendência de associação, embora não significativa, entre insuficiência adrenal e a concentração de C24:0 (mediana= 38,2 , p=0,0662), a qual está diminuída.

Estes resultados parecem indicar que alterações de VLCFA podem estar relacionadas a alguns sintomas específicos nestes pacientes. Estudos mais aprofundados são necessários para confirmar ou não estes achados.

Sete pacientes sob tratamento dietético usavam óleo de Lorenzo em doses ajustadas conforme o peso, níveis plasmáticos de VLCFA, número de plaquetas, etc. A tabela 6 descreve as doses de óleo de Lorenzo usadas em L/mês e mL/Kg/dia assim como o tempo de uso da terapia em meses.

**Tabela 6** - Doses de Óleo de Lorenzo utilizada nos pacientes X-ALD sob tratamento dietético e tempo de uso da terapia.

Pacientes	Dose óleo		Duração da terapia (meses)
	( L/mês)	ml/kg/dia	
<b>AMN</b>			
1	3,0	1,2	40
2	3,0	1,2	27
<b>ALD</b>			
3	2,0	1,2	33
4	3,0	2,0	13
5	2,0	1,2	13
6	2,0	1,6	24
7	1,6	1,2	18

O impacto deste tratamento pode ser observado sob dois aspectos:

- a) Bioquímico: alteração dos níveis plasmáticos de VLCFA (figura 16) a,b, c, d, e) e (tabela 7)

A figura 16 (a à e) ilustra as concentrações dos VLCFA dos pacientes sob tratamento dietético. Não houve diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparados as concentrações de VLCFA nos diferentes momentos terapêuticos, pelo teste pareado de Wilcoxon.

A tabela 7 mostra as concentrações plasmáticas do ácido hexacosanóico (C26:0) durante todo o período de tratamento dos pacientes X-ALD, verificando-se que a concentração deste ácido graxo permaneceu alta (acima de  $2,86 \mu\text{mol/L}$ )

durante a maior parte do tempo de tratamento, uma vez que a faixa de normalidade se encontra entre 0,56 e 1,52  $\mu\text{mol/L}$ .

A média da concentração plasmática do ácido hexacosanóico (C26:0) nos pacientes tratados foi de 6,22  $\mu\text{mol/L}$  no momento do diagnóstico e de 3,08  $\mu\text{mol/L}$  após início do tratamento (queda de 50,5%). A razão C26:0/C22:0 foi de 0,14 no momento do diagnóstico e de 0,08 após o início da terapia (queda de 42,8%).

**Tabela 7** - Concentração média do ácido hexacosanóico (C26:0) no plasma durante o período da terapia (normal: 0,56 à 1,52  $\mu\text{mol/L}$ )

Concentração de C26:0 $\mu\text{mol/L}$	Valores observados nos pacientes em tratamento (%)
<1,52 <sup>1</sup>	4,6
1,52 à 2,86	32,6
>2,86 <sup>2</sup>	62,8

1- Valor máximo da normalidade.

2- Limite inferior observado em pacientes não tratados.

b) Clínico: curso clínico dos sintomas inicialmente apresentados (tabelas 8 e 9)

A tabela 8 descreve em termos percentuais a evolução clínica/radiológica dos pacientes X-ALD sob tratamento dietético, a maioria dos quais se manteve sem progressão clínica importante (estáveis) durante a terapêutica. Apenas 1 paciente ALD mostrou piora severa do quadro clínico e outro ALD foi a óbito.

**Tabela 8** - Evolução clínica dos pacientes X-ALD sob tratamento com óleo de Lorenzo.

<b>Evolução</b>	<b>Porcentagem (%)</b>
Sem progressão clínica importante	4 (57,1)
Imagem de tomografia computadorizada ligeiramente pior	1 (14,3)
Piora severa	1 (14,3)
Morte	1 (14,3)

A tabela 9 relaciona a presença ou ausência de alterações cerebrais na imagem por tomografia computadorizada dos pacientes em tratamento para X-ALD com a progressão clínica da doença. Todos os pacientes com ALD cerebral estudados tinham alterações na tomografia computadorizada. Setenta e um por cento dos pacientes mostraram uma lenta progressão na sintomatologia clínica e 28,3% deles tiveram uma rápida progressão dos sintomas da doença.



**Tabela 9** - Curso clínico dos pacientes portadores de X-ALD tratados com Óleo de Lorenzo.

Paciente	Duração da terapia (meses)	Curso clínico	Alterações TC
<b>ALD</b>			
1	13	Progressivo/lento	sim
2	33	Progressivo/lento	sim
3	18	Progressão rápida	sim
4	24	Progressão rápida	sim
5	13	Progressivo/lento	sim
<b>AMN</b>			
1	40	Progressivo/lento	não
2	27	Progressivo/lento	não

As figuras 17, 18, 19 e 20 (a à e) mostram as concentrações de VLCFA nos pacientes com X-ALD, nos pacientes com insuficiência adrenal e tetraparesia sem o diagnóstico de X-ALD, nas heterozigotas e nos familiares normais, respectivamente. A concentração de C26:0 e as razões C24:0/C22:0 e C26:0/C22:0 dos pacientes X-ALD e das heterozigotas diferem significativamente dos controles normais, dos familiares não afetados e dos pacientes com insuficiência adrenal e tetraparesia sem o diagnóstico de X-ALD para um  $p < 0,05$ , quando testados pelo teste do Kruskal-Wallis, sendo as diferenças entre os grupos analisadas pelo teste de Dunn.

**Figuras 3 à 15:**

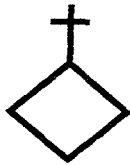
Legenda



Afetado



Heterozigota



Testados



Sexo não informado



Aborto

Figura 3: familia 1

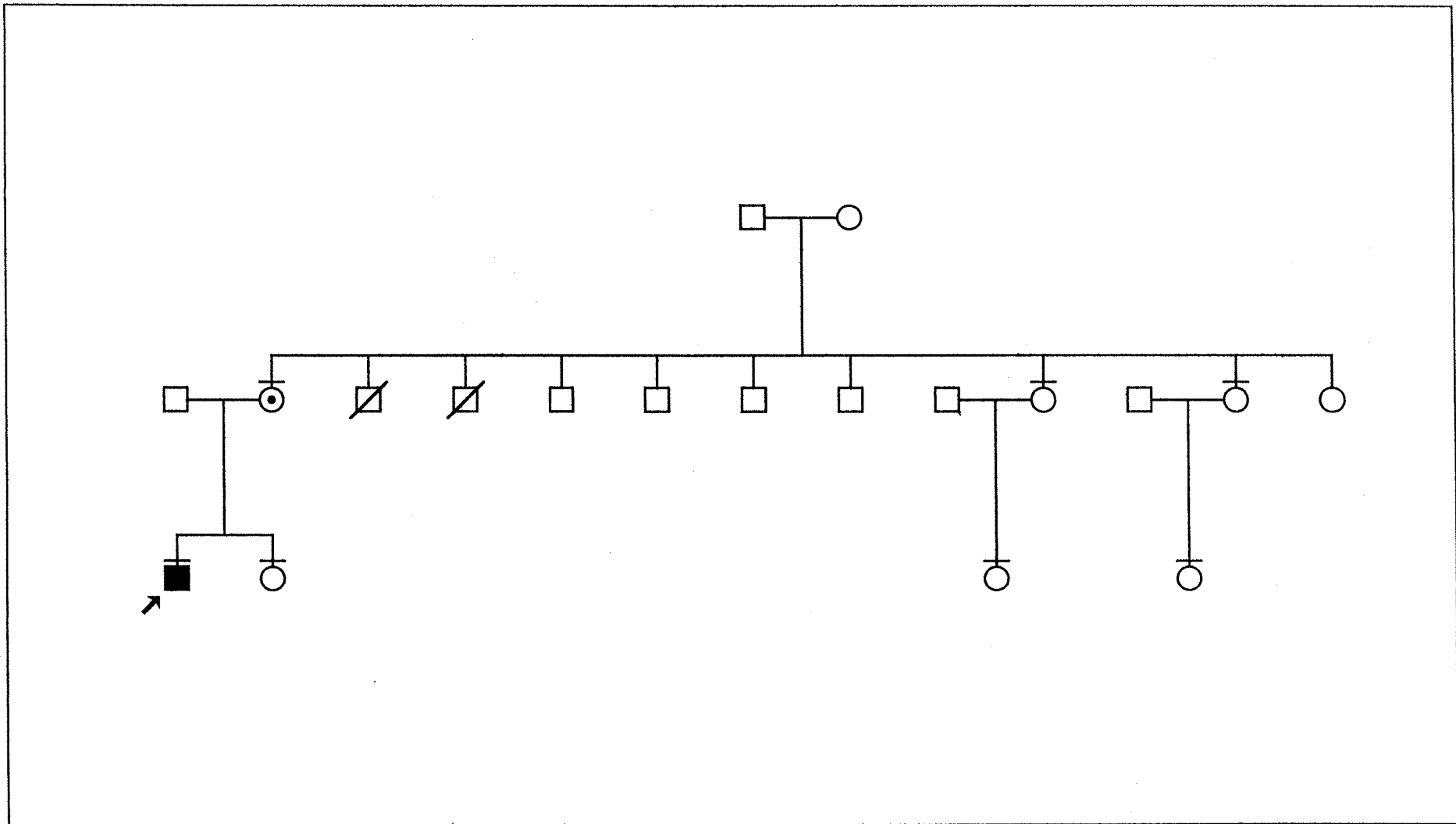


Figura 4: família 2

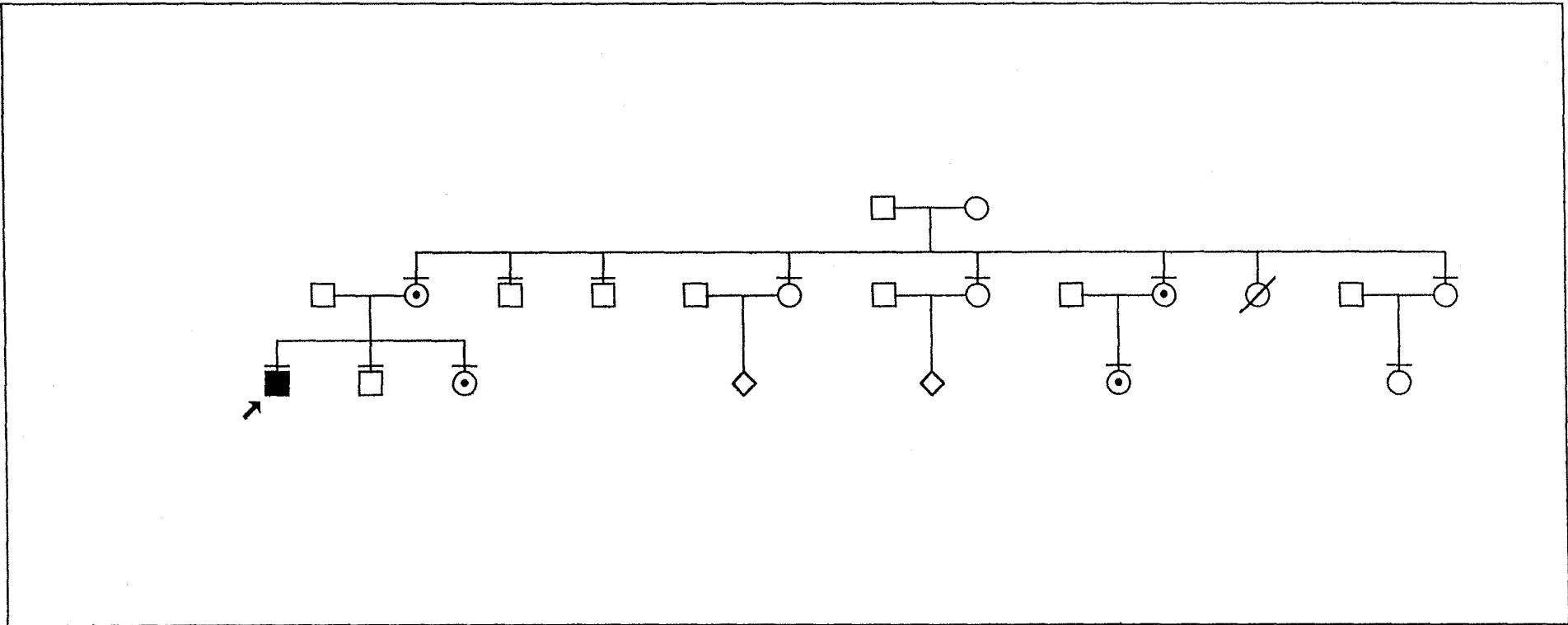


Figura 5: família 3

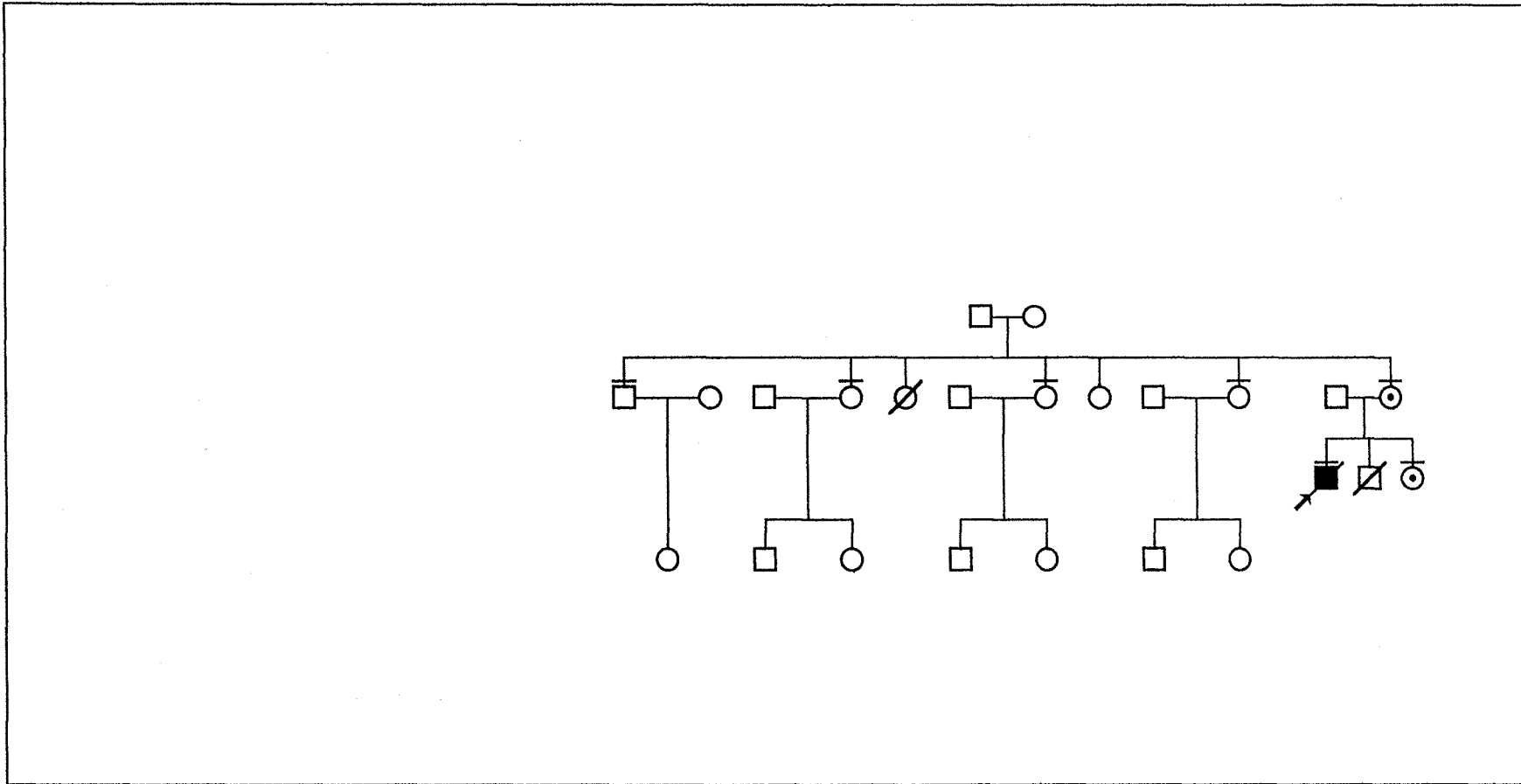


Figura 6: familia 4

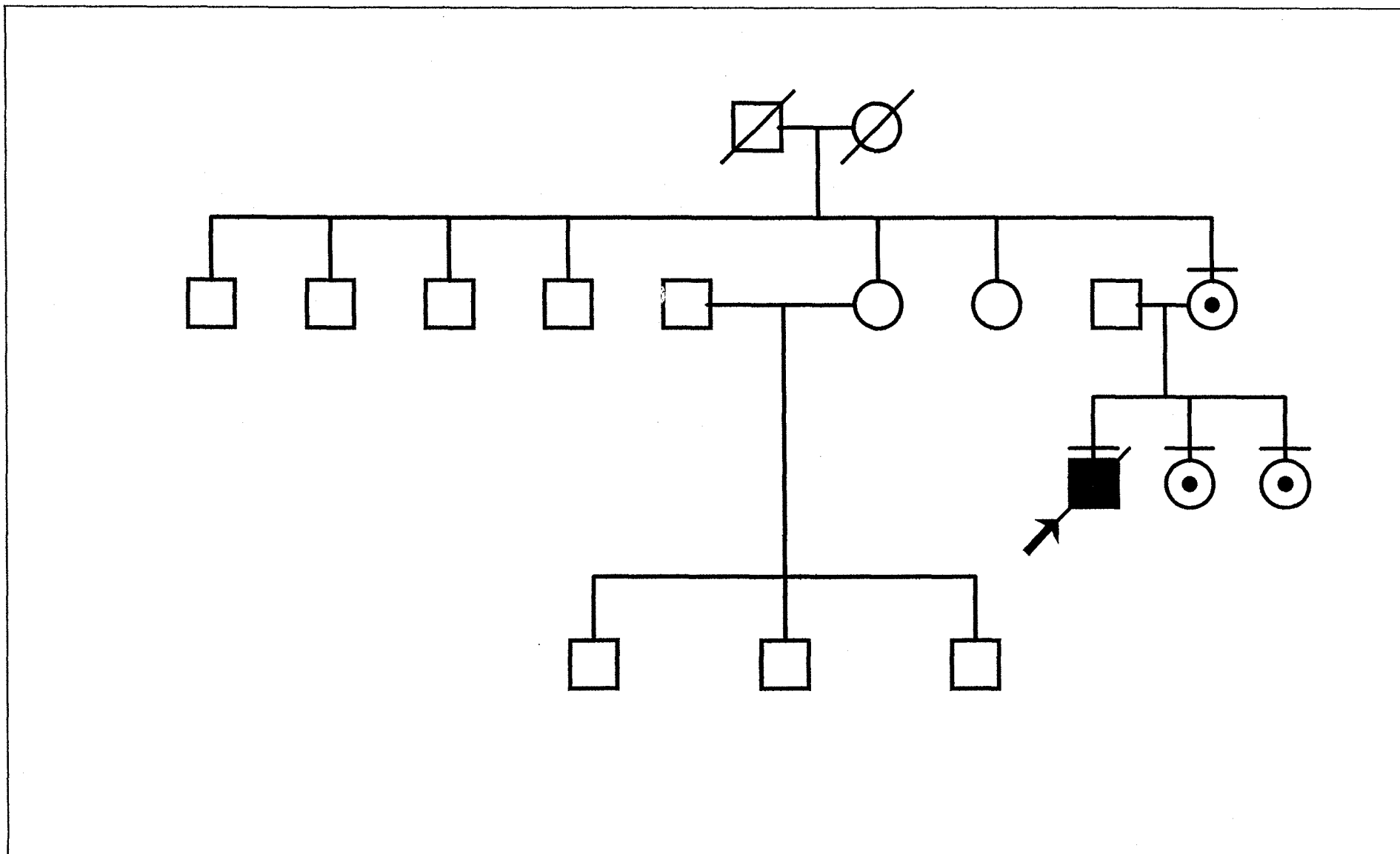


Figura 7: família 5

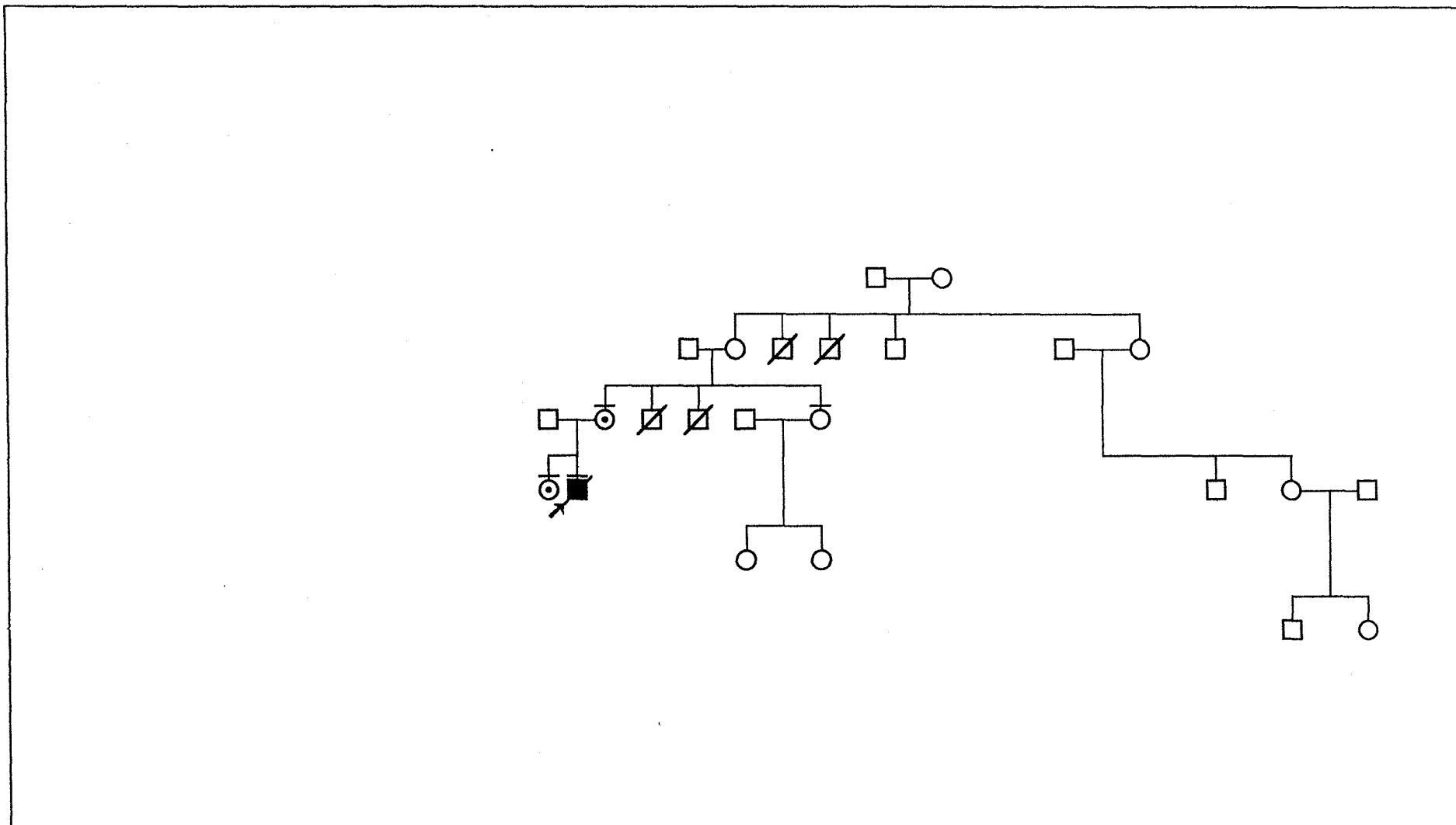


Figura 8: família 6

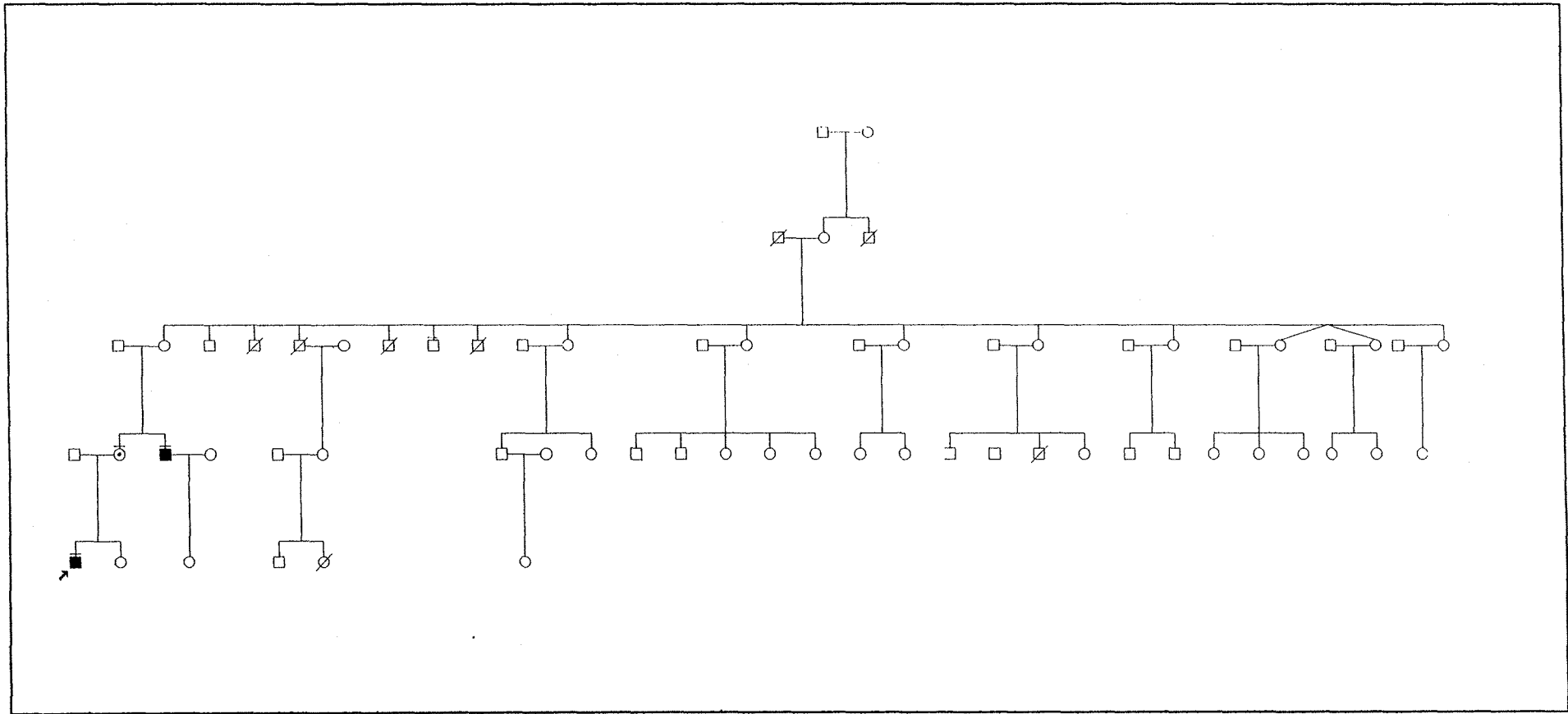




Figura 9: família 7

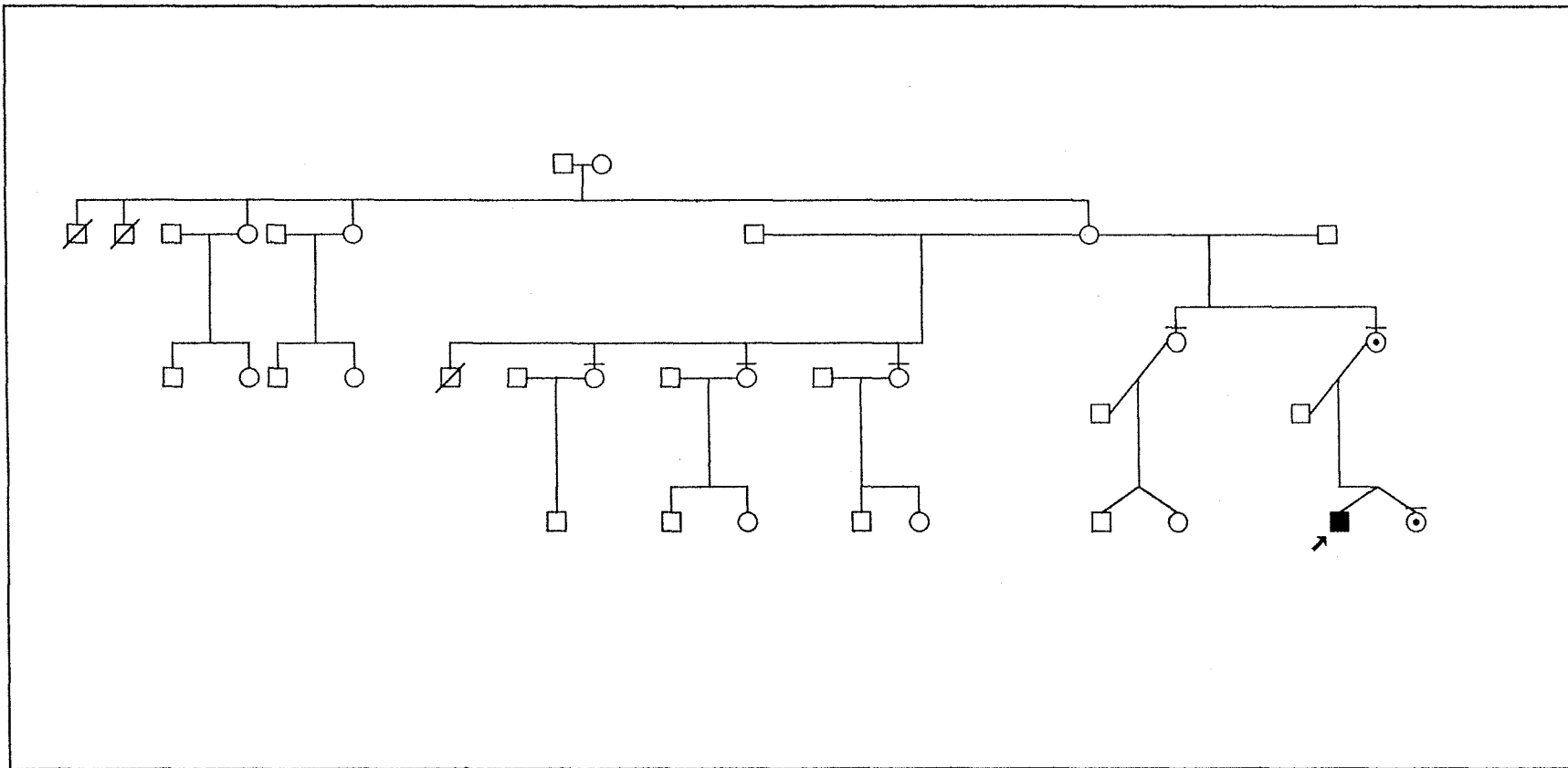


Figura 10: familia 8

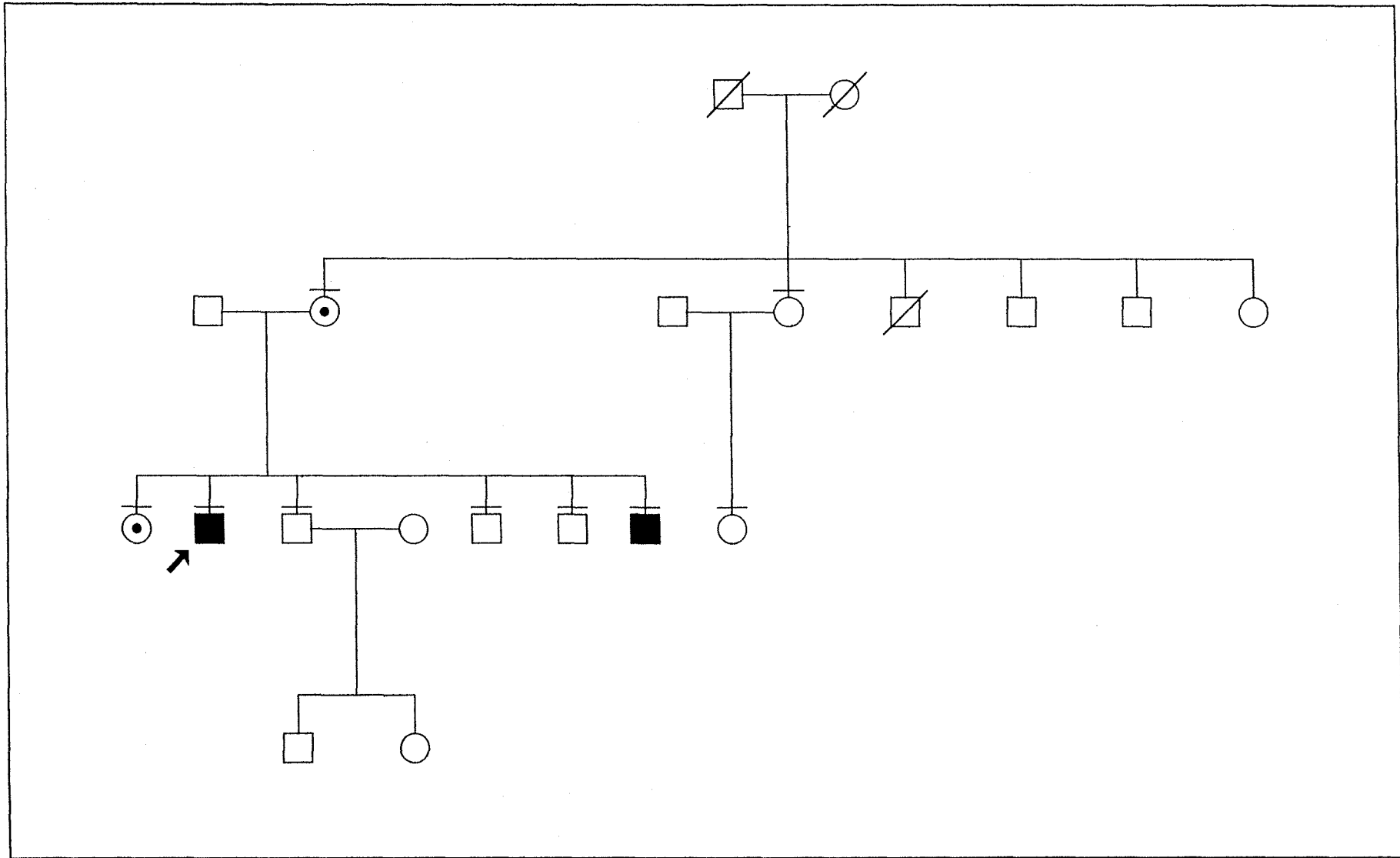


Figura 11: família 9

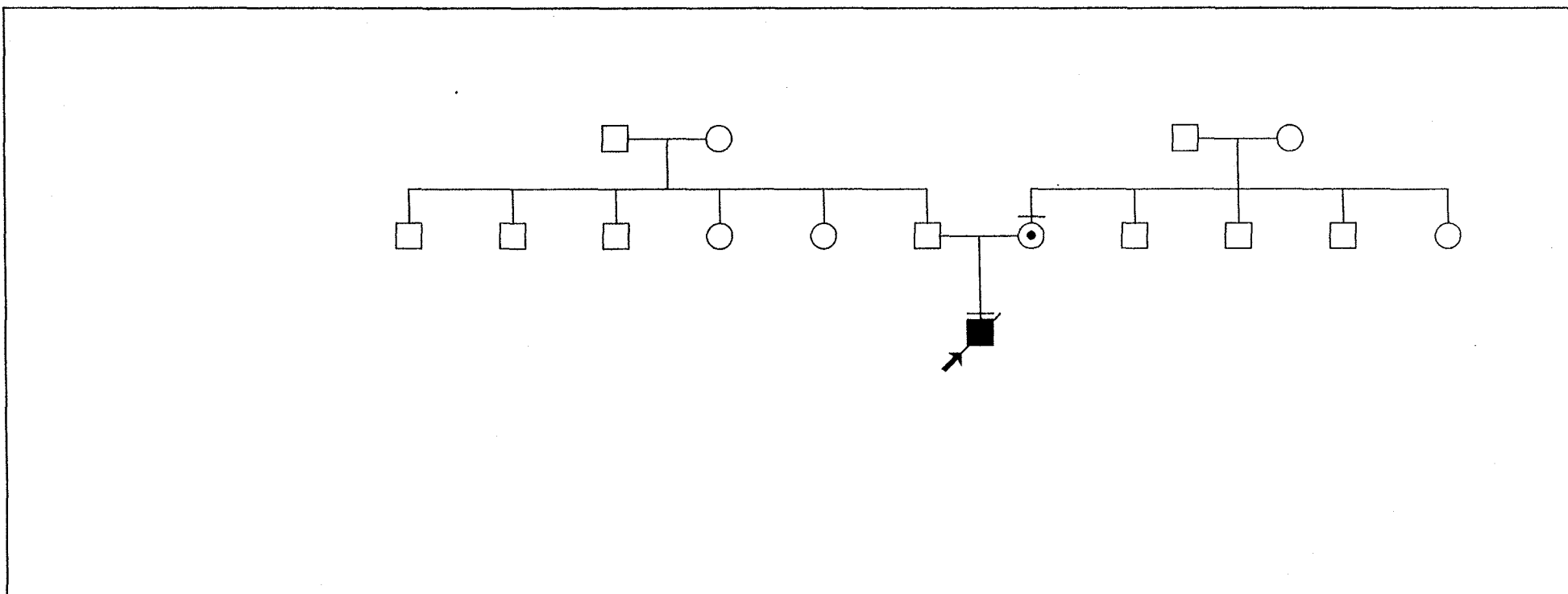


Figura 12: família 10

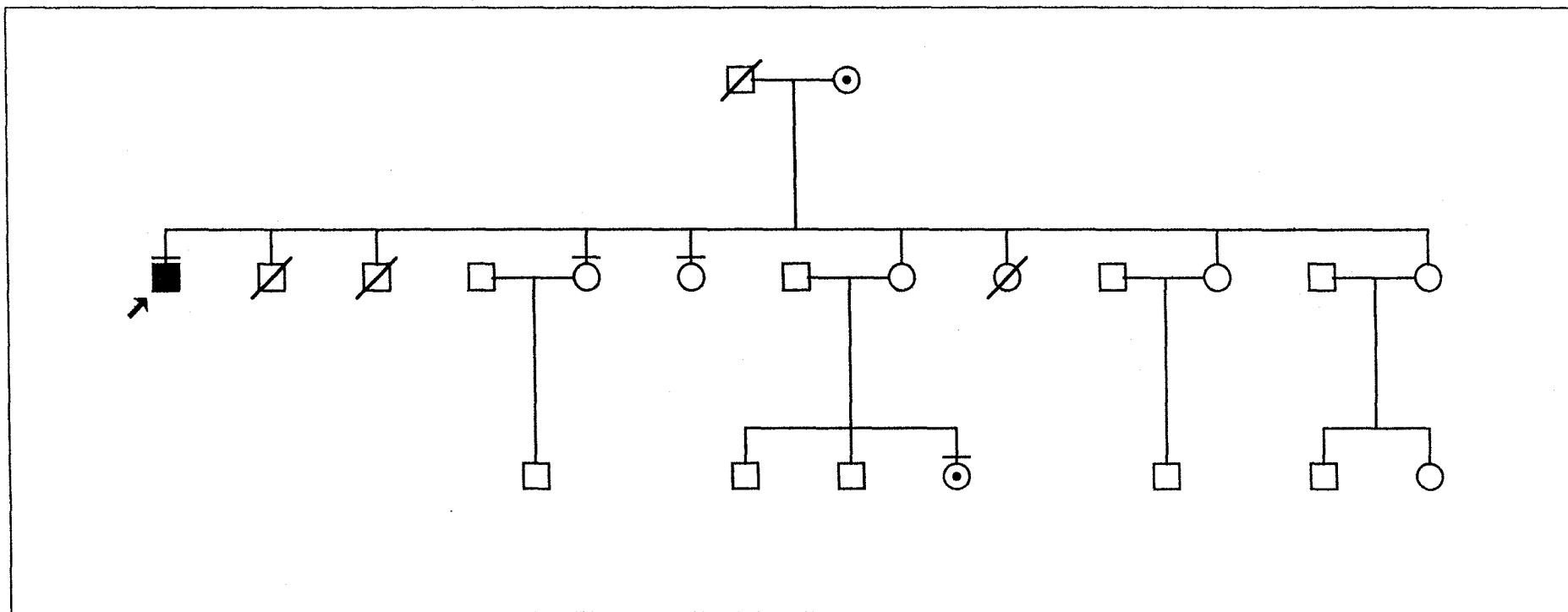


Figura 13: familia 11

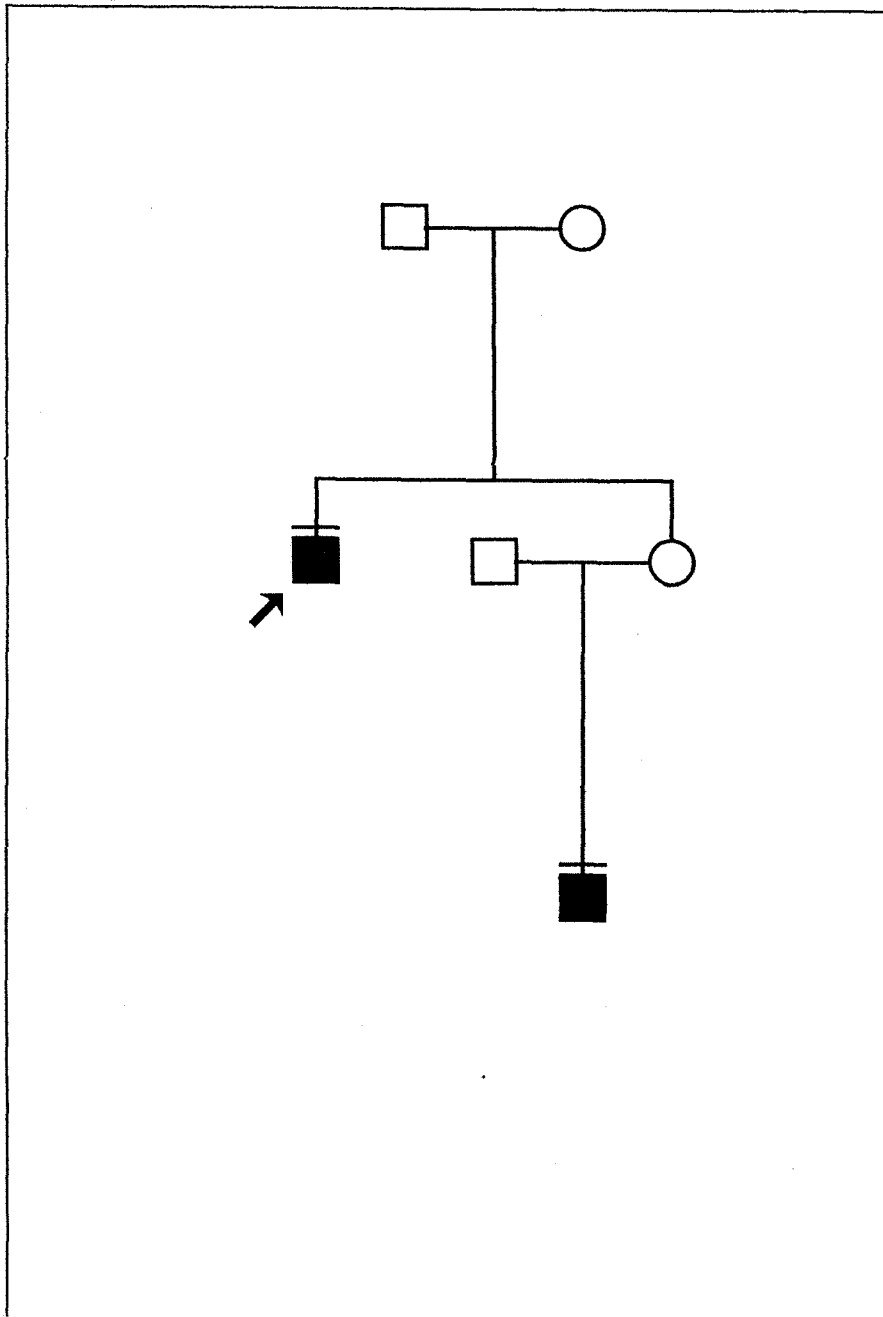


Figura 14: família 12

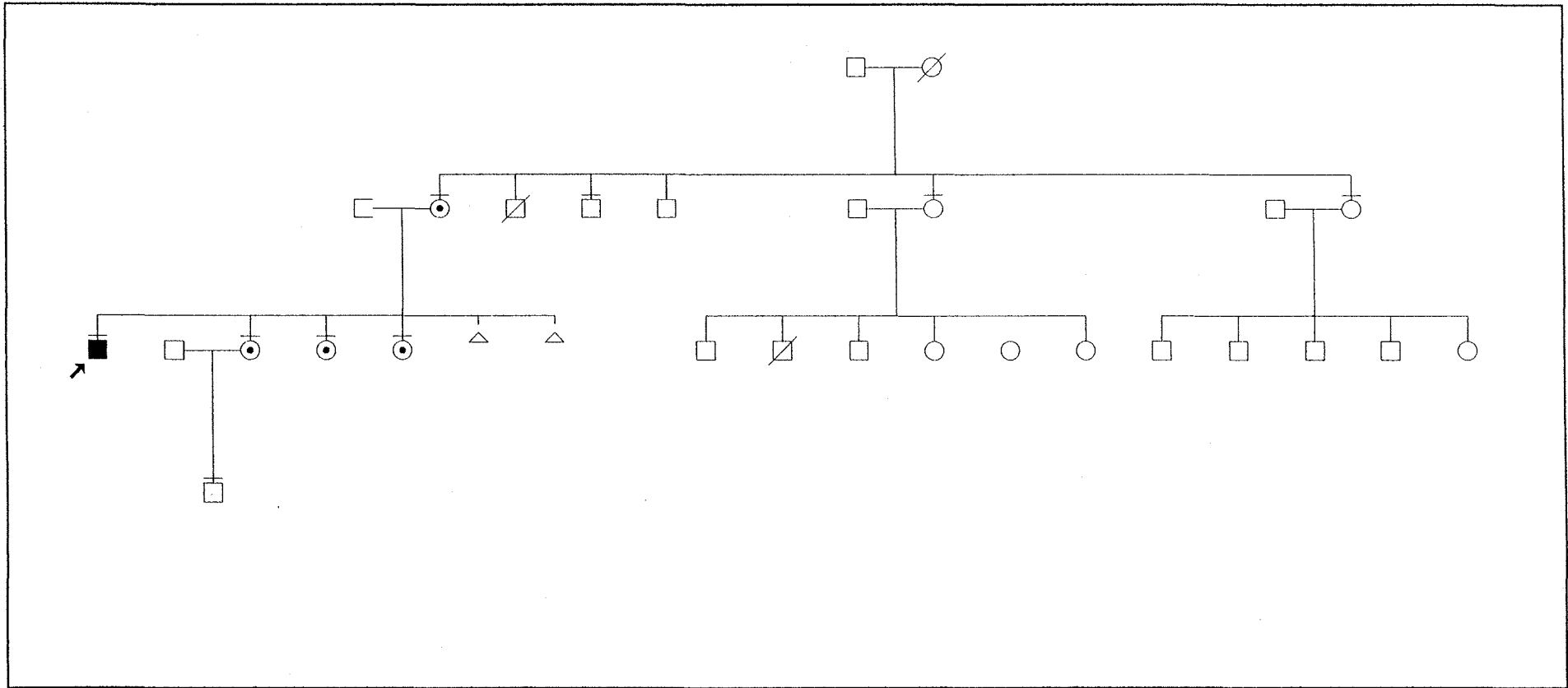
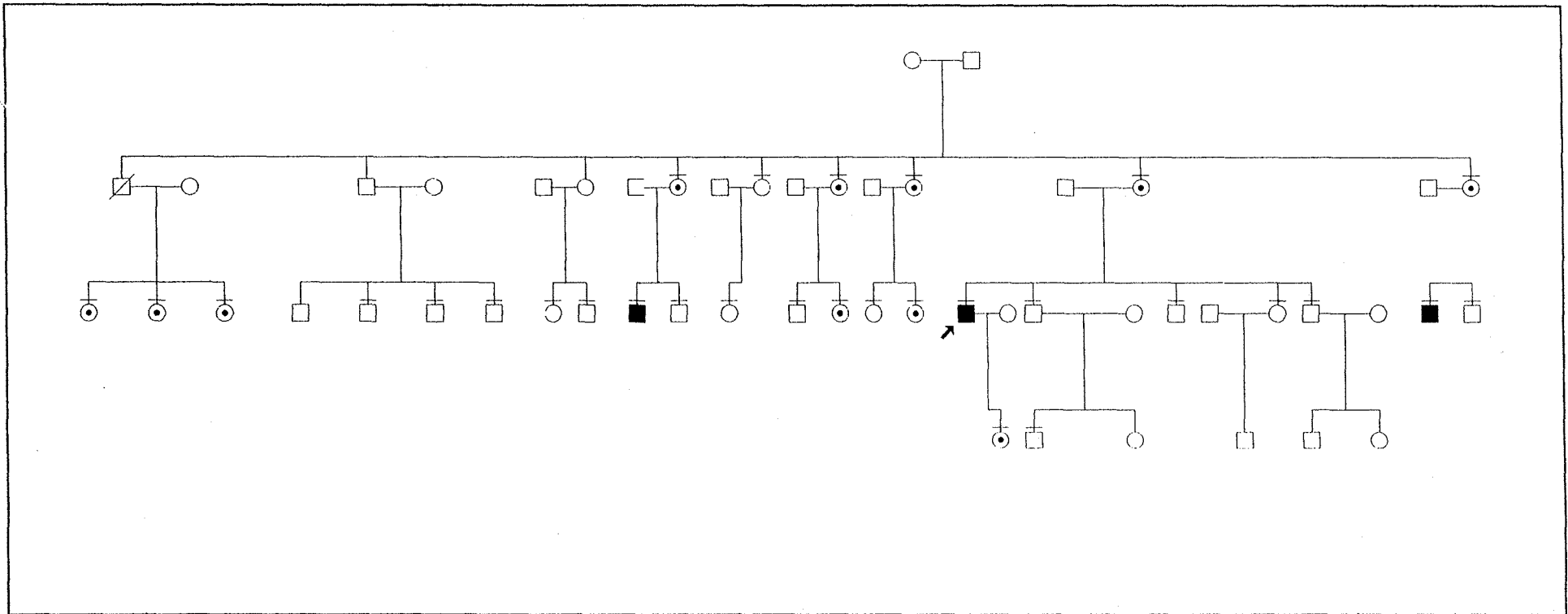


Figura 15: família 13



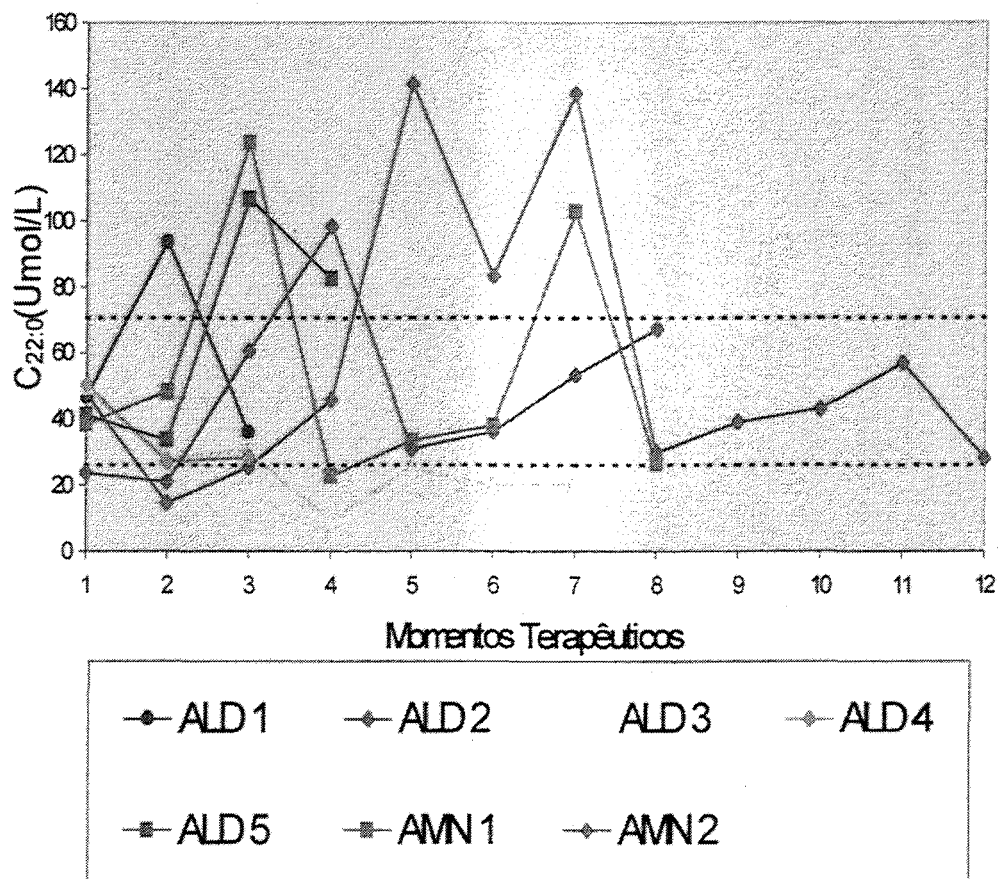


Figura 16: (a) Níveis plasmáticos do ácido docosanoico ( $C_{22:0}$ ) em diferentes momentos da terapia dietética de pacientes com X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade. As linhas contínuas com diferentes simbologias indicam 5 pacientes com ALD e 2 pacientes com AMN.



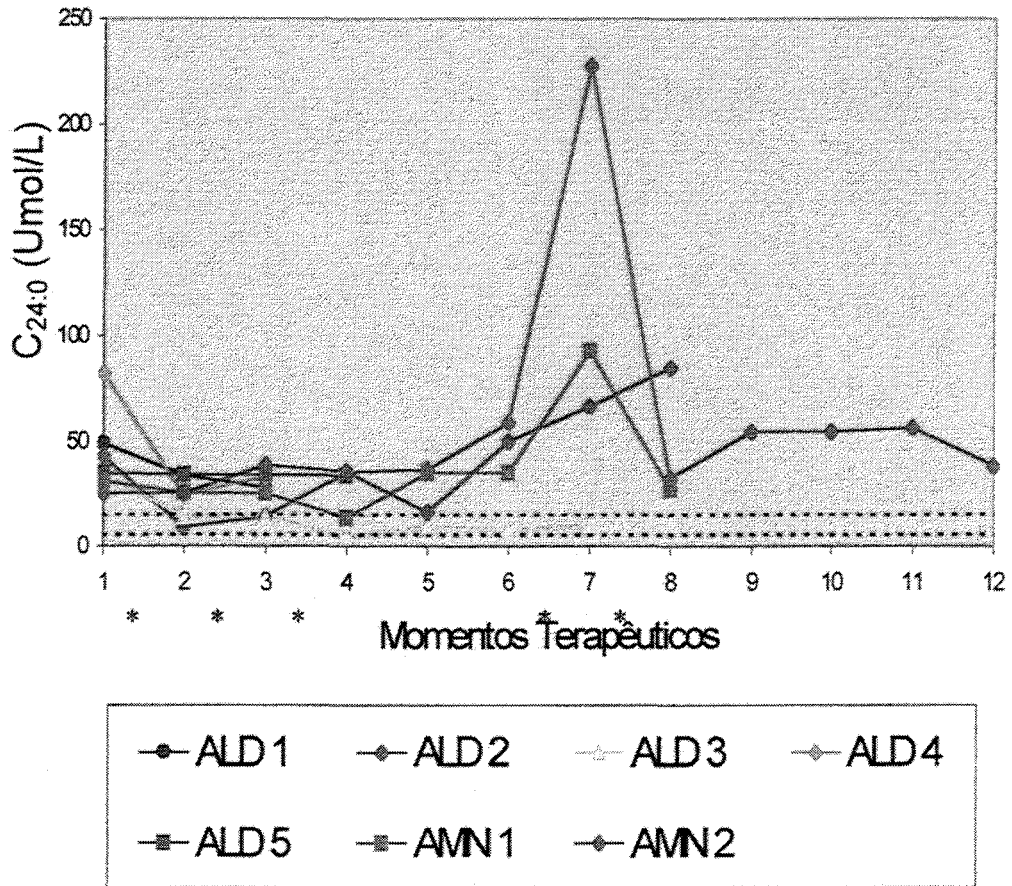
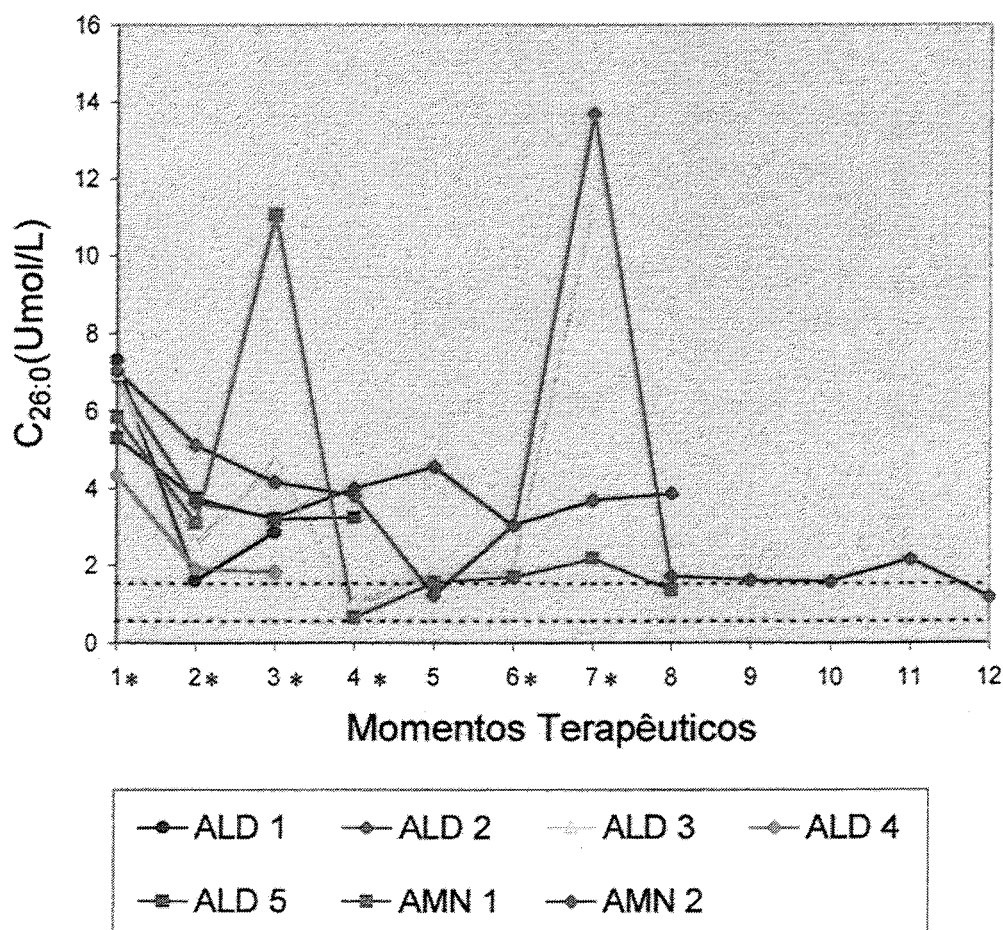


Figura 16: (b) Níveis plasmáticos do ácido tetracosanóico ( $C_{24:0}$ ) em diferentes momentos da terapia dietética de pacientes com X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade. As linhas contínuas com diferentes simbologias indicam 5 pacientes com ALD e 2 pacientes com AMN. \*Concentrações de  $C_{24:0}$  diferem do grupo controle (faixa de normalidade) para  $p < 0,05$  pelo teste de Mann-Whitney-U-Wilcoxon.



**Figura 16:** (c) Níveis plasmáticos do ácido hexacosanóico ( $C_{26:0}$ ) em diferentes momentos da terapia dietética de pacientes com X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade. As linhas contínuas com diferentes simbologias indicam 5 pacientes com ALD e 2 pacientes com AMN. \*Concentrações de  $C_{26:0}$  diferem do grupo controle (faixa de normalidade) para  $p < 0,05$  pelo teste de Mann-Whitney-U-Wilcoxon.

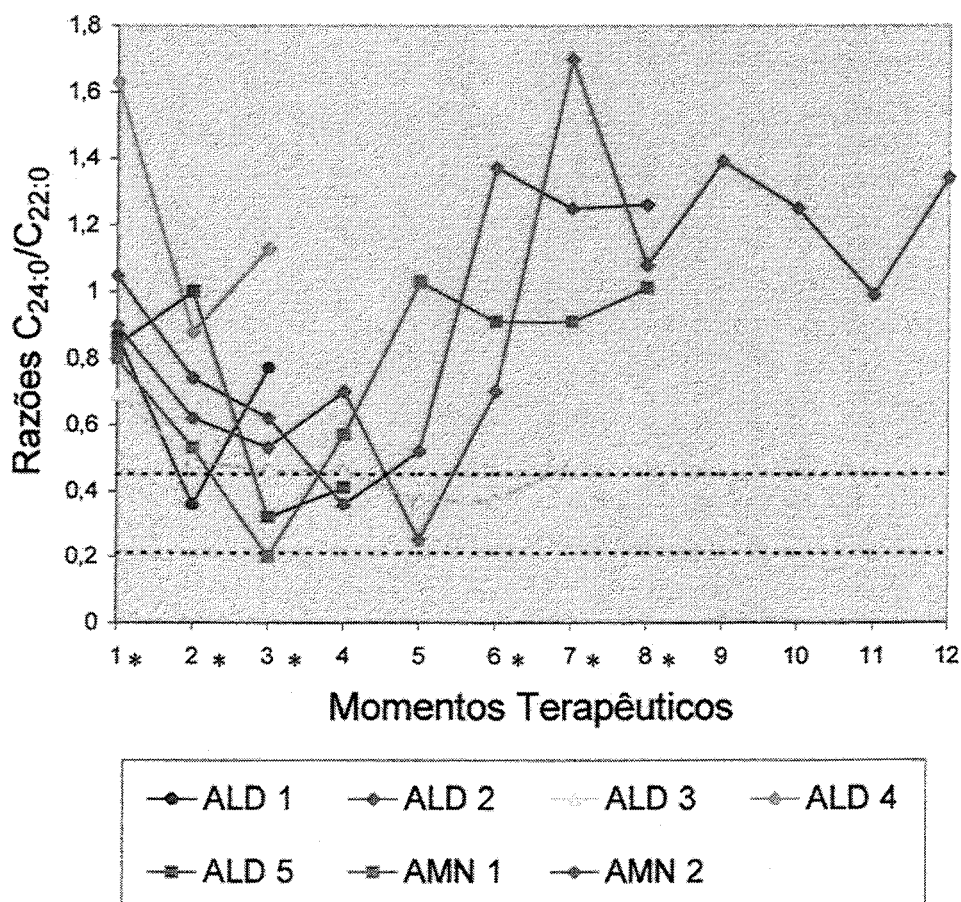


Figura 16: (d) Níveis plasmáticos da razão  $C_{24:0}/C_{22:0}$  em diferentes momentos da terapia dietética de pacientes com X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade. As linhas contínuas com diferentes simbologias indicam 5 pacientes com ALD e 2 pacientes com AMN. \*Razões  $C_{24:0}/C_{22:0}$  diferem do grupo controle (faixa de normalidade) para  $p < 0,05$  pelo teste de Mann-Whitney-U-Wilcoxon.

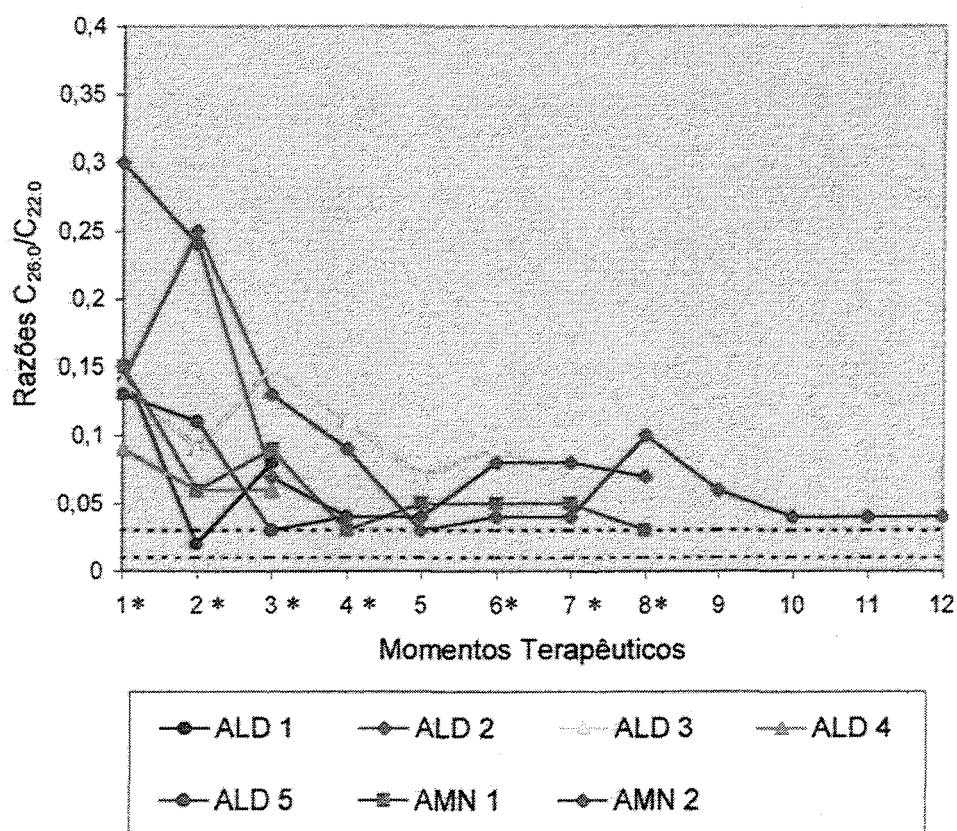


Figura 16: (e) Níveis plasmáticos da razão  $C_{26:0}/C_{22:0}$  em diferentes momentos da terapia dietética de pacientes com X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade. As linhas contínuas com diferentes simbologias indicam 5 pacientes com ALD e 2 pacientes com AMN. \*Razões  $C_{26:0}/C_{22:0}$  diferem do grupo controle (faixa de normalidade) para  $p < 0,05$  pelo teste de Mann-Whitney-U-Wilcoxon.

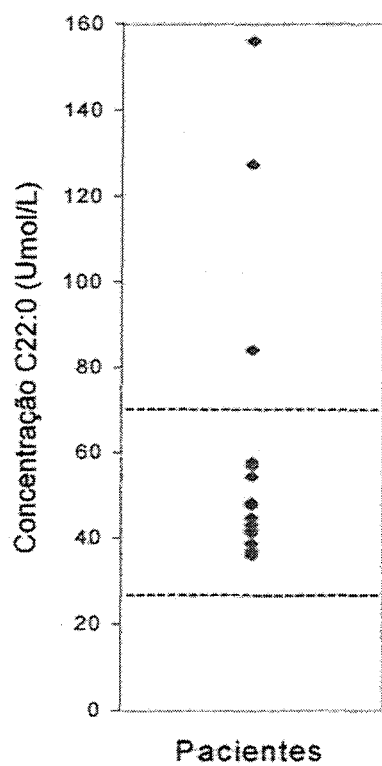


Figura 17: (a) Níveis plasmáticos do ácido docosanoico ( $C_{22:0}$ ) em pacientes com X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade.

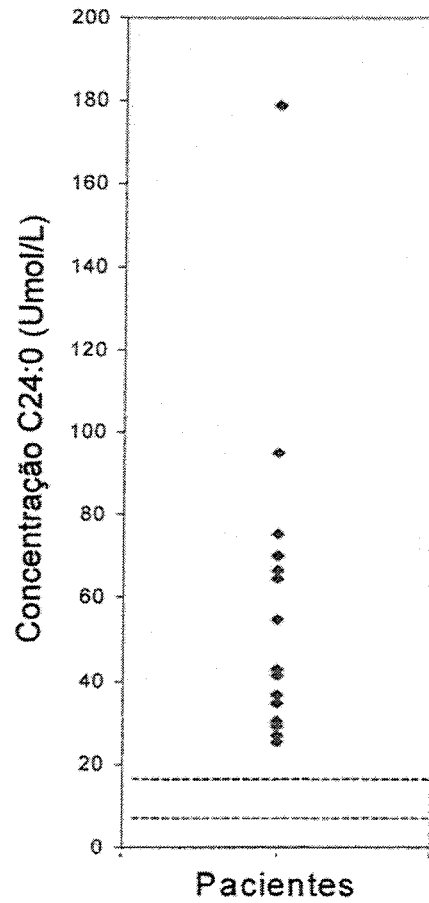


Figura 17: (b) Níveis plasmáticos do ácido tetracosanóico ( $C_{24:0}$ ) em pacientes com X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade.

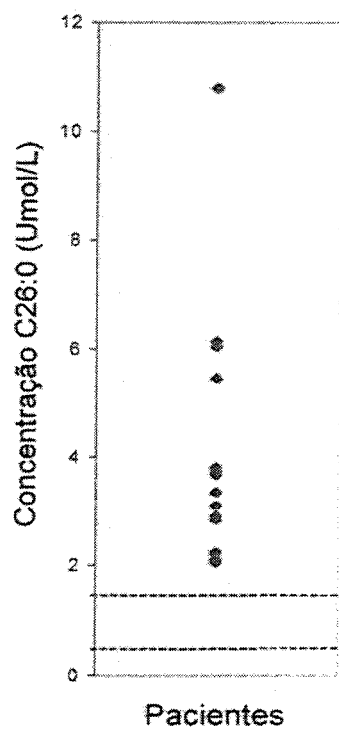


Figura 17: (c) Níveis plasmáticos do ácido hexacosanóico (C<sub>26:0</sub>) em pacientes com X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade.

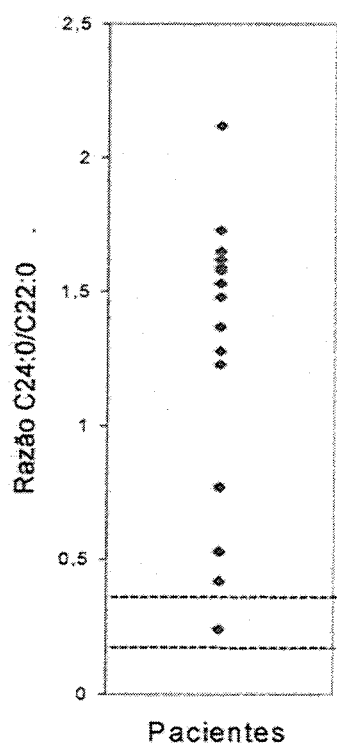


figura 17: (d) Níveis plasmáticos da razão  $C_{24:0}/C_{22:0}$  em pacientes com X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade.



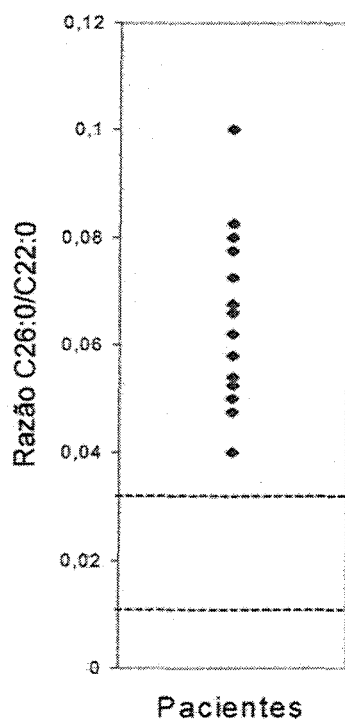


Figura 17: (e) Níveis plasmáticos da razão  $C_{26:0}/C_{22:0}$  em pacientes com X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade.

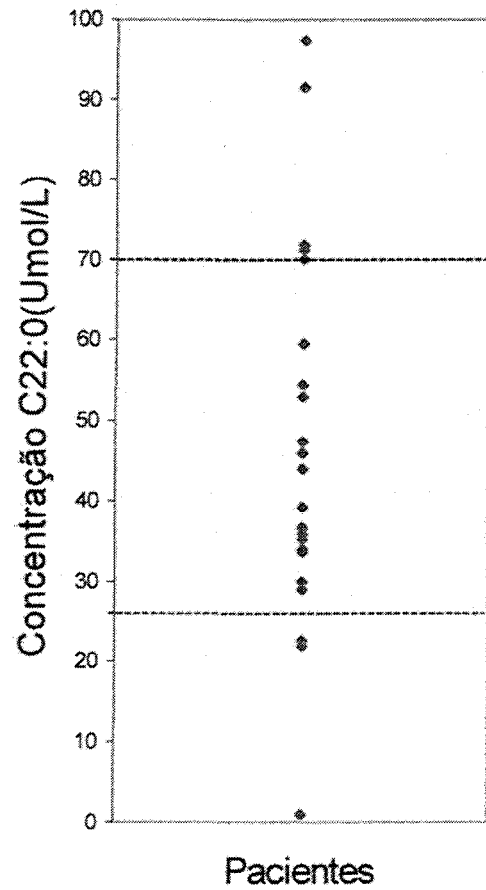


Figura 18: (a) Níveis plasmáticos do ácido docosanoico ( $C_{22:0}$ ) em pacientes com insuficiência adrenal ou tetraparesia/paraparesia sem diagnóstico de X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade.

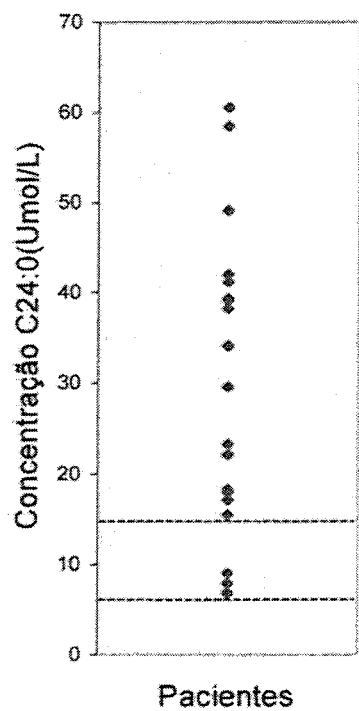


Figura 18: (b) Níveis plasmáticos do ácido tetracosanóico ( $C_{24:0}$ ) em pacientes com insuficiência adrenal ou tetraparesia/paraparesia sem diagnóstico de X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade.

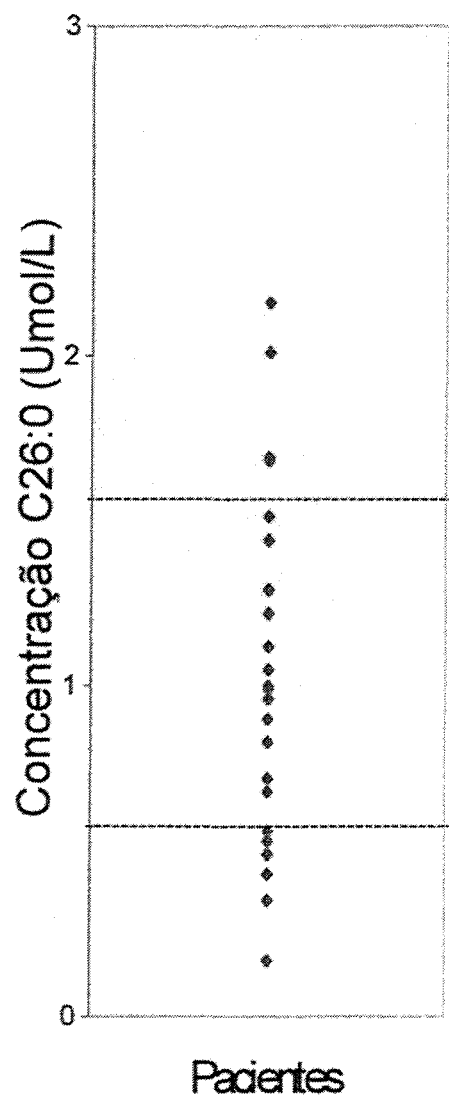


Figura 18: (c) Níveis plasmáticos do ácido hexacosanóico (C<sub>26:0</sub>) em pacientes com insuficiência adrenal ou tetraparesia/paraparesia sem diagnóstico de X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade.

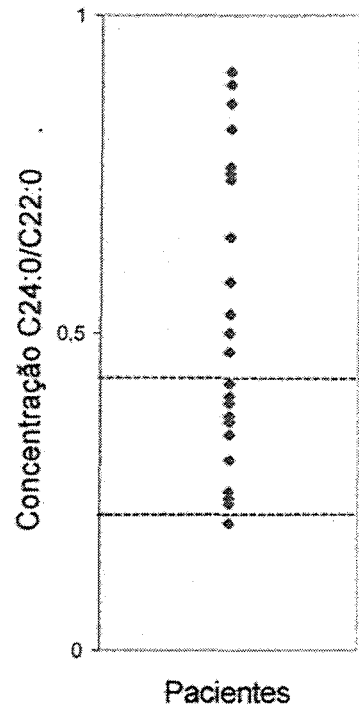


Figura 18: (d) Níveis plasmáticos da razão  $C_{24:0}/C_{22:0}$  em pacientes com insuficiência adrenal ou tetraparesia/paraparesia sem diagnóstico de X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade.

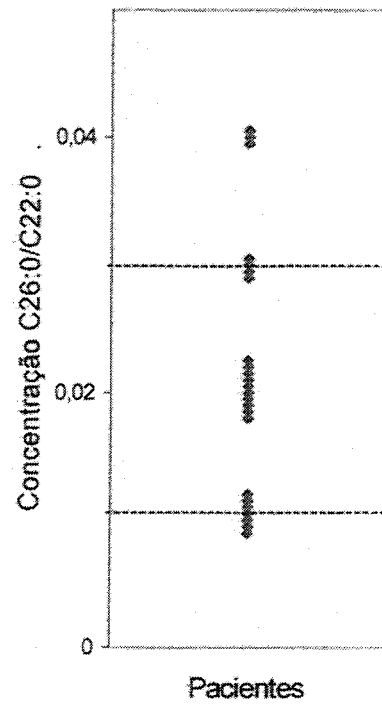


Figura 18: (e) Níveis plasmáticos da razão  $C_{26:0}/C_{22:0}$  em pacientes com insuficiência adrenal ou tetraparesia/paraparesia sem diagnóstico de X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade.

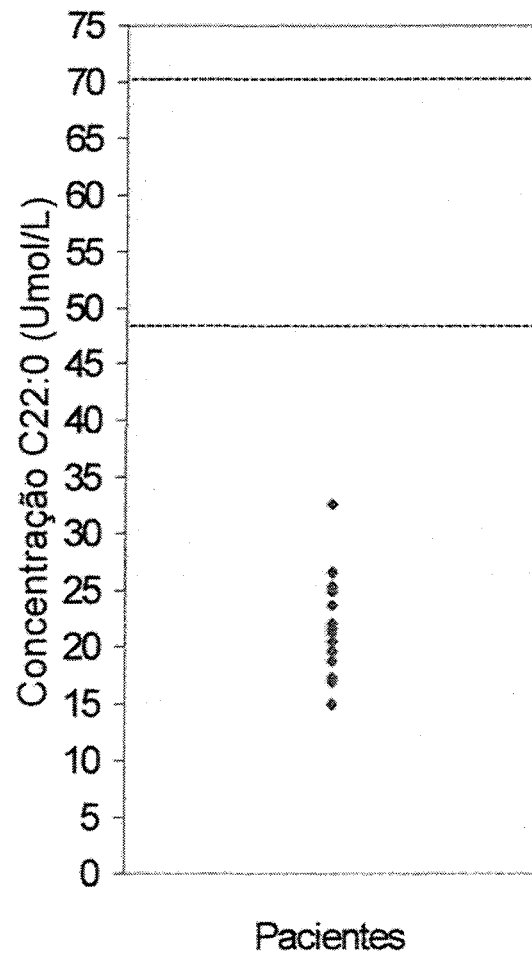


Figura 19:(a) Níveis plasmáticos de C<sub>22:0</sub> em mulheres heterozigotas para X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade.

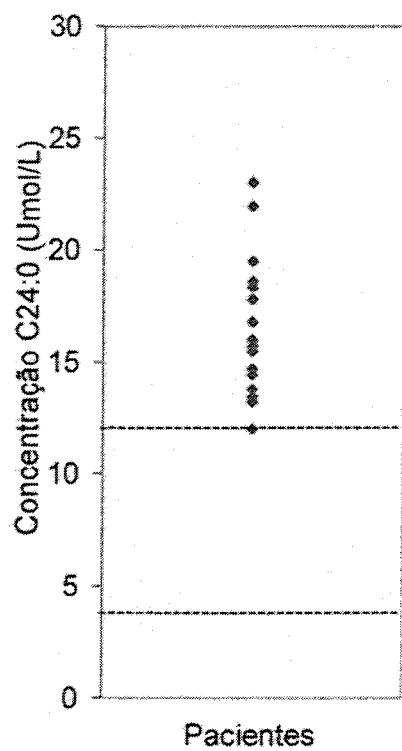


Figura 19:(b) Níveis plasmáticos de C<sub>24:0</sub> em mulheres heterozigotas para X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade.



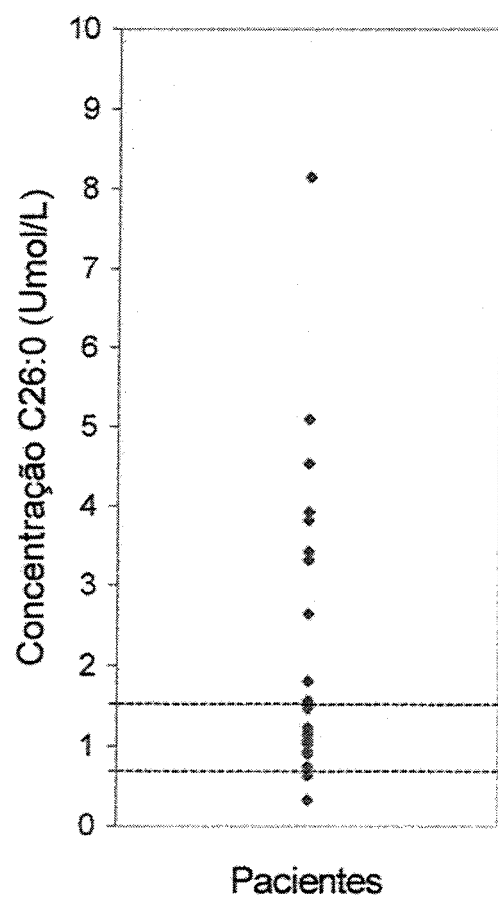


Figura 19:(c) Níveis plasmáticos de C<sub>26:0</sub> em mulheres heterozigotas para X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade.

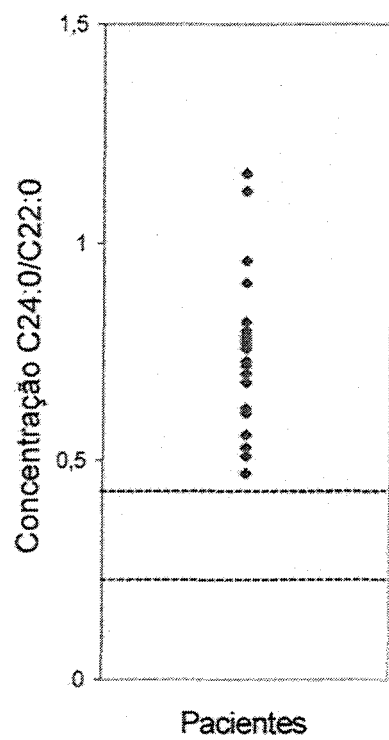


Figura 19:(d) Níveis plasmáticos da razão  $C_{24:0}/C_{22:0}$  em mulheres heterozigotas para X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade.

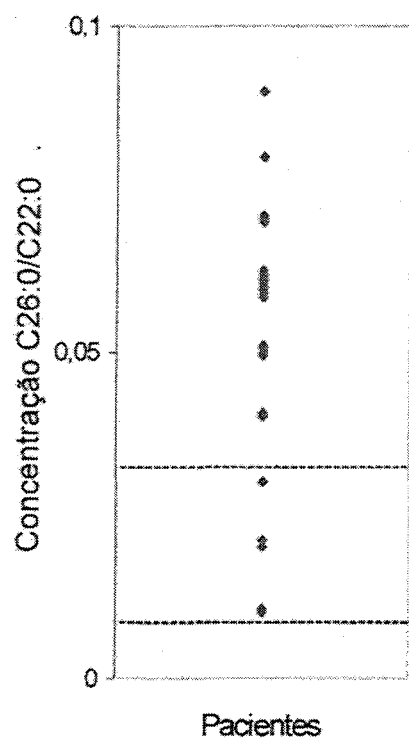


Figura 19:(e) Níveis plasmáticos da razão  $C_{26:0}/C_{22:0}$  em mulheres heterozigotas para X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade.

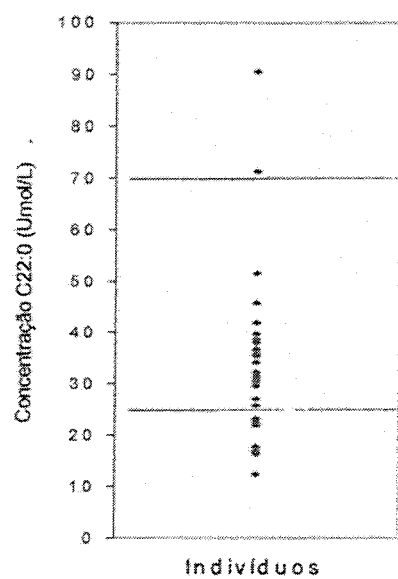


Figura 20: (a) Níveis plasmáticos de  $C_{22:0}$  em familiares não afetados por X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade.

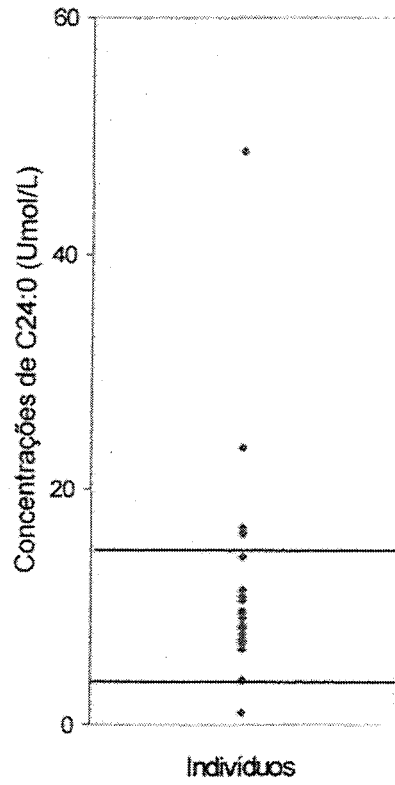


Figura 20: (b) Níveis plasmáticos de  $C_{24:0}$  em familiares não afetados por X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade.

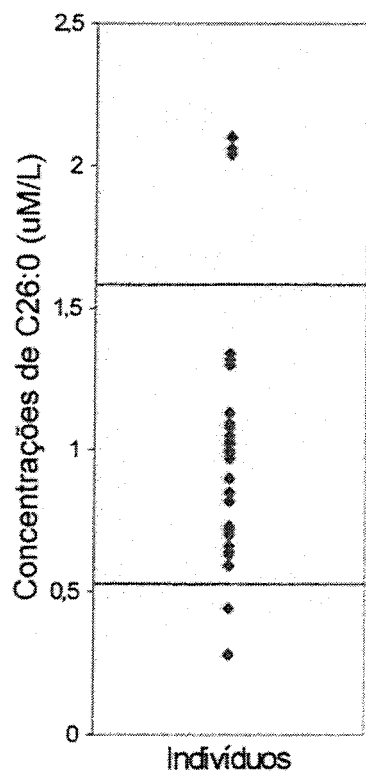


Figura 20: (c) Níveis plasmáticos de  $C_{26:0}$  em familiares não afetados por X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade.

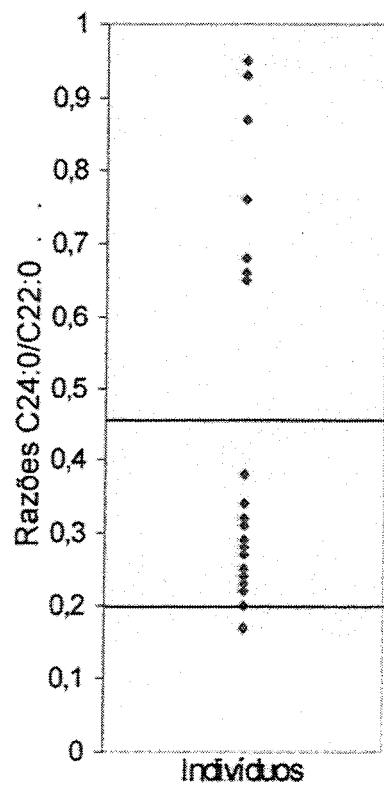


Figura 20: (d) Níveis plasmáticos da razão  $C_{24:0}/C_{22:0}$  em familiares não afetados por X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade .

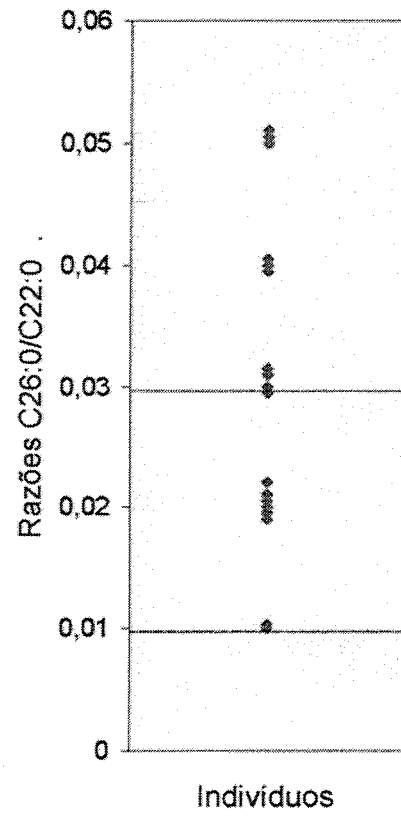


Figura 20: (e) Níveis plasmáticos da razão  $C_{26:0}/C_{22:0}$  em familiares não afetados por X-ALD. As linhas tracejadas indicam a faixa de normalidade.



## 6. DISCUSSÃO

Dados da literatura obtidos em países desenvolvidos referem que aproximadamente 40% dos pacientes do sexo masculino com insuficiência adrenal tem o defeito bioquímico da X-ALD, que seria a causa mais freqüente desta condição em homens. A grande maioria dos pacientes diagnosticados com insuficiência adrenal idiopática apresentam X-ALD (LAURETTIE *et al*, 1996). A insuficiência adrenocortical na X-ALD parece ser diretamente causada pelo acúmulo de VLCFA (SENECA AND LISSENS, 1995). Em nossa amostra, 57% dos pacientes do sexo masculino com insuficiência adrenal apresentaram o defeito bioquímico da X-ALD, o que mostra ser este sinal um importante alerta para a suspeita de X-ALD em homens.

Não encontramos na literatura dados sobre a freqüência de X-ALD em indivíduos do sexo masculino com tetraparesia ou paraparesia, embora deva ser registrado que muitos indivíduos com X-ALD sejam diagnosticados erroneamente como afetados por esclerose múltipla. Em nosso estudo verificamos que 16% dos pacientes que apresentavam tetraparesia/paraparesia sem fator etiológico definido eram, na verdade, portadores de AMN. Essa freqüência ressalta, também, a importância de se suspeitar desta forma de X-ALD (AMN) quando da presença deste sintoma neurológico em homens, nos quais já foram excluídas outras causas. A detecção de portadores sintomáticos pode levar à descoberta de novos casos, ainda assintomáticos, os quais poderão se beneficiar do tratamento. É bem sabido que o tratamento com GTO/GTE deve idealmente ser iniciado antes que os primeiros sintomas neurológicos se desenvolvam (KORENKE *et al*, 1995).

MOSER (1995b), ao estudar 53 pacientes com X-ALD, obteve resultados que sugerem que a terapia com Óleo de Lorenzo pode reduzir a frequência e a severidade do envolvimento neurológico em pacientes com o defeito bioquímico da X-ALD tratados antes do aparecimento dos sintomas neurológicos. Os resultados encontrados por KORENKE e col. (1995) e MOSER e col. (1995b) sugerem que o tratamento com Óleo de Lorenzo é muito mais efetivo quando iniciado precocemente e uma vez que os sintomas tenham progredido significativamente o tratamento com GTO/GTE pode ser de pouca ajuda. Mesmo se houver apenas um retardamento da deterioração neurológica ou a prevenção da deterioração intelectual, a qual também pode afetar pacientes AMN, considera-se isto como uma vantagem. Drogas novas como a lovastatina ainda não foram testadas neste sentido, mas se mostram promissoras.

Os familiares com AMN estudados neste trabalho foram aparentemente beneficiados pelo tratamento com Óleo de Lorenzo, tendo o curso clínico da doença nestes pacientes se mostrado mais ameno, embora esta observação não tenha sido testada do ponto de vista estatístico.

Nas 13 famílias por nós investigadas foram encontradas 35 (56%) mulheres portadoras, entre 63 mulheres em risco estudadas. Este alto percentual de heterozigotas chamou a atenção no sentido da importância de se investigar familiares de X-ALD, uma vez que estas mulheres podem ser beneficiadas pelo aconselhamento genético e/ou pelo diagnóstico pré-natal. O risco destas mulheres transmitirem o gene mutado para os filhos é de 50%, sendo muito alta a chance dos filhos homens que receberem o gene apresentarem alguma forma de X-ALD. A chance para as filhas mulheres é menor, mas também existe. As mulheres que desenvolvem manifestações

clínicas da doença poderiam eventualmente se beneficiar de tratamento. O diagnóstico pré-natal pode ser feito pela análise dos VLCFA ou pela análise molecular em vilosidades coriônicas ou células cultivadas do líquido amniótico (WANDERS *et al*, 1990; WANDERS *et al*, 1988). É importante examinar todos os familiares quando um caso de ALD e/ou AMN é diagnosticado, não só pela possibilidade de tratar com Óleo de Lorenzo ou outros meios, mas também porque todos os casos de ALD e AMN estão sob o risco de desenvolver insuficiência adrenal, um problema potencialmente grave e que responde bem ao tratamento.

Em algumas das 13 famílias estudadas foi possível investigar um grande número de indivíduos (29 na maior delas). Em muitas houve dificuldade de se obter dados de um maior número de familiares ou mesmo amostras de plasma, uma vez que as distâncias geográficas em nosso país são grandes. Muitas vezes ocorreu resistência dos familiares para participar do projeto de pesquisa. Cabe lembrar que as várias formas clínicas da X-ALD podem ocorrer na mesma família, podendo casos de insuficiência adrenal isolada ou tetraparesia servirem como indicadores da presença do gene, possibilitando a prevenção da ocorrência de formas mais graves. Há necessidade, também, de se identificar famílias grandes com X-ALD, com vistas à melhor avaliação da expressão fenotípica do gene, estudo este que é mais viável em países como o Brasil onde o tamanho familiar é usualmente maior do que nos países desenvolvidos. Em 4 das 13 famílias estudadas foram detectados casos das duas formas clínicas mais comuns: ALD infantil e AMN. Em quase todas estas famílias (12) foram encontradas heterozigotas, em números variados.

A tabela 10 mostra a freqüência dos fenótipos encontrados em grupos estudados em diferentes populações.

**Tabela 10** - Frequência dos fenótipos de X-ALD em diversos estudos.

	N=185 <sup>1</sup>	N=1475 <sup>2</sup>	N=77 <sup>3</sup>
Fenótipo	(%)	(%)	(%)
<sup>a</sup> CALD/adol	57	53	31
<sup>b</sup> AALD	3	3	1
AMN	28	25	46
Addison	8	10	14
Assintomáticos	4	8	8

<sup>a</sup> Adrenoleucodistrofia cerebral da criança e adolescente.

<sup>b</sup> Adrenoleucodistrofia cerebral adulta.

<sup>1</sup> Aubourg, 1991

<sup>2</sup> Moser, 1992

<sup>3</sup> van Geel, 1994

Pode-se observar que a ALD cerebral infantil é a mais freqüente em 2 dos 3 grupos estudados. Um estudo realizado na Holanda demonstrou ser a AMN o fenótipo mais comumente encontrado naquele país (VAN GEEL *et al*, 1994). Em 77 pacientes estudados, 31% apresentavam a forma cerebral enquanto 46% apresentavam AMN. Esta diferença de freqüências pode estar relacionada à diferentes densidades populacionais, assim como à diferenças particulares no sistema de saúde.

Diferentes fenótipos podem ser observados numa mesma família. SOBUE *et al* (1994) relataram heterogeneidade fenotípica em dois gêmeos monozigóticos apresentando ALD na fase adulta. Embora os dois pacientes tenham desenvolvido a doença um deles apresentou os primeiros sintomas pelo menos 6 anos antes, indicando que outros fatores também podem influenciar o momento do aparecimento dos primeiros sintomas. KORENKE *et al* (1996) relataram o caso de dois gêmeos

monozióticos onde apenas um dos indivíduos desenvolveu a forma cerebral infantil, sendo que o outro gêmeo não apresentava qualquer alteração neurológica nos exames por ressonância magnética. Este estudo indicou a possibilidade de haver algum tipo de envolvimento do genoma mitocondrial, uma vez que observou-se a existência de uma mutação pontual heteroplasmática no DNA mitocondrial da mãe deste indivíduos. Estudos até então realizados indicam não haver qualquer associação entre as diferentes formas desta doença e a origem étnica (CHEMKE *et al.*, 1984).

A existência de diversos fenótipos dentro de uma mesma família indica a possibilidade de haver outros mecanismos responsáveis pelo quadro clínico observado em diferentes pacientes. Além de fatores ambientais, tais como dieta, um destes mecanismos pode estar relacionado a presença de outros fatores genéticos que não mutações específicas no *locus* da X-ALD. Alguns autores acreditam na existência de um gene modificador autossômico (SMITH *et al.*, 1991) que seria responsável pela existência dos diferentes fenótipos observados na X-ALD. A aplicação de modelos matemáticos indica que a heterogeneidade fenotípica observada na X-ALD pode estar associada à influência de um outro *locus* (MAESTRI e BEASTRI, 1992). Deste modo, dependendo do alelo presente neste *locus* autossômico o paciente desenvolveria uma determinada forma de X-ALD. É importante notar que este gene modificador não seria responsável pela ocorrência da doença podendo ser encontrado em indivíduos normais. O fenótipo final do indivíduo, segundo esta teoria, seria uma combinação entre a mutação encontrada no gene ALD e os alelos presentes neste suposto gene autossômico modificador.

Não parece haver qualquer relação entre o tipo de mutação encontrada no *locus* ALD e o fenótipo observado, podendo-se encontrar todos os fenótipos

associados a uma mesma mutação em diferentes indivíduos. Em um estudo realizado em 231 famílias afetadas por alguma forma de X-ALD, Moser e col.(1992) encontraram ALD infantil em 43 famílias, AMN em 27 e doença de Addison em 9. Em 152 famílias (66%) foram encontrados indivíduos com fenótipos discordantes sugerindo que a variabilidade observada poderia estar associada a um *locus* autossômico. Alguns estudos sugerem que a proteína ALD possa estar associada com outras proteínas da mesma família, formando heterodímeros. No entanto, é importante observar que se há de fato outro *locus* associado à forma clínica observada, este não é por si só causador da doença, uma vez que todas as famílias acometidas apresentam um padrão de herança ligado ao cromossomo X e que a grande maioria dos indivíduos até hoje analisados apresentam mutações no *locus* da X-ALD.

Nas 13 famílias estudadas encontramos 35 mulheres portadoras, representando 56,0% dos familiares do sexo feminino, sendo que apenas uma apresentava sintomatologia (neuropatia periférica). Sabe-se que 20 à 30 % das mulheres heterozigotas desenvolvem sintomas neurológicos que se assemelham à AMN (paraparesia espástica progressiva, perda da sensibilidade à vibração e neuropatia periférica que podem aparecer na terceira ou quarta décadas de vida), podendo haver variação individual de acordo com o padrão de inativação do cromossomo X (MOSER *et al*, 1995a). Já a insuficiência adrenal isolada raramente se desenvolve em heterozigotas para X-ALD (EL-DEIRY *et al*, 1997). As familiares não foram testadas, neste estudo, para insuficiência adrenal. O achado de que 56% das mulheres familiares de nossos pacientes com X-ALD são portadoras do gene mutado para X-ALD indica a importância do problema, levando em conta o risco de

50% de transmissão do gene para os descendentes. Nas famílias estudadas neste trabalho foram encontradas 35 mulheres portadoras do gene para X-ALD com o seguinte grau de parentesco com afetados por X-ALD: 12 mães, 10 irmãs, 5 tias, 6 primas-irmãs, 1 filha e 1 sobrinha de pacientes com AMN. Este trabalho de detecção de portador é importante, não só para o eventual tratamento das mulheres sintomáticas como para a prevenção de novos casos de X-ALD, que pode ser feita através do aconselhamento genético, eventualmente acompanhado de diagnóstico pré-natal.

Atualmente, a detecção de heterozigotas é possível através da análise de VLCFA no soro ou em fibroblastos, ou pela análise de DNA. Segundo MOSER (1997), 80% das heterozigotas obrigatórias mostram níveis de VLCFA no plasma anormais. Nas 20% restantes os níveis são normais, provavelmente devido à inativação preferencial do cromossomo X que carrega o alelo mutado. A porcentagem de detecção laboratorial é mais alta (95%) se os VLCFA forem dosados em fibroblastos, o que parece ser um método mais adequado. A detecção de portadores tem sido realizada através de medições de VLCFA combinada com estudos de ligação entre o DXS52 e o *locus* ALD (MOSER, comunicação pessoal). O *locus* DXS52 é altamente polimórfico sendo informativo em aproximadamente 90% das famílias. No entanto, com o isolamento do gene ALD o diagnóstico molecular das possíveis heterozigotas pode ser realizado através da análise do próprio gene, permitindo, desse modo, um diagnóstico preciso em 100% dos casos.

KORENKE e col. (1995) estudaram 16 pacientes com X-ALD, sendo 6 ALD, 3 AMN, 2 com Doença de Addison sem envolvimento neurológico e 5 pacientes assintomáticos. Os primeiros sintomas apareceram com 10 anos nos

pacientes ALD e com 20 anos nos pacientes AMN, sendo o intervalo entre os sintomas neurológicos e o início da terapia (supostamente também do diagnóstico) de 1,8 e 6 anos, respectivamente. Todos os 16 pacientes foram tratados com a mistura GTO/GTE, sendo que 3 (18,8%) foram a óbito no primeiro ano de tratamento. Os 7 pacientes sem sintomatologia neurológica permaneceram clinicamente bem durante todo o curso da terapia. Dos 3 pacientes ALD e dos 3 AMN restantes 3 pioraram clinicamente e 3 permaneceram estáveis. Nos pacientes ALD e AMN os sintomas neurológicos iniciais eram leves a moderados: mudanças de comportamento e convulsões para ALD e dificuldade de caminhar para AMN.

Os pacientes ALD por nós estudados foram diagnosticados em média com cerca de 10 anos, sendo que os primeiros sintomas foram observados com 7,6 anos. O intervalo entre o início dos sintomas e o diagnóstico foi, portanto, de 2,4 anos. Nos pacientes AMN a idade de diagnóstico foi em média de 29 anos e a idade de início dos sintomas de 22 anos, com um intervalo médio de 7 anos. O intervalo entre o aparecimento dos sintomas e o início da terapia foi de 2 anos para ALD e 7 anos para AMN.

Dezesseis dos 17 pacientes de nosso estudo foram diagnosticados somente quando sintomas neurológicos graves e evidentes já estavam presentes. Na nossa amostra tanto a idade de diagnóstico quanto os intervalos de tempo entre os primeiros sintomas e o diagnóstico e entre os primeiros sintomas e o início da terapia foram maiores do que os referidos por KORENKE e col(1995). É bem sabido que a resposta ao tratamento depende da precocidade do diagnóstico e da ausência de sintomas neurológicos. A demora no diagnóstico destes pacientes pode ser atribuída à falta de conhecimento sobre a X-ALD por parte da maioria dos médicos, já que a



insuficiência adrenal apresentada pelos pacientes é freqüentemente diagnosticada como Doença de Addison e os pacientes não são rotineiramente investigados para o acúmulo dos VLCFA, talvez pela dificuldade em se realizar a dosagem de VLCFA em nosso país. Além disso, os indivíduos com sintomas neurológicos mais brandos podem ser muitas vezes diagnosticados erroneamente, sendo comum diagnosticar AMN como esclerose múltipla, por exemplo.

Outro trabalho de KORENKE e col (1997), no qual foram estudados dados endocrinológicos, clínicos, laboratoriais e moleculares de 55 pacientes X-ALD pertencentes a 34 famílias, mostrou que sintomas de insuficiência adrenal foram observados em 33 (60%) dos pacientes, 20 dos quais apresentavam sintomas neurológicos adicionais de ALD ou AMN. Sintomas neurológicos isolados foram vistos em 12 (22%) dos pacientes e em 9 (16%) não haviam sintomas neurológicos nem endocrinológicos.

Nos 17 portadores de X-ALD por nós estudados verificamos que leucodistrofia, insuficiência adrenal, fraqueza dos membros, dificuldade visual e dificuldade escolar foram os principais sintomas apresentados. Leucodistrofia, dano visual, dificuldade de aprendizado e dificuldade na escrita foram mais freqüentes nos pacientes ALD. Insuficiência adrenal teve igual freqüência em ambas as formas clínicas, aparecendo em 54% dos indivíduos estudados. Fraqueza muscular associada a paraparesia foi muito mais frequente em portadores de AMN. Insuficiência adrenal, hiperpigmentação, convulsões, tremor, distúrbio esfíncteriano, distúrbio de equilíbrio e dificuldade na fala aparecem em ambas as formas clínicas com quase a mesma freqüência. Perda de audição, distúrbios de comportamento e hiperatividade foram sintomas mais característicos dos pacientes com AMN. Os médicos devem estar

atentos para pacientes com insuficiência adrencortical e sem sintomas neurológicos, os quais devem sempre fazer a análise de VLCFA em plasma, já que nestes indivíduos o tratamento com Óleo de Lorenzo pode prevenir ou retardar as manifestações clínicas da X-ALD, além de permitir a identificação de famílias em risco.

Em nossa amostra 7 pacientes sob tratamento dietético usaram também Óleo de Lorenzo em dose ajustada que em média foi de 1,4 ml/kg/dia, sendo a duração média da terapia de 24 meses (13 à 40 meses). Desde 1998, a Secretaria da Saúde e Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul passou a importar o Óleo de Lorenzo para os pacientes com X-ALD do estado. Até então muitos pacientes não seguiam adequadamente a dieta por falta de recursos financeiros para adquirir o Óleo de Lorenzo (que é importado e tem alto custo), sendo este um dos fatores que dificultaram o tratamento. Outra dificuldade se refere à baixa aderência à dieta pobre em VLCFA e à ingesta do óleo.

KORENKE e col. (1995) avaliaram o tratamento com a mistura GTO/GTE em 16 pacientes, 7 deles assintomáticos (com leve envolvimento neurológico). Três foram a óbito e 3 tiveram piora no seu curso clínico, 7 pacientes assintomáticos se mantiveram clinicamente estáveis durante o período da terapia. Portanto, 10 (62,5%) dos pacientes tratados permaneceram bem. Os níveis plasmáticos de VLCFA normalizaram-se dentro de 1 a 3 meses após iniciada a terapia. A razão C26:0/C22:0 declinou para 20% nos primeiros meses de tratamento, mas aumentou no segundo ano para mais de 110%, em relação aos níveis iniciais. Houve uma diminuição da razão C24:0/C22:0 para 60% dos valores do início da terapia com um leve aumento no segundo ano, permanecendo dentro da faixa de normalidade. A concentração de

C26:0 diminuiu bruscamente no primeiro mês de tratamento permanecendo dentro da normalidade até o final. Nenhum dos 7 pacientes assintomáticos desenvolveu sintomas neurológicos durante a terapia, 6 destes mantendo-se sem sinais de desmielinização. Quatro destes 7 indivíduos encontravam-se na idade clássica de início da forma infantil da X-ALD. Estes resultados são semelhantes aos de MOSER (1995b) em 50 meninos neurologicamente assintomáticos, que relata que 1 paciente desenvolveu sintomas e desmielinização. Considerando o curso natural da ALD infantil era de se esperar que sem tratamento ocorresse uma maior frequência de desenvolvimento de sintomas neurológicos. Seis dos 9 pacientes com sintomas neurológicos de ALD ou AMN estudados por KORENKE et col (1995) deterioraram sob uso da terapia embora o tratamento tenha sido iniciado em pacientes levemente afetados. Somente 3 dos 9 pacientes neurologicamente sintomáticos não tiveram progressão da sintomatologia após 34 meses de terapia.

MOSER e col (1995b), ao estudar 50 pacientes sem sintomatologia neurológica tratados com GTO/GTE, verificaram que 45% dos mesmos permaneceram bem durante a terapia. Em 13% deles houve piora na imagem de RNM ou na função cognitiva. Em outros 17% a imagem de RNM foi significativamente pior. Em 10% dos pacientes além da piora na imagem da RNM houve leve ou moderado dano do comportamento e da função cognitiva. Nos demais 6% houve desenvolvimento do fenótipo infantil cerebral progressivo. Neste estudo 65% dos indivíduos atingiram uma significativa diminuição da concentração de C26:0 no plasma, se mantendo dentro da normalidade em 40% deles. Em 13% dos pacientes houve uma pequena redução na concentração do ácido hexacosanóico e nos demais

16% não ocorreu redução, provavelmente devido a inabilidade em manter o regime dietético.

O seguimento destes pacientes assintomáticos mostrou que naqueles sob tratamento dietético uma leve anormalidade neurológica se manteve estável por longos períodos. Os dados sugerem que a administração precoce do Óleo de Lorenzo reduz a frequência e a severidade das deficiências neurológicas subsequentes. Entretanto, estes dados devem ser interpretados com cuidado uma vez que estudos recentes indicam que o Óleo de Lorenzo não penetra no cérebro, o que coloca em questão a base teórica para a mistura GTO/GTE. Uma vez que o ácido erúico não atinge o cérebro em concentrações adequadas é improvável que haja um efeito com a atual dosagem prescrita do Óleo de Lorenzo. Outras análises indicam que os níveis de C26:0 no tecido cerebral “post mortem” em pacientes X-ALD tratados com Óleo de Lorenzo não diferem daqueles de pacientes não tratados (RASMUSSEN *et al*, 1994).

Até o presente momento vários grupos diferentes não foram capazes de demonstrar benefício clínico significativo da terapêutica dietética no tratamento ou prevenção da X-ALD. Em um estudo realizado na Holanda com 22 pacientes (VAN GEEL *et al*, 1994) 86% dos pacientes apresentaram níveis normais de C26:0 no plasma e, no entanto, nenhum efeito clínico relevante pode ser observado. Os efeitos desta dieta em adultos sintomáticos são, ainda, contraditórios. Além disso, a recente descoberta de que não apenas C24:0 e C26:0 estariam elevados na X-ALD mas também o VLCFA monoinsaturado C24:1 (SANDHIR *et al*, 1998) indica claramente que o tratamento à base de dieta especial acompanhada do Óleo de Lorenzo deve ser reavaliado.

Na nossa amostragem de pacientes sob tratamento dietético a eficácia do mesmo pode ser observada sob dois aspectos: bioquímico e clínico. Além do uso do Óleo de Lorenzo da dose de 1,2 ml/kg/dia os pacientes faziam uma dieta pobre em VLCFA. Alguns deles fizeram suplementação com os ácidos graxos essenciais linolêico e linolênico.

Com relação aos aspectos bioquímicos pode-se observar que nos 7 pacientes sob tratamento dietético (2 AMN e 5 ALD) as concentrações de C26:0 diminuíram abruptamente (50,5%) no primeiro mês de tratamento, tendo se mantido dentro da faixa de normalidade somente em 3 pacientes nos últimos meses da terapia e tendo aparecido alguns picos de altas concentrações em outros momentos. O mesmo ocorreu com a razão C26:0/C22:0, diminuindo em 42,8% após o início do tratamento. Sessenta e dois por cento das dosagens plasmáticas de C26:0 durante o período de terapia ficaram acima de 2,86  $\mu\text{mol/L}$ . Cabe salientar que estes pacientes iniciaram o tratamento quando sintomas neurológicos irreversíveis já estavam presentes. Isto parece indicar que existe uma real dificuldade na manutenção do manejo dietético da X-ALD em nosso meio.

Paralelamente, 57,1% destes pacientes permaneceram clinicamente bem durante o mesmo período, sendo que 28,6% dos mesmos apresentaram uma rápida progressão no curso clínico da doença, sendo que 1 destes pacientes foi a óbito. Estes resultados mostram não haver uma correlação clara entre o efeito bioquímico e clínico em pacientes tratados com dieta e Óleo de Lorenzo.

O dano neurológico na X-ALD parece ser mediado pela ativação dos astrócitos e a indução das citocinas pró-inflamatórias. Atualmente, as restrições dietéticas e a terapia com Óleo de Lorenzo são usadas para diminuir os níveis

plasmáticos dos VLCFA, mas estas medidas não modificam os aspectos neuroinflamatórios da doença. Recentemente, em estudos animais, SINGH e col. (1998b) mostraram que a lovastatina e o fenilacetato de sódio inibem a indução da síntese do óxido nítrico e das citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral  $\alpha$ , interleucina  $1\beta$  e interleucina  $6$ ) envolvidas na gênese do dano neurológico da X-ALD. Além disso foi demonstrado que estes compostos normalizam os níveis de VLCFA em fibroblastos cultivados em pacientes com ALD e AMN. Estes autores trataram 7 pacientes de 3 famílias com lovastatina por 2 a 6 meses, iniciando com a dose de 20 mg/dia e passando para 40 mg/dia, quando da ausência de efeitos adversos. Com exceção de um paciente que apresentou diarreia e aumento dos níveis de creatina quinase no soro, nos demais não se observaram reações adversas. Os resultados mostraram uma diminuição dos VLCFA totais dentro de um mês e permaneceram diminuídos e dentro da faixa de normalidade em 5 pacientes. A curta duração e o pequeno tamanho da amostra não permitiram avaliar se houve benefício clínico. Em outro estudo SINGH e col. (1984) propõem que estas drogas normalizam os níveis de VLCFA em fibroblastos de pele de pacientes X-ALD por aumentar a atividade peroxisomal para  $\beta$ -oxidação dos VLCFA. Estudos multicêntricos controlados devem ser realizados nos próximos anos para avaliar o potencial terapêutico da lovastatina e do fenilacetato de sódio na X-ALD.

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

a) Foram diagnosticados 13 casos de X-ALD ( todos ALD) em 21 homens com insuficiência adrenal isolada (61,9%), e 5 casos de X-ALD (sendo 4 casos de AMN e 1 caso de ALD) em 26 homens com tetraparesia/paraparesia sem causa etiológica definida (19,2%). Estas altas frequências indicam que estes sinais e sintomas são importantes para a suspeita de X-ALD em homens, e que esta possibilidade diagnóstica deve ser sistematicamente investigada em pacientes com insuficiência adrenal e tetraparesia.

b) Foram encontradas 35 mulheres heterozigotas, perfazendo 56,0% do total de 63 mulheres em risco estudadas nas 13 famílias investigadas. Este percentual mostra a importância de se investigar mulheres portadoras do gene mutado para X-ALD, uma vez que as famílias podem ser beneficiadas pelo aconselhamento genético e/ou pelo diagnóstico pré-natal. Algumas heterozigotas podem apresentar sintomas e se beneficiar da introdução precoce do tratamento disponível.

c) Foram detectados 5 casos adicionais de X-ALD (1 ALD e 4 AMN) nos 25 familiares do sexo masculino estudados em 4 das 13 famílias. Estes 5 pacientes, a maioria dos quais assintomáticos ao diagnóstico, podem ser potencialmente beneficiados pelo tratamento, que possivelmente pode proporcionar um curso clínico mais brando da doença.

d) Neste estudo, pode ser observada a ocorrência de diferentes formas clínicas de X-ALD numa mesma família, confirmando evidências da literatura. Estudos em famílias grandes, mais prováveis de serem realizados em países em desenvolvimento, deverão auxiliar na pesquisa de fatores modificadores que possivelmente modulam a expressão clínica da doença.

e) Leucodistrofia foi o sinal mais freqüente (80%) apresentado pelo conjunto de pacientes com X-ALD. Dificuldade visual, de aprendizado, de fala e convulsões foram os sintomas mais freqüentes nos pacientes com ALD, enquanto distúrbio de comportamento foi o mais freqüente nos pacientes com AMN. O grande número de diferentes sinais e sintomas associados à X-ALD enfatiza a necessidade de melhor divulgar a doença no meio médico, uma vez que o paciente pode procurar diferentes especialistas, que devem estar alertados para esta possibilidade diagnóstica.

f) A idade média de diagnóstico foi de 10 anos para ALD e 29 anos para AMN, sendo o intervalo entre os primeiros sintomas e o diagnóstico de 2,4 anos para ALD e de 7 anos para AMN. Tanto a idade do diagnóstico quanto o intervalo entre os primeiros sintomas e o diagnóstico foram considerados elevados. Estes resultados podem indicar que os neurologistas e outros especialistas parecem não estar familiarizados com as muitas facetas da X-ALD não levantando a suspeita diagnóstica. Além disso, a dificuldade em realizar dosagem de VLCFA em nosso país pode constituir um fator adicional para o retardo no diagnóstico. Muitos casos



de ALD e AMN podem estar sendo equivocadamente diagnosticados como doença de Addison e esclerose múltipla.

g) Sessenta e dois por cento dos níveis plasmáticos do ácido hexacosanóico (C26:0) dos 7 pacientes tratados para X-ALD se encontraram acima de 2,86  $\mu\text{mol/L}$  (normal entre 0,32 e 1,52  $\mu\text{mol/L}$ ), durante o período do tratamento. Entretanto, os níveis plasmáticos desse metabólito diminuíram em média 50% após início do tratamento, mantendo-se durante a terapia 58%, em média, abaixo dos valores iniciais. Dos pacientes tratados, 57,1% permaneceram clinicamente bem durante o período de tratamento, enquanto que 28,6% (apresentando ALD) mostraram rápida progressão no curso clínico da doença, sendo que um deles foi a óbito. Estes resultados confirmam não haver uma correlação clara entre controle bioquímico e a evolução clínica em pacientes tratados com dieta e óleo de Lorenzo, o que está de acordo com a literatura.

h) Novas terapias mais eficazes são necessárias para o tratamento da X-ALD, para que se possa obter um melhor prognóstico para a doença com progressão mais lenta dos sintomas ou mesmo reversão do quadro já instalado. A lovastatina surge como uma droga promissora, e estudos clínicos estão sendo planejados no sentido de avaliar sua eficácia. A terapia gênica ainda é apenas uma possibilidade futura de tratamento da X-ALD.

i) No decorrer deste trabalho, o Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre tornou-se um centro de referência para o diagnóstico,

tratamento, prevenção e investigação de X-ALD, sendo o único laboratório no país a realizar rotineiramente dosagem de VLCFA e um dos centros selecionados para participar em estudos multicêntricos internacionais para a avaliação de novas terapias para X-ALD.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALBET, S.; CAUSERET, C.; BENTEJAC, M.; MANDEL, J.L.; AUBOURG, P.; MAURICE, B. Fenofibrate differently alters expression of genes encoding ATP-binding transporter proteins of the peroxisomal membrane. **FEBS Lett** **405**:394-397, 1997.
- ALEGRE, M. L.; GASTALDELLO, K.; ABRAMOWICZ, D., KINNAERT, P.; VEREERSTRAETEN, P.; DE PAUW, L.; VANDENABEELE, P.; MOSER, M.; LEO, O.; GOLDMAN, M. Evidence that pentoxifylline reduces anti-CD3 monoclonal antibody-induced cytokine release syndrome. **Transplantation**, **52**:674, 1991.
- 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. Reversal of early neurologic and neuroradiologic manifestations of X-linked adrenoleukodystrophy by bone marrow transplantation **N.Engl.J.Med.** **322**:1860-1866, 1990.
- AUBOURG, P.; CHAU, S.; SAIN, J-L. Adrenoleukodystrophy presenting as Addison's disease in children and adults. **Trends Endocrinol. Metab.** **2**:49-52, 1991.
- AUBOURG, P.; SACK, G. H.; MEYERS, D. A.; LEASE, J. J. AND MOSER, H. W. Linkage of adrenoleukodystrophy to a polymorphic DNA probe. **Ann. Neural**, **21**: 349-351, 1987.

- AUBOURG, P.; MOSER, J.; DOUAR, A. M.; SARDE, C. O.; LOPEZ, J. L.; MEEL, J. L. Adrenoleukodystrophy gene: unexpected homology to a protein involved in peroxisome biogenesis. **Biochimie.** **75** ;293-302, 1993.
- BALFE, A.; HOEFLER, G.; CHEN, W. W.; WATKINS, P. A. Aberrant subcellular localization of peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase in the Zellweger syndrome and rhizomelic chondrodysplasia punctata. **Pediatr. Res.** **27**: 304-310, 1990
- BOREL, J. Glycerol trioleate (GTO) and Glycerol Trierucate (GTE) Therapy for Adrenoleukodystrophy (ALD) and Adrenomyeloneuropathy (AMN). **Kennedy Krieger Institute**, Jun.,1992.
- BOURRE, J. M.; DAUDU, O.; BAUMANN, N. Nervonic acid biosynthesis by erucyl-CoA elongation in normal and quaking mouse brain microsomes. Elongation of other unsaturated fatty acyl-CoAs (mono and polyunsaturated). **Biochim. Biophys. Acta** **424** : 1, 1976.
- BRAUN, A.; AMBACH, H.; KAMMERE, S.; ROLINSKI, B.; STOCKLER, S.; RABE, W.; GARTNER, J.; ZIERZ, S. and ROSCHER, A. A. Mutations in the gene for X- linked adrenoleukodystrophy in patients with different clinical phenotypes. **Am. J. Hum Genet.** **56** ; 854-861, 1995.
- BROWN III, F. R.; VAN DUYN, M. A.; MOSER, A. B. *et al.* Adrenoleukodystrophy: Effects of dietary restriction of very long chain fatty acids and of administration of carnitine and clofibrate on clinical status and plasma fatty acids. **Johns Hopkins Med. J.** **151** : 164-172, 1982.

- CHALMERS, R. A . A study of the acidic metabolites present in the urine of normal and metally-subnormal human subjects and of patients with some metabolic diseases, together with some observations of other physiological fluids. **Ph.D. thesis, Council for National Academic Awards, 1974.**
- CHEMKE, J.; LIEBERMAN, E.; CARMI, R.; ABARBANEL, Y.; COSTEFF, H.; GOLGHAMMER, Y.; MOSER, H.W. Adrenoleukodystrophy in Israel: a genetic, clinical and biochemical study. **J.Med. Sci. 20:1123-1132, 1984.**
- CONTRERAS, M.; MOSSER, J.; MEEL, J. L.; AUBOURG, P.; SINGH, I. The protein coded by the X-linked adrenoleukodystrophy gene is a peroxisomal integral membrane protein. **FEBS Letter. 344: 211-215, 1994.**
- CRAPO, L. *et al.* "Cushing's syndrome: a review of diagnostic tests". **Metabolism, 28:955-977, 1979.**
- DACREMONT, G.; COCQUYT, G.; VINCENT, G. 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, 1995.**
- DE DUVE, C.; BAUDHUIN, P. Peroxisomes (microbodies and related particles) **Physiol. Rev., 46:323-357, 1966.**
- DODD, A; ROWLAND, S.A; HAWKES, S.L.J.; KENNEDY, M.A; LOWE, D.R. Mutations in the adrenoleucodystrophy gene. **Hum. Mutat. 9:500-511, 1997.**
- EICHER, E.; LU, F.; SHEN, Y.; ANTONNACI, R.; JURECIC, V.; DOGGET, N.; MOYZIZ, R.; BALDIN, A ; GIBBS, R. Duplication of a gene-rich cluster between 16p11.1 and Xq28: a novel pericentromeric directed mechanism for paralogous genome evolution. **Hum. Mol. Genet. 5: 899-912, 1996.**

- EICHER, E.; BUDARF, M.L.; ROCCHI, M.; DEAVEN, L.L.; DOGGETT, N.A.;  
BALDINI, A.; NELSON, D.L.; MOHRENWEISER, H.W. Interchromosomal  
duplications of the adrenoleukodystrophy locus: a phenomenon of  
pericentromeric plasticity. **Hum. Mol. Genet.** 6:991-1002, 1997.
- EL-DEIRY, S. S.; NAIDU, S.; BLEVINS, L. S.; LADENSON, P. W. Assessment of  
adrenal function in women heterozygous to adrenoleukodystrophy **J. Clin.  
Endocrinol. Metab.** 82(3): 856-860, 1997.
- ESIRI, M. M.; HYMAN, N. M.; HORTON, W. L.; LIUNDENBAUM, R. H.  
Adrenoleukodystrophy: Clinical, pathological and biochemical findings in two  
brothers with the onset of cerebral disease in adult life. **Neuropathol. Appl.  
Neurobiol.** 10 : 429, 1984.
- FOURNIER, B.; SMEITINK, J. A.M. DORLAND, L.; GERGER, R.; SAUDUBRAY,  
J.M.; POLLTHE, B.T.. Peroxisomal Disorders: A Review. **J. Inher. Metab.  
Dis.**, 17 : 470-486, 1994.
- GOLPERTZ, D. Inborn Errors of Organic Acid Metabolism. **Clin. Endocrinol.  
Metab.** 3 : 107, 1974.
- HALL, J. G.; POWERS, E. K.; MCILVAINE, R. T.; EAN, V. H. The frequency and  
financial burden of genetic disease in a pediatric hospital **Am.J. Med. Genet.**  
1:417, 1978.
- KEMP, S.; LIGTENBERG, J.-L.; VAN GEEL, B. M.; BARTH, P. G.;  
WOTTEMANN, R. A.; SCHOUTE, F.; SARDE, C. O.; MEEL, J.-L.; VAN  
OOST, B. A.; BOLHUIS, P. A. Identification of a two base pair deletion in  
five unrelated families with Adrenoleukodystrophy. **Biochem. Biophys. Res.**

**Commun** 202: 647- 653, 1994

KEMP, S.; WLI, H. M.; LU, J. F.; BRAITERMANN, L.; MCGUINNES, M. C.;  
MOSER, A. B.; WATKINS, P. A.; SMITH, K. D.; Gene redundancy and  
pharmacological gene therapy: implications for X-linked  
adrenoleukodystrophy. **Nat. Med.** 4 (11): 1261-1268, 1998.

KISHIMOTO, Y.; MOSER, H.W.; KAWAMURA, N.; PLATT, M.; PALLANTE, S.  
L.; FENSELAU, C. Evidence that abnormal very long chain fatty acids of  
brain cholesterol esters are of exogenous origin. **Biochem. Biophys. Res.**  
**Commun** 96: 69-76, 1980.

KOIKE, R.; TSUJI, S.; OHNO, T.; SUZUKI, Y.; ORII, T.; MIYATAKE, T.  
Physiological significance of fatty acid elongation system in  
adrenoleukodystrophy. **J. Neurol. Sci.** 103 : 188, 1991.

KOK, F.; NEUMANN, S.; SARDE, C. O.; ZHENG, S.; WU, K. H.; WEI, H. M.;  
BERGIN, J.; WATKINS, P. A.; GOULD, S.; SACK, G.; MOSER, H.;  
MEEL, J. L. and SMITH, K. D. Mutational analysis of patients with X-linked  
adrenoleukodystrophy. **Hum. Mutat.** 6:104-115, 1995.

KORENKE, G. C.; HUNNEMAN, D. H.; KOHLER, J.; STÖCKLER, S.;  
LANDMARK, K.; HANEFELD, F. Glyceroltrioleate / glyceroltrierucate  
therapy in 16 patients with X-chromosomal adrenoleukodystrophy /  
adrenomyeloneuropathy: effect on clinical, biochemical and  
neurophysiological parameters. **Eur. J. Pediatr.** 154 : 64-70, 1995.

KORENKE, G.C.; FUCHS, S.; KRASERMANN, E.; DOERR, H.G.;  
WILICHOWSKI, E.; HUNNEMAN, D.H.; HANEFELD, F. Cerebral

adrenoleukodystrophy (ALD) in only one of monozygotic twins with an identical ALD genotype. **Ann. of Neurol.** 40:254-257, 1996.

KORENKE, G. C.; ROTH, C.; KRASEMANN, E.; HÜFRER, M.; HUNNEMAN, D. H.; HANEFELD, F. Variability of Endocrinological Dysfunction in 55 Patients With X-Linked Adrenoleukodystrophy: Clinical, Laboratory and Genetic Findings. **Eur. J. Endocrinol.**, Jul 137:1 40-7, 1997.

KRAMER, J. K.; SAUER, F. D.; PIDGEN, W. J. High and low erucic acid rapeseed oils: production, usage, chemistry and toxicological evaluations. New York: Academic, 1983

KRIVIT, W.; SHAPIRO, E.; LOCKMAN, L.; TORRES, F.; STILLMAN, A. ; MOSER, A. ; MOSER, H. Recommendations for treatment of childhood cerebral form of adrenoleukodystrophy. In: HOBBS, J. R.; RICHES, P. G. eds. **Correction of Certain Genetic Diseases by Transplantation.** London: COGENT Trust, 38-39, 1992.

LAURETTI, S.; CASUCCI, G.; SANTEUSANIO, F.; ANGELLETTI, G.; AUBOURG, P.; BRUNETTI, P. X-linked adrenoleukodystrophy is a frequent case of idiopathic Addison's Disease in young adult male patients. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 81:470-474, 1996.

LAZAROW, P. B. and MOSER, H. Disorders of Peroxisome Biogenesis. In: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; WILLIAM, S.S.; VALLE, D. **The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease.** 7<sup>a</sup> ed., McGraw-Hill Inc., New York, vol.II, pp 2287-2324, 1995.



- LAZO, O; STANLEY, W.; IRAZU, C.; SINGH, I. Peroxisomal lignoceryl-CoA ligase deficiency in childhood adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **85:** 7647-7651, 1993.
- LOWRY, O H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent **J. Biol.Chem.** **193:**265, 1951.
- LU, J.-F.; LAWER, A . M.; WATKINS, P. A .; POWERS, L. M.; MOSER, A . B.; MOSER, H. W.; SMITH, K. D. A mouse model for X-linked adrenoleukodystrophy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **94:** 9366-9371, 1997.
- MAESTRI, N.E. and BEASTRI, T.H. Predictions of a 2-locus model for disease heterogeneity: application to adrenoleukodystrophy. **Am. J. Med. Genet.** **44:**576-582, 1992.
- McGUINNESS, M. C.; WESSELINGH, S. L.; GRIFFIN, D. E.; POWERS. J.M.; MOSER H.W.; SMITH K.D. Cytokines and inflammatory demyelinating lesions in adrenoleukodystrophy and multiple sclerosis. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** **52** : 331a, 1993.
- MIGUEON, B. R.; MOSER, A . B.; AXELMAN, J.; SILLENCE, D.; NORUM, R. A . Adrenoleukodystrophy: evidence for X linkage, inactivation, and selection favoring the mutant allele in heterozygous cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **78:** 5066-5070, 1981.
- MIIKE, T.; TAKU, K.; TAMURA, T.; OHTA, J.; OZAKI, M.; YAMAMOTO, C.; SAKAI, T.; ANTOKU, Y.; YADOMI, C. Clinical improvement of adrenoleukodystrophy following intravenous gammaglobulin therapy. **Brain Dev.** **11** : 134, 1989.

- MOSER, H. W.; TUTSCHKA, P. J.; BROWN, F. R. III.; MOSER, A. B.; YEAGER, A. M.; SINGH, I.; MARK, S. A.; KUMAR, A. J.; MCDONELL, J. M.; WHITE, C. L.; MAUMENEE, I. H.; GREEN W. R.; POWERS, J. M.; SANTOS, G. W. Bone marrow transplant in adrenoleukodystrophy. *Neurology*, **34** : 1410, 1984 .
- MOSER, H. W.; NAIDU, S.; KUMAR, A. J.; ROSENBAUM, A. E. The Adrenoleukodystrophies. *CRC Crit.Rev.Neurobiol.* **3**:29, 1987.
- MOSER, H. W.; AUBOURG, P.; CORNBLATH, D.; BOREL, J.; YAN-WAN, W. U.; BERGIN, A.; NAIDU, S.; MOSER, A. **Therapy for X-linked adrenoleukodystrophy**. In: Desnick R. J. (ed): *Treatment of Genetic Disease*. New York: Churchill Livingstone, 1991a .
- MOSER, H. W.; BERGIN, A.; NAIDU, S.; LANDENSON, D. W. Adrenoleukodystrophy. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* v.20, n.2, p.297-318, June, 1991b.
- 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 - Liss, 177-191, 1991c.
- MOSER, H. W.; MOSER, A. B.; NAIDU, S.; BERGIN, A. Clinical aspects of adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. *Dev. Neurosci.* **13**: 254, 1991d.
- MOSER, H. W.; MOSER, A. B.; SMITH, K. D.; BERGIN, A.; BOREL, J.; SHAN KROFF, J.; STINE, O. C.; MERETTE C., OTT J.; KRIVIT, W.; SHAPIRO, E. Adrenoleukodystrophy: Phenotypic Variability and Implications for

Therapy. **J. Inher. Metab. Dis.** **15** : 645-664, 1992.

MOSER, J.; DONAR, A M.; SARDE, C.O; KIOSCHIS, P.; FEIL, R.; MOSER, H.W.; POUSTKA, AM.; MANDEL, J.M.; AUBOURG, P. Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. **Nature** **361**:726-730, 1993.

MOSER, H. W.; SMITH, K. D.; MOSER, A. B. X-Linked Adrenoleukodystrophy. In: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; WILLIAM, S. S.; VALLE, D.. **The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease**. 7<sup>a</sup> ed., McGraw-Hill Inc, New York, vol.II, pp.2325-2349, 1995a.

MOSER, H. W. Adrenoleukodystrophy: natural history, treatment and outcome. **J. Inher. Metab. Dis.** **18** : 435-447, 1995b.

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

MOSER, A B. and MOSER, H.W. The prenatal diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy. **Prenat. Diagn.** **19**:46-48, 1999.

MURAD, S.; KISHIMOTO, Y. Chain elongation of fatty acid in brain: A comparison of mitochondrial and microsomal enzyme activities. **Arch. Biochem. Biophys.** **185** : 300, 1978.

NAIDU, S.; BRESNAN, M. J.; GRIFFIN, D.; O'TOOLE, S.; MOSER, H. W. Intensive immunosuppression fails to alter neurological progression in childhood adrenoleukodystrophy. **Arch. Neurol.** **45** : 846, 1988.

NOEL, P.; NELSON, S.; BOKULIC, R.; BAGBY, G.; LIPPTON, H.; LIPSCOMB,

- G.; SUMMER, W. Pentoxifylline inhibits lipopolysaccharide-induced serum tumor necrosis factor and mortality. **Life Sci.** **47** : 1023, 1990.
- PAHAN, K.; KHAN, M.; SINGH, I. Therapy for X-linked adrenoleukodystrophy: normalization of VLCFA and inhibition of induction of cytokines by cAMP. **J. Lipid. Res.** **39**:5-1091-1100, 1998.
- PATY, D. W UBC MS/MRI Study Group, IFNB Multiple Sclerosis Study Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing -remitting multiple sclerosis. **Neurology**, **43** : 662-667, 1993.
- POWERS, J. M.; LIU, Y.; MOSER, A; MOSER, H. The inflammatory myelinopathy of adrenoleukodystrophy: Cells, effector molecules, and pathogenetic implications. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** **51**: 630-643, 1992.
- RAINE, D.N. Separation of three isoenzymes of N-acetyl-beta-D-hexosaminidase from human tissues by cellulose acetate membrane electrophoresis. **J. Clin. Pathol. Suppl.****8**:156, 1974.
- RASMUSSEN, M.; MOSER, A B.; BOREL, J.; KHANGOARA, S.; MOSER H.W. Barin, liver and adipose tissue erucic acid and very long chain fatty acid levels in adrenoleukodystrophy patients treated with glyceryl trierucate and trioleate oils (Lorenzo's oil). **Neuroch. Res.** **19**:1073-1082, 1994.
- REFSUM, S. Heredopathia atactica polyneuritiformis: Phytanic acid disease. Refsum's disease: A biochemical well-defined disease with a specific dietary treatment. **Arch. Neurol.** **38**: 605-606, 1981.
- RHODIN, J. Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal tubule cells of the mouse kidney. Doctoral

Thesis, Karolinska Institutet, Stockholm, Akitbolaget, Godvil, 1954.

- RIZZO, W. B.; PHILLIPS, M. W.; DAMMANN, A. L.; LESHNER, R. Y.; JENNINGS, S. V. K. Adrenoleukodystrophy: Dietary oleic acid lowers hexacosanoate levels. **Ann. Neurol.** **21**: 232, 1987.
- RIZZO, W. B.; WATKINS, P. A.; PHILLIPS, M. W.; CRANIN, D.; CAMPBELL, B.; AVIGAN, J. Adrenoleukodystrophy: Oleic acid lowers fibroblast saturated C22 - C26 fatty acids. **Neurology** **36**: 357, 1986.
- SANDHIR, R.; KAHN, M.; CHAHAL, A., SINGH, I. Localization of nervonic acid beta-oxidation in human and rodent peroxisomes: impaired oxidation in Zellweger syndrome and X-linked adrenoleukodystrophy. **J. Lipid. Res.** **39**:2161-2171, 1998.
- SANTOS, M. J.; IMANAKA, T.; SHIO, H.; SMALL, G. M.; LAZAROW, P. B. Peroxisomal membrane ghosts in Zellweger syndrome – Aberrant organelle assembly. **Science** **239**: 1536-1538, 1988.
- SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; WILLIAM, S.S.; VALLE, D. **The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease.** 7<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill, New York, 1995.
- SENECA, S.; LISSENS, W. DNA diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy. **J. Inher. Metab. Dis.** **18**: 34-44, 1995.
- SENIR, R.; KAHN, M.; CHAHAL, A.; SINGH, I. Localization of nervonic acid beta-oxidation in human and rodent peroxisomes. Impaired oxidation in Zellweger syndrome and X-linked adrenoleukodystrophy. **J. Lipid. Res.**

39(11): 2161-2171,1998

SINGH, I.; MOSER, A. B.; MOSER, H. W.; KISHIMOTO, Y.

Adrenoleukodystrophy: Impaired oxidation of very long chain fatty acid in white blood cells, cultured skin fibroblasts and amniocytes. **Pediatr. Res.** **18**: 286, 1984.

SINGH, I.; KHAN, M.; KEY, L.; PAI, S. Lovastatin for X-linked

adrenoleukodystrophy. **N. Engl. J. Med.** **339**:702-703, 1998a.

SINGH, I.; PAHAN, K.; KHAN, M. Lovastatin and sodium phenylacetate normalize

the levels of VLCFA in skin fibroblasts of X-ALD. **FEBS Lett.**, Apr 24. 426:3 342-6, 1998b.

SMITH, K.D.; SACK, G.; BEATY, T.; BERGEN, A.; NAIDU, S.; MOSER, A ;

MOSER, H.W. A genetic base for the multiple phenotypes of X-linked adrenoleukodystrophy. **Am. J. Hum. Gen.** **49**:165, 1991.

SOBUE, G.; UENO-NATSUKARI, I.; OKAMOTO, H.; CONNELL, T.A ;

AIZAWA, I.; MIZOGUCHI, K.; HONMA, M.; ISHIKAWA, G.; MITSUMA, T.; NATSUKARI, N. . Phenotypic heterogeneity of na adult form of adrenoleukodystrophy in monozygotic twins. **Ann. Neurol.** **36**: 912-915, 1994.

STEINBERG, S. J.; FENSON, A . H.; DALTON, N. R.; TOSELAND, P. A . ;

KENNEDY, C. R.; MOWAT, A . P. Measurement of Plasma Very Long-Chain Fatty Acids as a Preliminary Screening Procedure for the Diagnosis of Peroxisomal Disorders. **J. Inher. Metab. Dis.**, **17**:323-326, 1994.

- STRADOMSKA, T. J.; TYLKI-SZYMANSKA, A. Examination of very long chain fatty acids in diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy. **Pediatr. Pol., Poland**, **3**:197-201, 1996.
- STUMPF, D. A.; HAYWARD, A.; HAAS, R.; SCHAUMBURG, H. H. Adrenoleukodystrophy. Failure of immunosuppression to prevent neurological progression. **Arch. Neurol.** **38**: 48, 1981.
- TEN BRINK, H. J.; VAN DEN HEUVEL, C. M. M.; POLL-THE, B. T.; WANDERS, R. J. A. ; JAKOBS, C. Peroxisomal Disorders: concentrations of metabolites in cerebrospinal fluid compared with plasma. **J. Inher. Metab. Dis.** **16**: 587-590, 1993.
- TSUJI, S.; SANO-KAWAMURA, T.; ARIGA, T.; MIYTAKE, T. Metabolism of (17,18-3H<sub>2</sub>) hexacosanoic acid and (15,16-3H<sub>2</sub>) lignoceric acid in cultured skin fibroblasts from patients with adrenoleukodystrophy (ALD) and adrenomyeloneuropathy (AMN). **J. Neurol. Sci.** **71**: 359-367, 1985.
- UCHIYAMA, A. ; SUZUKI, Y.; SONG, X. Q.; FUKAO, T.; IAMAMURA, A. ; TOMATSU, S.; SCHIMOZAWA, N. Identification of a nonsense mutation in ALD protein cDNA from a patient with adrenoleukodystrophy. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **198**:632-636, 1994.
- VAN DUYN, M. A.; MOSER, A. B.; BROWN III, F. R.; SACKTOR, N.; LIU, A. ; MOSER, H. W. The design of a diet restricted in saturated very long chain fatty acids: Therapeutic application in adrenoleukodystrophy. **Am. J. Clin. Nutr.** **40**: 277-284, 1984.
- VAN GEEL, B.M.; ASSIES, J.; WEVERLING, G.J.; BARTH, P.G. Predominance

in the adrenomyeloneuropathy phenotype of X-linked adrenoleukodystrophy in the Netherlands. **Neurology**, **44**:2343-2346, 1994.

WALTON, P. A.; GOULD, S. J.; FERAMISCO, J. R.; SUBRAMANI. Transport of microinjected proteins into peroxisomes of mammalian cells; inability of Zellweger cell lines to import proteins with the SKL tripeptide peroxisomal targeting signal. **Mol. Cell. Biol.** **12**: 531-541, 1992.

WANDERS, R. J. A.; HEYMANS, H. S. A.; SCHUTGENS, R. B. H.; VAN DEN BOSCH, H.; TAGER, J.M. Peroxisomal disorders in neurology. **J. Neurol. Sci.** **88**: 1-39, 1988.

WANDERS, R. J. A.; VAN ROERMUND, C. W. T.; SCHUTGENS, R. B. H.; BARTH, P.G.; HEYMANS, H.S.A, VAN DEN BOSCH, H.; TAGER, J.M. The Inborn Errors of Peroxisomal B-Oxidation: A Review. **J. Inher. Metab. Dis.** **13**: 4-36, 1990.

WANDERS, R.J.A.; VAN ROERMUND, C.W.T.; SCHUTGENS, R.B.H.; TAGER, J.M. Disorders of peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation In: **Inborn Errors of Metabolism** (SCHAUB, J.; VAN HOOFF, F. VIS, H.L., eds.) Nestlé Nutrition Workshop Series, vol.24, Vevey / Raven Press, Ltd, New York, 43-56, 1991.

WANDERS, R. J. A.; VAN ROERMUND, C. W. T.; LAGEWEG, W. *et al.* X-linked Adrenoleukodystrophy: Biochemical Diagnosis and Enzyme Defect. **J. Inher. Metab. Dis.** **15**: 634-644, 1992.

WANDERS, R.J.A ; SCHUTGENS, R.B.H.; BARTH, P.G.; TAGER, J.M.; VAN DEN BOSCH, H. Postnatal diagnosis of peroxisomal disorders: a



biochemical approach. **Biochimie** 75:269-279, 1993.

WANDERS, R. J. A; BARTH, P. G.; SCHUTGENS, R. B. H.; TAGER, J. M.

Clinical and biochemical characteristics of peroxisomal disorders: an update.

**Eur. J. Pediatr.** 153 (Supl 1) : S44-S48, 1994.

WANDERS, R. J. A; SCHUTGENS, R. B. H.; BARTH, P. G. Peroxisomal

Disorders: A Review. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 17 (5): 726-739,

September 1995.

WANDERS, R.J.A; SCHUTGENS, R.B.H.; BARTH, P.G. Peroxisomal disorders

In: BLAU, N.; DURAN, M.; BLASKOVICS, M.E. **Physician's Guide to**

**the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases** 1<sup>a</sup> Ed., Chapman & Hall

Medical, London, pp.359-376 , 1996a.

WANDERS, R. J. A; BARTH, P. G.; SCHUTGENS, R. B. H.; HEYMANS, H. S.

A. Peroxisomal Disorders: Post and Prenatal Diagnosis Based on a New

Classification with Flowcharts. **Int.Pediatr.** The Journal of Miami Children's

Hospital, 11: 203-214, 1996b.

WANDERS, R.J.A.; MOOYER, P.W.; DEKKER, C.; VREKEN, P. X-linked

adrenoleukodystrophy: improved prenatal diagnosis using both biochemical

and immunological methods. **J. Inher. Metab. Dis.** 21:285-287, 1998.

WARRS, R. W. E.; CHALMERS, R. A; LAWSON, A M. Abnormal organic

acidurias in mentally retarded patients. **Lancet** 1:368, 1975.

WATTS, R.W.E. Progress in screening for inborn errors of metabolism.

**Experimentia** 34:143, 1978.

- WEINBERG, K.; MOSER, A.; WATKINGS, P.; LENARSKY, C.; WINTER, S.; MOSER, H.; PARKMAN, R. Bone marrow transplantation (BMT) for adrenoleukodystrophy (ALD). **Pediatr. Res.** **23**: 334A, 1988.
- YAMADA, T.; TANIWAKI, T.; SHINNOH, N.; UCHIYAMA, A; SHIMOZAWA, N.; OHYAGI, Y.; ASAHARA, H.; KIRA, J. Adrenoleukodystrophy protein enhances association of very long-chain acyl-coenzyme A synthetase with the peroxisome. **Neurology**, **52**:614-616, 1999.
- ZINKHAM, W. H.; KICKLER, T.; BOREL, J.; MOSER, H. W. Lorenzo's oil and thrombocytopenia in patients with adrenoleukodystrophy. **N. Engl. J. Med.** **328**: 1126, 1993.

## Anexo 1

**9. Termo de Consentimento Pós-Informação**

O presente projeto de pesquisa tem por objetivos: (1) verificar a frequência da doença “Adrenoleucodistrofia ligada ao X” em pacientes que apresentam insuficiência adrenal ou uma alteração neurológica denominada "tetraparesia"; (2) verificar, nas famílias identificadas, a frequência de indivíduos que possuem o gene mas que não apresentam sintomas e investigar o risco destes pacientes manifestarem alguns dos sintomas associados à Adrenoleucodistrofia; (3) correlacionar os achados bioquímicos com as características clínicas dos pacientes, de forma a contribuir para um melhor conhecimento destes distúrbios; (4) avaliar a evolução destes pacientes quando tratados com a mistura gliceroltrioleato/gliceroltrierucato no que tange aos aspectos bioquímicos e clínicos.

Os dados necessários para a realização do projeto serão obtidos através de entrevistas realizadas com os pacientes e seus familiares, bem como pela análise de ácidos graxos de cadeia muito longa em plasma obtido pela coleta de sangue periférico e, nos casos positivos, também em fibroblastos cultivados obtidos pela coleta de biópsia de pele.

Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue para o estudo são semelhantes aos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina.

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

Pelo presente Consentimento Pós-Informação, declaro que fui informado, de forma clara e detalhada, sobre o presente Projeto de Pesquisa. Os pesquisadores responsáveis pelo projeto são o Dr. Roberto Giugliani e a farmacêutica-bioquímica Carmen Regla Vargas (fone 051-3168011).

Fui igualmente informado da garantia de receber resposta à qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca da pesquisa; da liberdade de não participar do estudo, da segurança do sigilo e caráter confidencial das informações.

Data:

Indivíduo:

Responsável Legal:

Pesquisador:

## **10. PUBLICAÇÕES**

### **10.1. X-linked Adrenoleukodystrophy: Clinical and Laboratorial**

#### **Findings in 15 Brazilian Patients**

Carmen R. Vargas, Daniella de M. Coelho, Alethéa G. Barschak, Carolina F. M. de Souza, Ana C.S. Puga, Ida V.D. Schwartz, Laura Jardim and Roberto Giugliani.

Aceito para publicação no “Genetics and Molecular Biology”.

### **10.2. Clinical and Biochemical Findings in 7 Patients With X-linked**

#### **Adrenoleukodystrophy treated with Lorenzo’s Oil**

Carmen R. Vargas, Alethéa G. Barschak, Daniella de M. Coelho, Vivian Furlanetto, Carolina F.M. de Souza, Simone M. Karan, Laura Jardim and Roberto Giugliani.

Encaminhado para publicação no “Genetics and Molecular Biology”.

# **X-linked Adrenoleukodystrophy: Clinical and Laboratory Findings in 15 Brazilian Patients**

Carmen R. Vargas<sup>1</sup>, Daniella de M. Coelho<sup>1</sup>, Alethéa G. Barschak<sup>1</sup>, Carolina F.M. de Souza<sup>1</sup>, Ana C.S. Puga<sup>1</sup>, Ida V.D. Schwartz<sup>1</sup>, Laura Jardim<sup>1,2</sup> and Roberto Giugliani<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. Sendo correspondence to C.R.V.

<sup>2</sup>Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

## **Running Title:**

X-ALD in 15 Brazilian Patients

## **Key words:**

adrenoleukodystrophy, adrenal insufficiency, leukodystrophy, paraparesis, peroxissomes, adrenomyeloneuropathy

## **Corresponding author:**

Carmen R. Vargas  
Serviço de Genética Médica  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Rua Ramiro Barcelos, 2350  
90035-003 - Porto Alegre - RS - Brazil  
e-mail: fleith@portoweb.com.br

## ABSTRACT

Adrenoleukodystrophy (X-ALD) is an X-linked recessively inherited peroxisomal disorder, phenotypically heterogenous, characterized by progressive white-matter demyelination of the central nervous system and adrenocortical insufficiency. We investigated 15 male X-ALD patients varying in age from 7 to 39, diagnosed from 108 suspected patients referred for investigation. Plasma levels of very long chain fatty acids (VLCFA) were measured at our laboratory using gas chromatography (GC). Eleven cases of childhood X-ALD and four cases of adrenomyeloneuropathy (AMN) were diagnosed. Adrenal insufficiency, leukodystrophy and limb weakness were the most frequent symptoms, appearing in 12, 8 and 6 of the patients, respectively. Physician awareness of X-ALD seems inadequate to judge by age at diagnosis and lengthy interval between the start of symptoms and diagnosis. This is the first published series of Brazilian patients with X-ALD. We determined signs and symptoms relevant for diagnosis, as early identification seems important for treatment outcome. In addition, diagnosis identifies carriers, who could benefit from genetic counselling and prenatal diagnosis.

## INTRODUCTION

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is the most frequent peroxisomal disorder, with an estimated frequency of 1:20,000 in males (Moser, 1993; Korenke *et al.*, 1995). It should be differentiated clinically and biochemically, from neonatal ALD, an autosomal recessive disorder of peroxisome biogenesis in which the function of at least five peroxisomal enzymes is impaired. In X-ALD, a defect in lignoceroyl-CoA ligase causes pathognomonic tissue accumulation of very long chain fatty acids (VLCFA), mainly hexacosanoic (C<sub>26:0</sub>) and tetracosanoic acids (C<sub>24:0</sub>) (Moser, 1993; Wanders *et al.*, 1992; Wanders *et al.*, 1988). Fatty acid accumulation seems responsible for adrenal cortex malfunction and nervous system demyelination (Wanders *et al.*, 1996; Moser *et al.*, 1991). Known clinical forms are: classical (or childhood) X-ALD (ALD), adrenomyeloneuropathy (AMN) and isolated Addison's disease (AD). In some cases patients are completely asymptomatic, and these several phenotypes may occur in the same family (Koike *et al.*, 1991; Wanders *et al.*, 1996; Korenke *et al.*, 1995; Moser *et al.*, 1992; Moser *et al.*, 1991; Wanders *et al.*, 1994; Wanders *et al.*, 1995). ALD and AMN are the two most frequent clinical forms of X-ALD (Wanders *et al.*, 1996; Korenke *et al.*, 1995; Moser *et al.*, 1992). Patients with ALD usually develop the symptoms from age four to eight, including visual and auditory disturbances, decreased school performance, adrenal insufficiency, walking difficulties, demyelination and leukodystrophy. The disease progresses rapidly and patients usually die approximately two to five years after symptom onset (Moser *et al.*, 1992). In contrast, AMN appears around age 20-30 (Koike *et al.*, 1991) and is characterized by progressive paraparesis and sphincter disturbances, since the spinal cord is affected. Two-thirds of the patients have adrenal insufficiency. Treatment consists of a diet restricted to saturated fatty acids, combined with the use of glycerotrioleato/glyceroltrierucate



(GTO/GTE), known as Lorenzo's oil (Koike *et al.*, 1991; Korenke *et al.*, 1995; Moser *et al.*, 1994; Ruiz *et al.*, 1996 ). The objective is to normalize VLCFA concentrations, but favorable responses apparently occur only in patients beginning treatment before the appearance of neurological symptoms (Koike *et al.*, 1991; Moser, 1993; Korenke *et al.*, 1995; Moser *et al.*, 1994). Bone marrow transplantation and immunosuppression are also considered therapeutic alternatives (Moser *et al.*, 1992). Lovastatin and sodium phenylacetate are being tested as therapeutic drugs for normalizing VLCFA levels in plasma and skin fibroblasts of X-ALD patients (Singh *et al.*, 1998a; Singh *et al.*, 1998b). We describe 15 male patients with X-ALD, stressing main signs and symptoms and phenotypic differences between ALD and AMN.

## MATERIAL AND METHODS

We studied 15 male patients (from 12 families) aged between 7 and 39 with confirmed diagnosis of X-ALD, selected from 108 patients referred for investigation due to suggestive symptoms from pediatric, endocrinology and neurology services from various Brazilian cities. A reference group of 30 healthy individuals was also studied to establish normal values of VLCFA plasma concentrations.

VLCFA were analyzed at our laboratory following the Moser technique (Moser and Moser, 1991). Internal standard ( $C_{27:0}$  -heptacosanoic acid) was added to 100 $\mu$ L of plasma samples. Chloroform-methanol (1:1) was added for plasma extractions. After centrifugation, the supernatant was mixed with distilled water and chloroform for removal of precipitated proteins. After further centrifugation the lower phase was dried under  $N_2$  and chloroform-methanol (2:1) was used to rinse down dried lipids. Methanolic HCl (1N) was added to each dry total lipid extract and the tubes kept at 75°C for 16 hours to perform acid methanolysis. The fatty acid methyl esters were then purified by thin-layer chromatography. The plates (0.25 $\mu$ m silica gel G 20x20) were pre-washed in (52:20:7:3) chloroform:methanol:acetic acid:water and (90:10:1) hexane:ether:acetic acid. The plate was developed in (97:3) toluene:ether. After air drying during 16 hours, the samples were exposed to iodine vapors. Extraction of VLCFA methyl esters from silica was performed using hexane (3 times). After drying with  $N_2$ , the samples were redissolved with 50 $\mu$ L hexane for analysis by gas chromatography. We used Varian GC equipment with a HP-5 column (crosslinked 5% phenyl methyl silicone, 0.33 $\mu$ m film thick, 0.2mm internal diameter and 25m long), flame ionization detector, split/splitless injector, and helium as carrier gas. Concentrations of  $C_{22:0}$  (docosanoic acid),  $C_{24:0}$  (tetracosanoic acid) and  $C_{26:0}$  (hexacosanoic acid) were measured, and  $C_{26:0}/C_{22:0}$  and  $C_{24:0}/C_{22:0}$  ratio were also calculated.

### Statistical Analysis

Fishers's Exact Test was employed to compare the signs and symptoms found in the patients with the two different clinical forms of X-ALD. The criterion for significance was  $p < 0,05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

The 15 patient sample included 11 cases of ALD and 4 of AMN. Symptom frequency of these two clinical forms of X-ALD was determined for these cases (table I).

The  $C_{26:0}$  concentration,  $C_{26:0}/C_{22:0}$  ratio and  $C_{24:0}/C_{22:0}$  ratio, were determined (Figure 1). These were from the first plasma sample collected for diagnosis from each patient. The  $C_{26:0}$  plasma concentration (figure 1a) was above normal in all patients. In addition, the  $C_{26:0}/C_{22:0}$  ratio was high in all patients (figure 1b). Due to the increased concentration of  $C_{24:0}$ , the  $C_{24:0}/C_{22:0}$  ratio was high in all patients (figure 1c), except one. In fact, the elevations in  $C_{26:0}$  plasma concentration and  $C_{26:0}/C_{22:0}$  plasma ratio are X-ALD pathognomonic.

ALD patients were diagnosed on average at age 10 although first symptoms were observed at age eight, thus the average interval between suspicion and diagnosis was two years. For AMN patients average age at diagnosis was 27 while symptom onset began at 20, resulting in an average seven year delay. Patients were diagnosed only when neurologic symptoms appeared. Both age at diagnosis and lapse between first symptoms and diagnosis aggravated prognosis since response to treatment is known to depend on precocious diagnosis and absence of neurological symptoms. Diagnosis delay in our cases could be attributed mainly to physicians unawareness of X-ALD, since adrenal insufficiencies are frequently simply diagnosed as Addison's disease, and patients are not investigated for VLCFA accumulation.

Leukodystrophy, adrenal insufficiency, limb weakness, impaired vision and learning difficulties were the main symptoms presented by the X-ALD patients as a whole. Leukodystrophy, impaired vision, school difficulty and poor handwriting were more frequently found in ALD patients. Although not significant ( $p=0.09231$ ), a tendency to impaired vision was observed in ALD patients. Adrenal insufficiency occurred with equal frequency in both

clinical forms. Limb weakness associated with paraparesis was much more frequent in AMN patients ( $p=0.02564$ ). Adrenal insufficiency, hyperpigmentation, seizures, tremor, sphincter and gait disturbances and speech difficulties appeared in both clinical forms with almost equal intensity.

Restriction of dietary VLCFA and Lorenzo's oil is recommended to decrease fatty acid accumulation (Korenke *et al.*, 1995; Moser *et al.*, 1994; Ruiz *et al.*, 1996). In addition, treatment requires supplements with the essential linoleic and linolenic acids. Six of the 15 patients followed this recommendation (one died after five years of treatment). However, as previously mentioned, more favorable prognosis depends on treatment beginning before neurological symptoms appear (Korenke *et al.*, 1995; Moser *et al.*, 1994; Moser, 1995). In 15 Italian ALD boys and 20 American ALD boys presenting neurological symptoms, Lorenzo's oil therapy failed to change the clinical course of the disease (Wanders *et al.*, 1992; Moser *et al.*, 1992). Korenke *et al.* (1995) studied 16 patients treated with Lorenzo's Oil during 19 months. Six of nine neurologically symptomatic patients deteriorated during therapy, and MRI alterations worsened in all patients with clinical deterioration. None of the seven neurologically asymptomatic patients developed neurological symptoms. In none of the 6 patients with normal cranial MRI at start of therapy did MRI deterioration occur during therapy. Follow-up of the neurologically asymptomatic children supports the hypothesis that Lorenzo's oil therapy can prevent development of neurological symptoms. Our own experience with a small number of ALD symptomatic patients however, agrees with the hypothesis that Lorenzo's oil lacks efficacy in these late diagnosed patients.

Adrenal insufficiency, leukodystrophy and limb weakness appeared in 12, 8 and 6 of our 15 patients, respectively. These signs are important in investigating X-ALD and when they occur in males should call for VLCFA level determination. Patients with adrenal insufficiency

but no neurological symptoms always require VLCFA plasmatic analysis, since Lorenzo's oil could prevent or delay clinical manifestation of X-ALD.

The VLCFA plasma level determination in at risk families should be done independently of patient age or symptomatology presence. Detection of index cases in families is important for: (a) detection of further X-ALD cases; (b) treatment of asymptomatic or barely symptomatic cases to avoid or delay symptom appearance, (c) detection of heterozygotes; (d) providing genetic counselling and prenatal diagnosis for at-risk subjects. Although VLCFA analysis is still an important tool for diagnosis of patients and for the treatment follow-up, it is being progressively replaced, for carrier detection and prenatal diagnosis, by the more specific molecular analysis of the X-ALD gene.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Dr. R. J. Wanders and to Dr. P. Vreken, from University Hospital Amsterdam, who kindly provided necessary training for establishing our VLCFA assay methods and for laboratory assistance in investigating some difficult cases. We are also grateful to Dr. Moacir Wajner for valuable comments and suggestions, and to the physicians who referred patients for evaluation. This work was partially supported by CNPq, CAPES, FIPE/HCPA, PROPESP UFRGS, FAPERGS and PRONEX (grant 76.97.1025.00).

## RESUMO

Adrenoleucodistrofia (X-ALD) é uma desordem peroxissomal com padrão de herança ligada ao X, fenotipicamente heterogênea, caracterizada por uma progressiva desmielinização da substância branca do sistema nervoso central e por insuficiência adrenal. Foram investigados por nós 15 pacientes do sexo masculino com sinais clínicos sugestivos de X-ALD, com idade entre 7 e 39 anos, diagnosticados entre 108 pacientes encaminhados para investigação por suspeita clínica. Os níveis plasmáticos dos ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA) foram dosados em nosso laboratório através de Cromatografia Gasosa (CG). Onze (73%) casos da forma infantil de X-ALD (ALD) e 4 (27%) casos de adrenomieloneuropatia (AMN) foram diagnosticados. Insuficiência adrenal, leucodistrofia e fraqueza muscular foram os sinais mais freqüentes, aparecendo em 80%, 53% e 40% dos casos, respectivamente. O conhecimento dos médicos sobre a possibilidade da X-ALD parece ser pequeno, o que pode ser concluído a partir da elevada idade no diagnóstico e do grande intervalo entre o início dos sintomas e o diagnóstico. Neste trabalho, que relata a primeira série brasileira de pacientes com X-ALD, procuramos enfatizar os sinais e sintomas as quais são relevantes para a suspeita diagnóstica, uma vez que a identificação precoce dos casos parece ser importante para o sucesso do tratamento. Além disso, o diagnóstico permite a identificação de portadores, os quais podem se beneficiar do aconselhamento genético e do diagnóstico pré-natal.



## REFERENCES

- Koike, R., Tsuji, S., Ohno, T., Suzuki, Y., Orri, T. and Miyatake, T.** (1991) Physiological significance of fatty acid elongation system in adrenoleukodystrophy. *J. Neurol. Sci.* 103: 188-196.
- Korenke, G.C., Hunneman, D.H., Kohler, J., Stöcker, S., Landmark, K. and Hanefeld, F.** (1995) Glyceroltrioleate/ glyceroltrierucate therapy in 16 patients with X-chromosomal adrenoleukodystrophy/ adrenomyeloneuropathy: effect on clinical, biochemical and neurophysiological parameters. *Eur. J. Pediatr.* 154: 64-70.
- Moser, H. W.** (1993) Lorenzo's oil. *Lancet*, 341: 544.
- Moser, H.W.** (1995) Adrenoleukodystrophy: natural history, treatment and outcome. *J. Inher. Metab. Dis.* 18: 435-447.
- Moser, H.W. and Moser, A.B.** (1991) Measurement of saturated very long chain fatty acid in plasma. In: *Techniques in Diagnostics Human Biochemical Genetics* (Hommes, F.A., ed.). Wiley- Liss, New York, 177-191.
- Moser, H.W., Bergin, A., Naidu, S. and Ledenson, P. W.** (1991) Adrenoleukodystrophy. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* 20: 297-318.
- Moser, H.W., Kok, F., Neumann, S., Borel, J., Bergin, A., Mostafa, S.D., Panoscha, R., Davoli, C., Shankroff, J., Smith, K.** (1994) Adrenoleukodystrophy update: genetic and effect of Lorenzo's oil therapy in asymptomatic patients. *Int. Pediatr.* 9: 196-204.
- Moser, H.W., Moser, A.B., Smith, K.D., Bergin, A., Borel, J., Shankroff, J., Stine, O.C., Merette, C., Ott, J., Krivit, W. and Shapiro, E.** (1992) Adrenoleukodystrophy: phenotypic variability and implications for therapy. *J. Inher. Metab. Dis.* 15: 645-664.
- Ruiz, M., Pampols, T. and Girós, M.** (1996) Glycerol trioate/ glycerol trierucate therapy in X-linked adrenoleukodystrophy: saturated and insaturated fatty acids in blood cells. Implications for the follow-up. *J. Inher. Metab. Dis.*, 19: 188-192.
- Singh, I., Khan, M., Key, L. and Pai, S.** (1998a) Lovastatin for X-linked adrenoleukodystrophy. *N. Eng. J. Med.* 339: 702-703.
- Singh, I., Pahan, K. and Khan, M.** (1998b) Lovastatin and sodium phenylacetate normalise the levels of very long chain fatty acids in skin fibroblasts of X-adrenoleukodystrophy. *FEBS Letters* 426: 342-346.
- Wanders, R.J.A., Barth, P.G., Schutgens, R.B.H. and Tager, J.M.** (1994) Clinical and biochemical characteristics of peroxisomal disorders: an update. *Eur. J. Pediatr.* 153 (suppl 1): S44-S48.

**Wanders, R.J.A., Schutgens, R.B.H. and Barth, P.G.** (1995) Peroxisomal disorders: a review. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 17: 726-739.

**Wanders, R.J.A., Schutgens, R.B.H. And Barth, P.G.** (1996) Peroxisomal disorders. In: *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases* (Blau, N.; Duran, M. and Blaskovics, M.E.). Chapman & Hall Medical, London, pp. 359-376.

**Wanders, R.J.A., Van Roermund, C.W., Wijland, M.J. Van, Schutgens, R.B.H., Schram, A.W., Tager, J.M., Bosch, H.V., Schalkwijk, C.** (1988) X-linked adrenoleukodystrophy: identification of the primary defect at the level of a deficient peroxisomal very long chain fatty acyl-Coa syntetase using a newly developed method for the isolation of peroxisomes from skin fibroblasts. *J. Inher. Metab. Dis.* 11: 173-177.

**Wanders, R.J.A., Van Roermund, C.W.T., Lageweg, W., Jakobs, B. S., Schutgns, R. B. H., Nijenheis, A . A . and Tager, J. M.** (1992) X-linked adrenoleukodystrophy: biochemical diagnosis and enzyme defect. *J. Inher. Metab. Dis.* 15: 634-644.

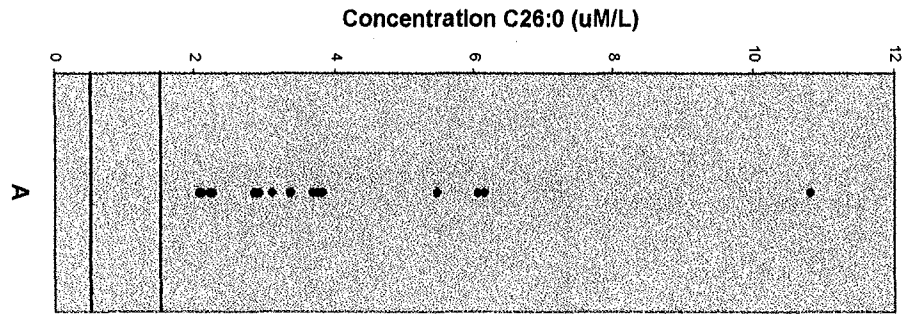
## FIGURE LEGEND

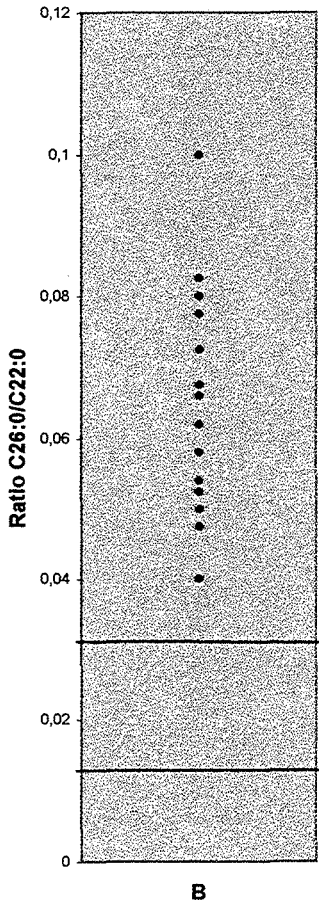
**Figure 1** – Very long chain fatty acids levels in 15 Brazilian patients with X-linked adrenoleukodystrophy: (a) C26:0 plasma concentration; (b) C26:0/C22:0 ratio; (c) C24:0/C22:0 ratio. The horizontal solid lines indicate upper ( $X + 2SD$ ) and lower ( $X - 2SD$ ) reference values, calculated with samples from 30 healthy subjects. SD= standard deviation.

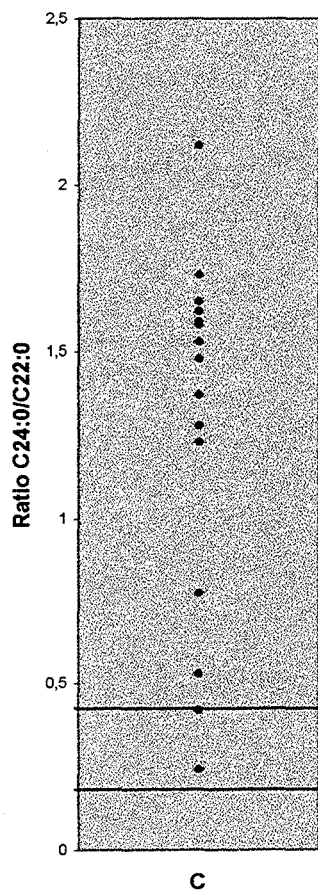
**Table I** - Frequency of signs and symptoms in the 15 X-linked adrenoleukodystrophy Brazilian patients.

Signs and symptoms	Adrenoleukodystrophy patients (n=11)	Adrenomyeloneuropathy patients (n=4)
Leukodystrophy	10	2
Adrenal insufficiency	6	5
Limb weakness *	2	4
Impaired vision	6	-
Learning difficulty	5	1
Speech difficulty	4	1
Hyperpigmentation	4	1
Seizures	4	1
Paraparesis *	1	3
Poor handwriting	4	-
Tremor	3	1
Behavioral disturbances	2	2
Gait disturbances	2	1
Sphincter disturbances	2	1
Abdominal pain	2	-
Neuronal deterioration	2	-
Impaired hearing	1	1
Hyperactivity	1	1
Vomiting and prostration	2	-
Atypic facies	1	-
Progressive ataxia	1	-
Cianosis	1	-
Attention deficit	1	-
Headaches	1	-
Microcephaly	1	-
Hypotrophy	-	1
Aphasia	1	-
Cerebral edema	1	-
Enuresis	1	-
Hyponatremy	1	-
Hemiparesy	1	-
Pneumonia	1	-
Gastroesophagic bleeding	1	-
Mild dementia	1	-
Average age for presenting signs (years)	8	20
Average age at diagnosis (years)	10	27

\* ( $p < 0,05$ , Fisher's Exact Test)







**Clinical and biochemical findings in 7 patients with X-linked  
adrenoleukodystrophy treated with Lorenzo's Oil**

*Carmen R Vargas<sup>1</sup>, Alethéa G Barschak<sup>1</sup>, Daniella M. Coelho<sup>1</sup>,  
Vivian Furlanetto<sup>1</sup>, Carolina F. M. de Souza<sup>1</sup>, Simone M. Karam<sup>1</sup>, Laura Jardim<sup>1</sup>,  
Roberto Giugliani<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> Medical Genetics Service, University Hospital of Porto Alegre

<sup>2</sup> Department of Biochemistry, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

**Running title**

Treatment of adrenoleukodystrophy

**Key words**

Adrenoleukodystrophy, Adrenomyeloneuropathy, Lorenzo's Oil, Peroxisomes,  
Very Long Chain Fatty Acids

**Author for correspondence**

Carmen Regla Vargas  
Serviço de Genética Médica  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Rua Ramiro Barcelos, 2350  
90035-003 – Porto Alegre – RS – Brasil



## Abstract

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is a hereditary disorder of peroxisomal metabolism biochemically characterized by the accumulation of very long chain fatty acids (VLCFA) in different tissues and in biological fluids. The major accumulated acids are hexacosanoic acid (C<sub>26:0</sub>) and tetracosanoic acid (C<sub>24:0</sub>). The disorder is clinically characterized by central and peripheral demyelination and adrenal insufficiency which is closely related with the accumulation of these fatty acids. The incidence of this condition is estimated at 1 in 25,000 males. At least six phenotypes can be distinguished, being childhood cerebral ALD and adrenomyeloneuropathy (AMN) the most common. The recommended therapy consists of the use of the glyceroltrioleate/glyceroltrierucate (GTO/GTE) mixture known as Lorenzo's Oil, combined with a VLCFA-poor diet. There are also other alternative treatments such as bone marrow transplantation and immunosuppression, as well as the use of lovastatin and sodium phenylacetate.

In the present study we evaluated treatment with Lorenzo's Oil associated with a VLCFA-restricted diet in 7 male patients with X-ALD in terms of their clinical and biochemical course. Treatment produced 50% reduction in C<sub>26:0</sub> and 42.8% reduction in the C<sub>26:0</sub>/C<sub>22:0</sub> ratio. Most patients remained clinically well, although approximately 30% of them presented a rapid deterioration of their clinical condition. The results showed a poor biochemical-clinical correlation for

treatment, indicating that new therapies for X-ALD are needed in order to obtain a better prognosis for affected patients.

## Introduction

Adrenoleukodystrophy (X-ALD) is a of X-linked metabolic disorder (Ruiz M, Pampols t & Giros M, 1996), the most common peroxisomal disease (Geel B M van *et al* ,1997; Wanders R J A *et al* ,1995; Wanders R J A *et al*, 1993), with a frequency estimated at 1:25,000 males (Moser H W, 1997).

Peroxisomes catalyze various essential metabolic reactions (Wanders R J A *et al*, 1995; Wanders R J A *et al*, 1993). Peroxisomal diseases can be classified into three groups according to the extent of loss of peroxisomal function: generalized, multiple or simple (Geel B M van *et al*, 1997; Wanders R J A *et al* , 1995; Wanders R J A *et al*, 1993). X-ALD is included in the last group, since, in this case, peroxisomes are unable to perform  $\beta$ -oxidation (Geel B M van *et al*, 1997; Wanders R J A *et al*, 1995), i.e., there is an impairment in shortening the chains of fatty acids and of their derivatives (Wanders R J A *et al*, 1995; Wanders R J A *et al*, 1993).

X-ALD is biochemically characterized by the accumulation of very long chain fatty acids (VLCFA) in tissues and in biological fluids (Moser H W, 1997; Moser H W *et al*, 1994; Scriver C R *et al*, 1995; Yamada T *et al*, 1999). The major accumulated saturated fatty acids are hexacosanoic acid (C<sub>26:0</sub>) and tetracosanoic acid (C<sub>24:0</sub>) (Korenke G C *et al*, 1995; Moser H W *et al*, 1991). The increased concentrations of these metabolites cause progressive demyelination of white matter in central nervous system and adrenal insufficiency (Ruiz M, Pampols t & Giros M,1996; Moser H W, 1997; Wanders R J A *et al*, 1992).

A defect in the long-chain acyl-CoA ligase (Moser H W *et al* , 1994; Moser H W ,1995) causes the accumulation of VLCFA which are not oxidized in the peroxisomes (Moser H W, 1997; Moser H W *et al*, 1994; Scriver C R *et al*, 1995; Moser H W, 1995). Mapping and isolation of the X-ALD gene have shown that the gene codes for a peroxisomal membrane protein, ALD protein (ALDP), which belongs to the superfamily of the ATP-bound carrier proteins (Moser H W, 1997; Moser H W *et al*, 1994; Yamada T *et al*, 1999; Moser H W, 1995). Those observations indicate that this protein is somehow way involved in the process of VLCFA oxidation (Moser H W, 1997; Moser H W *et al*, 1994).

X-ALD is clinically heterogeneous, with the occurrence of different phenotypes (i.e., childhood cerebral form (ALD), juvenile cerebral form, adult cerebral form, adrenomyeloneuropathy (AMN), isolated Addison disease, and asymptomatic patients) (Geel B M van *et al*, 1997; Moser H W, 1997; Scriver C R *et al*, 1995; Moser H W *et al*, 1991; Moser H W, 1995), which can be manifested within the same family (Geel B M van *et al*, 1997; Moser H W, 1997; Moser H W *et al*, 1994; Scriver C R *et al*, 1995; Korenke G C *et al*, 1995; Moser H W *et al*, 1991). Among these different clinical forms, the most common ones are ALD and AMN. The first manifests before 10 years of age and involves a rapid progression of neurologic symptoms leading the patient to a vegetative state most of the times within 3 years (Moser H W, 1997; Moser H W *et al*, 1994; Scriver C R *et al*, 1995; Korenke G C *et al*, 1995; Moser H W *et al*, 1991). AMN manifests between 20 and 40 years of age and is characterized by progressive paraparesis involving disorders of the spinal cord (Geel B M van *et al*, 1997;

Moser H W, 1997; Korenke G C *et al*, 1995; Moser H W *et al*, 1991), with approximately 50% of the patients showing cerebral involvement (Geel B M van *et al*, 1997; Moser H W, 1997; Moser H W *et al*, 1991).

Treatment of X-ALD started with the indication of a restricted ingestion of VLCFA. However, this diet do not succeed, since fatty acids are not only of exogenous origin, being also synthesized by the organism (Moser H W, 1997; Scriver C R *et al*, 1995; Moser H W, 1995). Thus, a diet combining VLCFA restriction and ingestion of monounsaturated oleic acid (glyceroltrioleate, GTO) was proposed and within 4 months reduced by 50% the levels of C<sub>26:0</sub> in the plasma of X-ALD patients (Moser H W, 1997; Scriver C R *et al*, 1995; Moser H W, 1995). It was later demonstrated that a mixture of monounsaturated erucic acid (glyceroltrierucate, GTE) with GTO at the 4:1 proportion, called Lorenzo's Oil, combined with a VLCFA-poor diet normalized plasma C<sub>26:0</sub> levels within one month (Moser H W, 1997; Scriver C R *et al*, 1995; Moser H W, 1995). However, after a few years of study, the effectiveness of this treatment with Lorenzo's Oil was questioned since it did not prevent the progression of preexisting neurologic symptoms (Geel B M van *et al*, 1997; Scriver C R *et al*, 1995; Restuccia D *et al*, 1999).

Therefore, considering that at the moment there is a controversy of the effectiveness of this therapy for patients affected by X-ALD, the objective of the present study was to evaluate the clinical and biochemical course of 7 Brazilian patients treated with Lorenzo's Oil and a VLCFA-restricted diet, in the hope to clarify this point.

## **Material and Methods**

### **a) Patients and Controls**

In the present study we evaluated 7 patients with X-ALD under treatment with a VLCFA-poor diet and Lorenzo's Oil. In average, in diagnosis, ALD patients were 10 years old and AMN patients were 29 years old. A total of 40 blood collections were performed to determine plasma VLCFA. A group of 30 normal individuals was also studied for the determination of the normal values. The patient and control groups were of similar age (7 to 38 years). Blood was collected with heparin as anticoagulant, the plasma was separated and stored frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until the time of analysis.

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.

### **b) Methods**

VLCFA were analyzed by the technique of Moser (Moser H W and Moser A B, 1991). A 25  $\mu\text{L}$  volume of the internal standard ( $\text{C}_{27:0}$ -heptacosanoic acid) was added to 100  $\mu\text{L}$  of plasma. Chloroform:ethanol mixture (1:1) was then added for VLCFA extraction from plasma. After centrifugation, the supernatant was mixed with distilled water and chloroform to remove the precipitated protein. After a new centrifugation, the lower phase was evaporated with nitrogen vapor ( $\text{N}_2$ ) and chloroform-methanol (2:1) was used to redissolve the lipids. Methanolic

HCl (3 N) was added to each dried total lipid extract and the tubes were thoroughly sealed and kept at 75°C for 16 hours for the formation of fatty acid methyl esters, which were then purified by thin-layer chromatography. Plates (0.25 µm silica gel G 20x20) were prewashed with chloroform:methanol:acetic acid:water (52:20:7:3) and hexane:ether:acetic acid (90:10:1). After sample application to the plate, the chromatographic run was performed using toluene:ether (97:3) as eluent. After air drying for 16 hours, the samples were stained with iodine vapor. The methyl esters of VLCFA were extracted from the silica 3 times using hexane. After drying with N<sub>2</sub> vapor, the samples were redissolved with 50 µL hexane and analyzed by gas chromatography using a Varian apparatus with an HP-5 column (5% methylphenyl silicone, 0.33 µm film thickness, 0.2 mm inner diameter and 25 m in length), a flame ionization detector, with an injector of the split/splitless type, and helium as the mobile phase. The concentrations of C<sub>22:0</sub> (docosanoic acid), C<sub>24:0</sub> (tetracosanoic acid) and C<sub>26:0</sub> (hexacosanoic acid) were determined comparing with controls of various concentrations and the C<sub>26:0</sub>/C<sub>22:0</sub> and C<sub>24:0</sub>/C<sub>22:0</sub> ratios were calculated.

### c) Treatment

The treatment used by the patients under study consisted of a VLCFA-restricted diet and the use of Lorenzo's Oil (Geel B M *et al*, 1997; Moser H W *et al*, 1992) in specific amounts for each patient according to body weight (1.2 mL/Kg/day), platelet numbers and plasma VLCFA levels. Table I indicates the

duration of treatment and the doses of Lorenzo's Oil used by our patients with X-ALD.

Supplementation with multivitamins, minerals and an additional source of essential fatty acids (Moser H W, 1995), linoleic acid and linolenic acid found in saffron oil and fish oil was recommended.

In general, restriction of VLCFA ingestion can be achieved by eating the following foods: non-fatty dairy products, lean beef and pork cuts, chickens without skin and low-fat fish, plus fruits and vegetables. The main foods to be avoided are saturated fats such as industrialized fats (butter, cream, milk, ice cream), fats present in meat and meat derivatives, and vegetable oil.



## Results

Figure 1 (a, b and c) illustrates the plasma concentration of  $C_{26:0}$  and the  $C_{26:0}/C_{22:0}$  and  $C_{24:0}/C_{22:0}$  ratios, respectively, during the various phases of patient treatment. Figure 1a shows that  $C_{26:0}$  levels were markedly decreased in all patients after the beginning of treatment and remained relatively close to normal value throughout most of the period of treatment. Figure 1b shows that the  $C_{26:0}/C_{22:0}$  ratio was reduced in all patients except patient ALD 2 after the beginning of therapy, although this ratio was reduced in this patient in the third phase of treatment. The ratio was reduced to levels closer to normal ones in all patients.

A wide variability in  $C_{24:0}/C_{22:0}$  ratios (Figure 1c) was observed throughout treatment in all X-ALD patients except patient ALD 3 who presented a  $C_{24:0}/C_{22:0}$  ratio more constantly close to normality.

Table II describes terms the clinical situation of X-ALD patients under dietary treatment in percentage terms, most of whom show no major complications during therapy. Gastrointestinal disturbances like vomiting and diarrhea were related, and low platelet count was a common finding. Only one patient presented a severe worsening of the clinical picture, and one death occurred during therapy. It is important to mention that all ALD patients (and none AMN patient) had abnormal CT scan.

## **Discussion**

We described here our experience on the treatment with Lorenzo's Oil of 7 X-ALD patients (2 patients with AMN and 5 patients with ALD), with a mean duration of treatment of 24 months. All patients were diagnosed late and started treatment when irreversible neurologic symptoms were already present.

The patients presented high plasma levels of C<sub>26:0</sub> and of the C<sub>26:0</sub>/C<sub>22:0</sub> ratio at the time of diagnosis.

Plasma C<sub>26:0</sub> levels were above 2.86 μmol/L (normal levels: 0.32 to 1.56 μmol/L) in 62% of the determinations made in the 7 patients treated for X-ALD during the treatment period. However, plasma C<sub>26:0</sub> levels were drastically reduced in these patients after the onset of treatment, remaining, on average, 58% below initial values throughout treatment. In the assessment of treatment, it is important to consider the difficulty in complying with a VLCFA-poor diet and in correctly ingesting the oil, since the family itself often conducts treatment in a faulty manner, a fact that may lead to variations in plasma VLCFA levels during therapy.

In parallel, 57.1% of these patients remained without major complications (ALD patients numbers 2 and 5 and AMN patients numbers 1 and 2, see Table III) during the same period of time, while 28.6% (ALD patients numbers 3 and 4, see Table III) presented rapid deterioration, with 1 of them dying. These results show that there is no clear correlation between the biochemical and clinical

parameters measured in patients submitted to the dietary treatment supplemented by the Lorenzo's Oil.

Moser et al. (1994), in a study of 50 patients with no neurologic symptoms also treated with GTO/GTE, observed that 56% of them were well during treatment, 14% of them had alterations in cerebral nuclear magnetic resonance (NMR) image or in cognitive function, whereas in another 14% the NMR image was significantly worse. In addition, in 8% of the patients, besides a worsened NMR image, there was mild or moderate behavioral and cognitive function damage. In the remaining 8% there was a rapid development of the progressive infantile cerebral phenotype. Furthermore, 65% of the individuals achieved a significant decrease in plasma C<sub>26:0</sub> concentration which remained within normal limits in 40% of them. In 17% of the patients there was a small reduction in hexacosanoic acid concentration, and in the remaining 17% there was no reduction, probably due to their inability to follow the dietary regimen.

Another 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 neurologic symptoms at the diagnosis (Wanders R J A *et al*, 1992; Moser H W *et al*, 1992). In addition, Korenke *et al*. (1995) assessed the results of treatment with the GTO/GTE mixture in 16 patients, 7 of them asymptomatic. Three died and 3 showed a worsened clinical course, while the 7 asymptomatic patients remained clinically stable during treatment. Follow-up of these asymptomatic patients showed that in those under dietary treatment a mild neurologic abnormality remained stable

for long periods of time. The data suggest that early administration of Lorenzo's Oil reduces the frequency and severity of the subsequent neurologic deficiencies. However, these data should be interpreted with caution since recent studies have indicated that Lorenzo's Oil does not penetrate the brain, a fact that questions the theoretical basis for the GTO/GTE mixture. In line with this assumption, other studies carried out by Moser (1997) have indicated that, whereas erucic acid is found in the liver and in adipose tissue *post mortem*, it is not demonstrable in the brain. Therefore, since erucic acid does not reach the brain in adequate concentrations, it is unlikely that an effect occurs with the currently prescribed dose of Lorenzo's Oil. Other analyses have indicated that C<sub>26:0</sub> levels observed *post mortem* in cerebral tissue of X-ALD patients treated with Lorenzo's Oil do not differ from those of untreated patients (Moser H W, 1995).

Recent studies have demonstrated that not only C<sub>24:0</sub> and C<sub>26:0</sub> would be elevated in X-ALD, but also the monounsaturated VLCFA C<sub>24:1</sub> (Sandhir R *et al*, 1998). In this present study, wide variability in the C<sub>24:0</sub>/C<sub>22:0</sub> ratio was observed in most of the patients, perhaps due to the lack of administration of the essential fatty acids linolenic acid and linoleic acid. Taken together these observations, it seems that treatment based on a special diet combined with Lorenzo's Oil should be reevaluated.

The authors conclude that new therapies are needed for X-ALD in order to obtain a better prognosis for the patients with slower progression or even reversal of the symptoms. Other therapies such as bone marrow transplantation

or immunosuppression have been used for X-ALD treatment in most cases with non satisfactory results (Geel B M van *et al*, 1997; Moser H W, 1997; Scriver C R *et al*, 1995). In addition, new drugs such as lovastatin and sodium phenylacetate, which increase peroxisomal  $\beta$ -oxidation of VLCFA are being tested in order to normalize tissue VLCFA levels, and appear to provide a more effective clinical response (Singh I *et al*, 1998). Gene therapy also arises as a future possibility for the treatment of X-ALD.

## Resumo

A adrenoleucodistrofia ligada ao X (X-ALD) é uma desordem hereditária do metabolismo peroxissomal, bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo de ácidos graxos de cadeia muito longa ('very long chain fatty acids'- VLCFA) em diferentes tecidos e em fluidos biológicos, sendo os principais ácidos acumulados o hexacosanóico ( $C_{26:0}$ ) e o tetracosanóico ( $C_{24:0}$ ). O acúmulo destes ácidos graxos está associado com desmielinização cerebral e insuficiência adrenal. A incidência desta condição é estimada em 1 para 25.000 em homens. Pelo menos seis fenótipos podem ser distinguidos, sendo a adrenoleucodistrofia cerebral infantil (ALD) e a adrenomieloneuropatia (AMN) os mais comuns. O tratamento preconizado consiste na utilização da mistura gliceroltrioleato/gliceroltrierucato (GTO/GTE), conhecida como Óleo de Lorenzo, combinada com dieta pobre em VLCFA. Existem ainda, terapias alternativas como transplante de medula óssea e imunossupressão, além da utilização de lovastatina e fenilacetato de sódio.

Neste trabalho fez-se uma avaliação do tratamento com Óleo de Lorenzo associado à dieta restrita em VLCFA de 7 pacientes homens com X-ALD analisando a evolução clínica e bioquímica. Os pacientes apresentaram um redução média de 50% nos valores de  $C_{26:0}$  e de 42,8% na razão  $C_{26:0}/C_{22:0}$  após o início do tratamento. A maioria dos pacientes permaneceu clinicamente bem e aproximadamente 30% dos pacientes apresentaram uma progressão

rápida no curso clínico da doença. Parece não haver uma clara correlação bioquímico-clínica do tratamento.

Os resultados nos mostram que novas terapias mais eficazes para X-ALD são necessárias para que se possa obter um melhor prognóstico da doença com progressão mais lenta dos sintomas apresentados ou mesmo reversão dos sintomas já presentes nos pacientes.

## References

- Geel B M van, 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.
- Korenke G C, Hunneman D H, Kohler J, Stöckler, 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.
- Moser H W** (1995). Adrenoleukodystrophy: natural history, treatment and outcome. *J. Inher. Metab. Dis.*, 18: 435-447.
- Moser H W** (1997). Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain*, 120: 1485-1508.
- Moser H W and Moser A B** (1991) Adrenoleukodystrophy. *Endocrinol Metabolic Clin N Am*, 20: 297-318.
- Moser H W, Bergin A, Naidu S & Ladenson P W** (1991). Adrenoleukodystrophy. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 20 (2): 297-318.
- Moser H W, Kok F, Neumann S, Borel J, Bergin A, Mostafa S D, Panoscha R, Davoli C T, Shankroff J & Smith K D** (1994). Adrenoleukodystrophy update: Genetics and effect of Lorenzo's Oil therapy in asymptomatic patients. *Int. Pediatr.*, 9: 196-204.



- 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** and (1992). Adrenoleukodystrophy: Phenotypic variability and implications for therapy. *J. Inher. Metab. Dis.*, 15: 645-664.
- Restuccia D, Lazzaro V Di, Valeriani M, Oliviero A, Pera D Le, Barba C, Cppa M, Bertini E, Capua M Di & Tonali P** (1999). Neurophysiologic follow-up of long-term dietary treatment in adult-onset adrenoleukodystrophy. *Neurology*, 52 (March): 810-815.
- Ruiz M, Pampols T & Girós M** (1996). Glycerol trioleato/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.
- Sandhir R, Kahn M, Chahal A & Singh I** (1998). Localization of neuronal acid beta-oxidation in human and rodent peroxisomes. Impaired oxidation in Zellweger syndrome and X-linked adrenoleukodystrophy. *J. Lipid Research*, 39: 2161-2171.
- Scriver C R, Beaudet A L, Sly W S & Valle D** (Ed.)(1995). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7ed. Mc Graw-Hill, United States. V. II.
- Singh I, Pahad K & Khan M** (1998). Lovastatin and sodium phenylacetate normalize the levels of very long chain fatty acids in skin fibroblasts of X-adrenoleukodystrophy. *FEBS Letters*, 426: 342-346.

- Wanders R J A, Roermund C W T van, Lageweg W, Jakobs B S, Schutgens R B H, Nijenhuis A A & Tager J M (1992).** X-linked adrenoleukodystrophy: Biochemical diagnosis and enzyme defect. *J. Inher. Metab. Dis.*, 15: 634-644.
- Wanders R J A, Schutgens R B H & Barth P G (1995).** Peroxisomal Disorders: A Review. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 54 (5): 726-739.
- Wanders R J A, Schutgens R B H, Barth P G, Tager J M & Bosch H van den (1993).** Postnatal diagnosis of peroxisomal disorders: A biochemical approach. *Biochemie*, 75: 269-279.
- Yamada T, Taniwaki T, Shinnoh N, Uchiyama A, Shimosawa N, Ohyagi Y, Asahara H & Kira J (1999).** Adrenoleukodystrophy protein enhances association of very-long acyl-coenzyme A synthetase with the peroxisome. *Neurology*, 52 (February): 614-616.

**Table I** – Duration of therapy and doses of Lorenzo's Oil used for X-ALD patients under dietary treatment

<b>Patients</b>	<b>Oil dose (L/month) and mL/kg/day</b>	<b>Duration of therapy (months)</b>
<b>ALD</b>		
1	2 and 1.2	13
2	2 and 1.2	33
3	1.6 and 1.2	18
4	2.0 and 1.6	6
5	3.0 and 2.0	12
<b>AMN</b>		
1	3 and 1.2	40
2	3 and 1.2	27

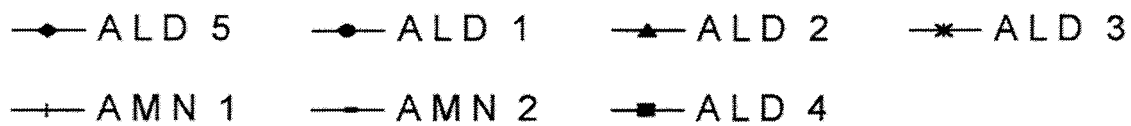
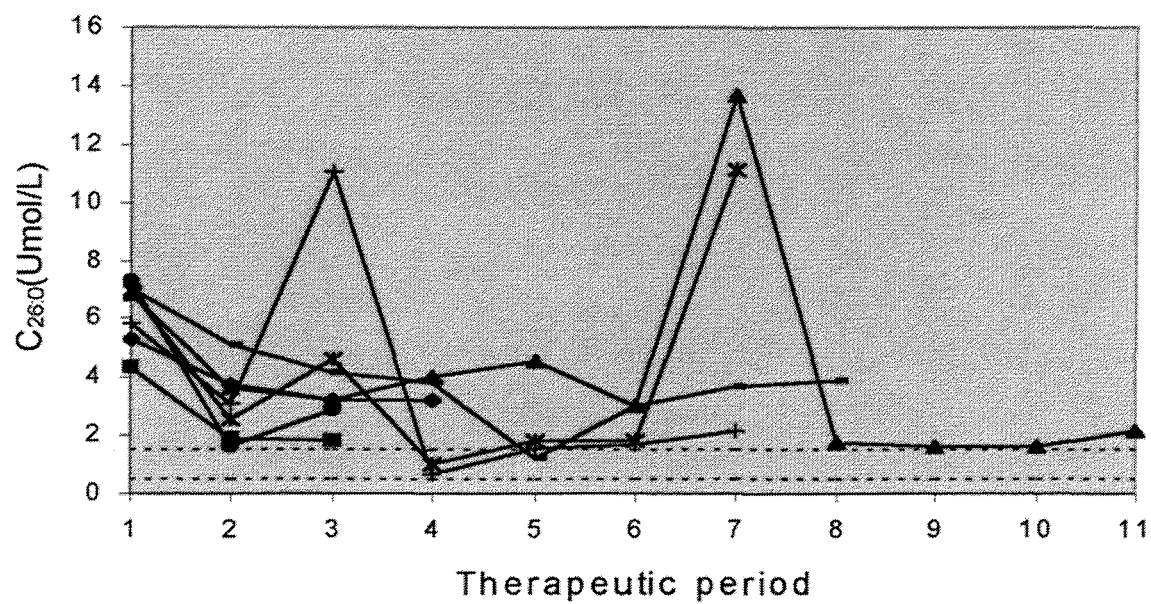
**Table II** – Situation of X-ALD patients under treatment with Lorenzo's Oil

<b>Situation</b>	<b>Percentage (%)</b>
No noticeable disease progression or major complications	57.1
Slightly worsening in CT image	14.3
Severe worsening	14.3
Death	14.3

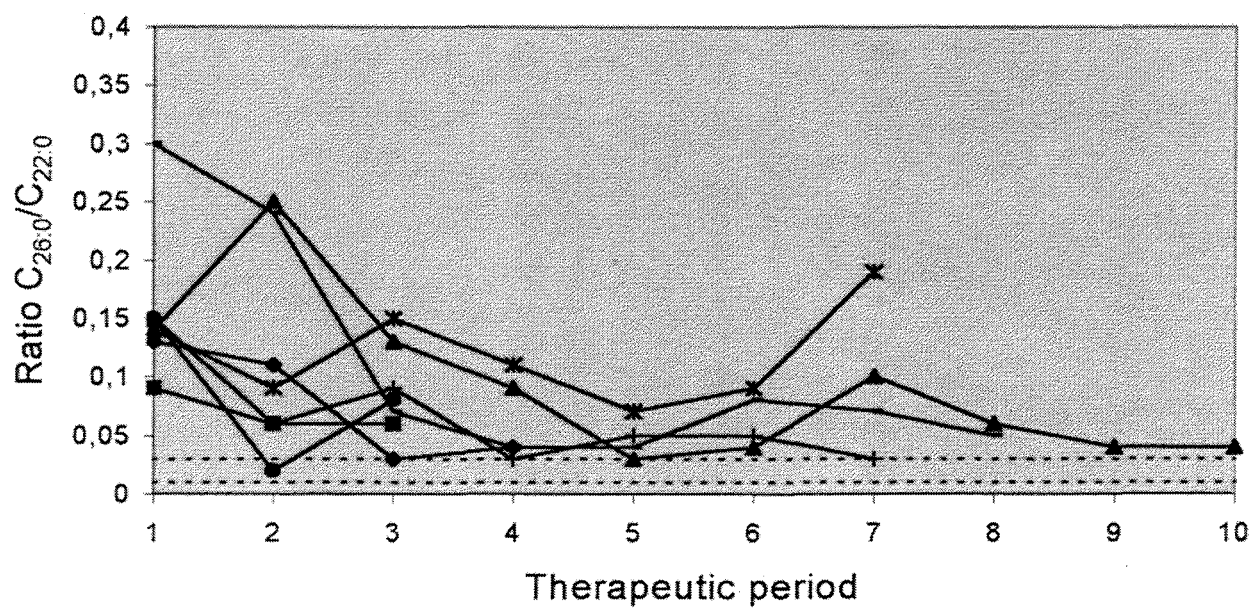
Figure legend

**Figure1** - (a) Plasma  $C_{26:0}$  levels, (b)  $C_{26:0}/C_{22:0}$  ratio, and (c)  $C_{24:0}/C_{22:0}$  ratio at different times of treatment of X-ALD patients with Lorenzo's Oil. The broken lines indicate the normal ranges. The continuous lines with different symbols indicate 5 ALD patients and 2 AMN patients.

(a)

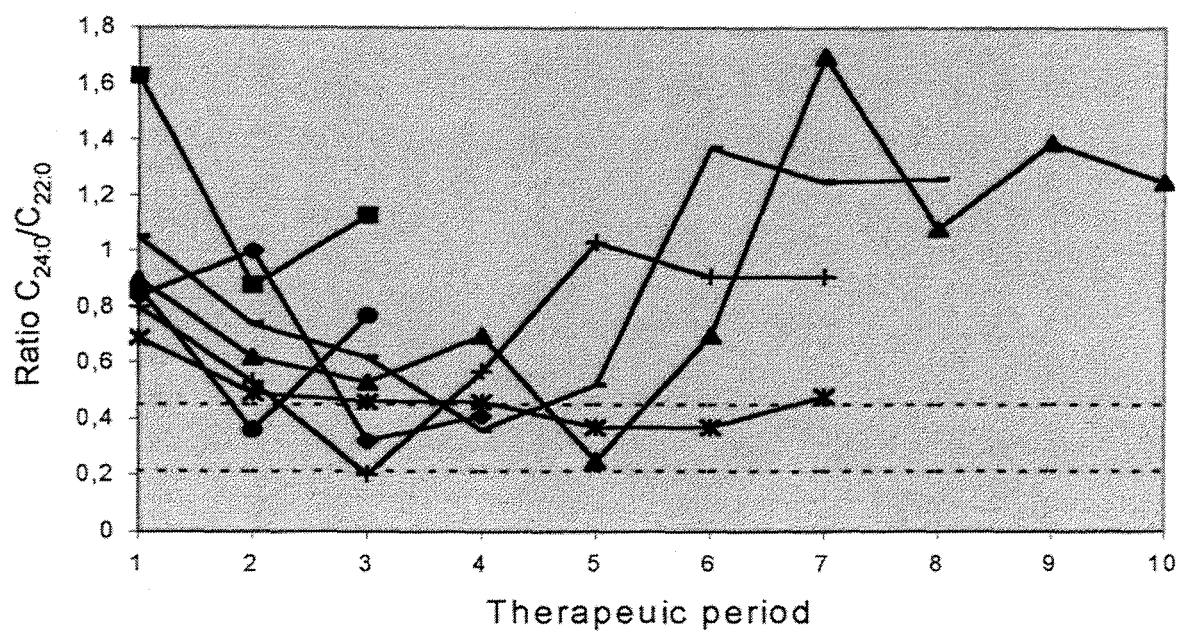


(b)



—●— ALD 5    —●— ALD 1    —▲— ALD 2    —\*— ALD 3  
—+— AMN 1    —— AMN 2    —■— ALD 4

(c)



—●— AMN 1    —●— ALD 1    —▲— ALD 2    —\*— ALD 3  
—+— AMN 2    —— AMN 3    —■— ALD 4