

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Manifestações neurológicas e neurofisiológicas, padrão  
de inativação do X e biomarcadores nas heterozigotas  
para Adrenoleucodistrofia ligada ao X.**

Aluna: Clarissa Troller Habekost

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia  
Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em  
Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Laura Bannach Jardim

Porto Alegre

Outubro de 2013

## **Agradecimentos**

Agradeço aos pacientes pelo interesse, dedicação e confiança depositada em mim durante todo o desenvolvimento deste estudo, à Ana Louzada pelo apoio técnico e tempo dedicado a este estudo, à Karina Donis e ao Jonax Alex Saute pelo trabalho na continuidade da assistência aos pacientes, à Débora Blank pelo apoio nas etapas iniciais do estudo, ao Departamento de Genética e ao Centro de Pesquisa Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, à minha banca Dra Carolina Fishinger de Moura Souza, Dr Fernando Kok e Professor Dr Roberto Giugliani e, em especial, à minha orientadora Professora Laura Bannach Jardim por seu intenso apoio e ensinamentos durante todo o processo de elaboração deste estudo.

## **Financiamento**

Este estudo foi financiado pelo FIPE-HCPA. Habekost CT foi financiada por INAGEMP e FAPERGS. Pereira FS foi financiada pelo INAGEMP e CAPES. Pereira FS, Matte U, Portela LV, Torrez, V and Jardim LB foram financiados pelo CNPq.

## I. Sumário

	Página
I. Sumário	04
II Lista de abreviaturas	05
III. Resumo	07
IV. Abstract	09
V. Introdução	11
1. A Adrenoleucodistrofia Ligada ao X	11
2. Aspectos moleculares da Adrenoleucodistrofia Ligada ao X	12
3. A proteína da X- ALD	13
4. Fisiopatologia da X-ALD	15
5. Os VLCFA e a X-ALD	20
6. A apresentação clínica da Adrenoleucodistrofia Ligada ao X	21
6.1 A forma cerebral infantil	22
6.2 A adrenomielloneuropatia	22
6.3 A insuficiência adrenal isolada	22
6.4 A apresentação clínica das mulheres heterozigotas	22
7. Por que parte das heterozigotas se torna sintomáticas? A inativação do cromossomo X.	25
8. O tratamento relevante para as mulheres heterozigotas	28
9. Possíveis biomarcadores de dano axonal	30
9.1 A Enolase como marcador de lesão neuronal	31
10. Eletrofisiologia e Adrenoleucodistrofia Ligada ao X	31
VI. Justificativas	35
VII. Objetivos	36
1. Objetivos Gerais	36
2. Objetivos específicos	36
VIII. Neurological impairment among heterozygote women for X-linked Adrenoleukodystrophy: a case control study on a clinical, Neurophysiological and biochemical characteristics	37
IX. Discussão	75
X. Conclusões	782
XI. Referências Bibliográficas	83
XII. Anexos	94
1. Termo de consentimento livre e informado	94
2. Termo de consentimento livre e esclarecido	97
3. Escala SSPROM	99
4. Escala JOA	105

## II. Lista de abreviaturas

ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ABCD1	ATP binding cassette, subfamília D, membro 1.
AE	<i>Age at examination</i>
ALDP	Adrenoleukodystrophy protein
AMN	Adrenomieloneuropatia
AO	<i>Age at onset of symptoms</i>
ATP	Adenina Trifosfato
C22:0	Ácido Docosanóico
C24:0	Ácido Tetracosanóico
C26:0	Ácido Hexacosanóico
CALD	Adrenoleucodistrofia forma cerebral
CCALD	Adrenoleucodistrofia forma cerebral infantil
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CMAP	Potencial de ação muscular composto (ou do inglês - <i>Compound muscle action potential</i> )
CoA	Coenzima A
CPc	Córtex contralateral
CPI	Córtex ipsilateral
CPz	Linha media do córtex
CST	Corticospinal tract
DC	Dorsal column
DD	Duração da doença (ou do inglês – <i>duration of disease</i> )
DNA	Ácido Desoxiribonucleico (ou do inglês - <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
ELOVL3	<i>elongation of very long-chain fatty acids like3</i>
FIM	<i>Functional Independence Measure</i>
FTA-Abs	<i>Fluorescent Treponemal Antibody- absorption</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HMG	<i>hidroxi-3-methyl-glutaril</i>
HTLV	<i>Human T lymphotropic virus</i>
IE	Idade ao exame
II	Idade de início dos sintomas
JOA	<i>Japanese Orthopaedic Association Scores System</i>
MEP	Potencial Evocado Motor (do inglês – <i>motor evoked potential</i> )
m-NCV	Velocidade de condução motora (ou do inglês - <i>Motor nerve conduction velocity</i> )
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro (ou do inglês – <i>Messenger Ribonucleic acid</i> )
NADPH	Fosfato dinucleótido de nicotinamida e adenina (ou do inglês - <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> )
NSE	Enolase
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
SAHA	Ácido suberoilânido hidroxâmico (do inglês - <i>suberoylanilide hydroxamic acid</i> )
SEP	Potencial evocado sensitivo (ou do inglês – <i>sensory evoked potential</i> )
SNAP	Potencial de ação sensitivo (ou do inglês – <i>sensory nerve action</i> )

	<i>potencial)</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
s-NCV	Velocidade de condução sensitiva (ou do inglês –( <i>Sensory nerve conduction velocity</i> )
SSER	Potencial Evocado Somatossensitivo (ou do inglês - <i>Somatosensory evoked responses</i>
SSPROM	<i>Progressive Myelopathy Score System</i>
VDRL	<i>Venereal disease research laboratory</i>
VEP	Potencial evocado visual (ou do inglês – <i>visual evoked potential</i> )
VLCFA	Ácidos Graxos de Cadeia Muito Longa (do inglês – <i>very long chain fatty acids</i> )
X-ALD	Adrenoleucodistrofia Ligada ao X (ou do inglês X-linked Adrenoleukodystrophy)

### III. Resumo

A Adrenoleucodistrofia ligada ao X (X-ALD) é uma doença hereditária dos peroxissomos causada por mutações no gene *ABCD1* -ATP-binding cassette (ABC), subfamília D, membro 1- um meio transportador peroxissômico: a proteína da adrenoleucodistrofia (ALDP). Bioquimicamente, a X-ALD é caracterizada pelo acúmulo de ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA) e pelo impedimento parcial da  $\beta$ -oxidação destes lipídeos no peroxissomo. O espectro clínico masculino varia desde insuficiência adrenal isolada, mieloneuropatia lentamente progressiva (AMN) a desmielelinização cerebral generalizada. As heterozigotas sintomáticas desenvolvem um quadro degenerativo e lentamente progressivo similar a AMN masculina. Por apresentarem a forma “pura” AMN, as heterozigotas foram escolhidas como modelo de estudo da mieloneuropatia da X-ALD. Estudamos uma coorte de 33 heterozigotas em relação a suas manifestações neurológicas e neurofisiológicas e correlacionamos à idade, duração da doença, tipos e localização das mutações, padrão de inativação do cromossomo X e através de um marcador de dano neuronal: a Enolase (NSE). Métodos: 39 heterozigotas previamente diagnosticadas em nossa instituição foram convidadas a participar e, após o consentimento, 37 realizaram o *screening* inicial. Quatro foram excluídas por apresentarem outras possíveis causas de mieloneuropatia. Trinta e três foram incluídas no grupo final e avaliadas através de duas escalas clínicas para mielopatia (JOA e SSPROM), de estudos de neurocondução periférica (NCS) e de potenciais evocados somatossensitivos (SEP). O padrão de inativação foi estudado através do ensaio de metilação HUMARA e a NSE medida através de ensaio de eletroquimiluminescência. Os dados foram correlacionados com variáveis demográficas e tipo e posição da mutação. C26:0 e C26:0/C22:0 previamente coletados também foram analisados. Resultados: 33 mulheres (29 sintomáticas) foram avaliadas. Sintomáticas e assintomáticas tinham diferenças significativas ( $m \pm dp$ ) em relação à idade ( $43.9 \pm 10.2$  VS  $24.3 \pm 4.6$ ), JOA ( $14.5 \pm 1.7$  VS  $16.6 \pm 0.2$ ) e SSPROM ( $86.6 \pm 7.9$  VS  $98.4 \pm 1.1$ ) escores ( $p < 0.05$ ). Ambas, JOA ( $r = -0.68$ ) e SSPROM ( $r = -0.65$ ) correlacionaram-se com a idade independente do estado sintomático ( $p = 0.0001$ , Spearman). Não houve achados importantes nos NCS, exceto pela amplitude do nervo fibular superficial com a idade ao início dos sintomas ( $r_s = 0.55$ ,  $p = 0.015$ ). De todas heterozigotas, 72% apresentaram latências prolongadas na condução central ascendente dos membros inferiores avaliadas através do P40. SSPROM e P40 foram

significativamente correlacionados ( $r_s = -0.47$ ,  $p = 0.018$ ). Os tipos e posições das mutações e o padrão de lyonização não foram associados ao estado da doença. Os valores de NSE foram diferentes entre as heterozigotas e controles ( $12.9 \pm 7$  e  $7.2 \pm 7$   $\mu\text{g/l}$   $p = 0.012$ , Mann-Whitney U). Os valores dos VLCFA eram diretamente proporcionais ao aumento da idade da paciente no momento da coleta. Discussão: manifestações neurológicas correlacionam-se claramente com a idade e foram bastante comuns na presente coorte. Não houve explicações moleculares sobre porque algumas mulheres são mais afetadas que outras. Ambas, JOA e SSPROM foram capazes de discriminar as assintomáticas das sintomáticas. As escalas, o P40 e a NSE podem ser ferramentas úteis para acompanhar a progressão da doença em futuros estudos. Os achados neurofisiológicos reforçam a idéia prévia de que a doença neurológica nas mulheres acomete predominantemente as vias medulares com padrão ascendente e que o início dos sintomas possa ser simplesmente uma questão de tempo.

#### IV. Abstract

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is an inherited peroxisomal disorder caused by mutations in the *ABCD1* gene - ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCD1, subfamily D, member 1- a peroxisomal half transporter: the adrenoleukodystrophy protein (ALDP). Biochemically, X-ALD is characterized by accumulation of very long-chain fatty acids (VLCFA) and partially impaired peroxisomal  $\beta$ -oxidation. The clinical spectrum in males with X-ALD ranges from isolated adrenocortical insufficiency and slowly progressive myeloneuropathy (AMN) to devastating cerebral demyelination. The symptomatic heterozygotes develop a slowly progressive degenerative picture similar to the male AMN. Due to the “pure” AMN presentation of the heterozygotes, they were chosen as our model of X-ALD myeloneuropathy. We studied a cohort of 33 X-ALD heterozygotes in regards to their neurological and neurophysiological manifestations and correlated them with age, disease duration, types and position of mutations, X inactivation pattern, and the serum concentration of a neuron damage marker: Enolase (NSE). Methods: 39 heterozygotes previously diagnosed in our institution were invited to participate and, after consent, 37 went through the initial screening. Four were excluded due to the presence of other possible causes of myeloneuropathy. Thirty three were evaluated through two clinical scales for myelopathy (JOA and SSPROM); peripheral nerve conduction studies (NCS) and somatosensory evoked potentials (SEP). The inactivation pattern was tested by HUMARA methylation assay, and serum NSE was measured through electrochemiluminescent assay. The data was correlated with demographic variables and type and position of the mutation. C26:0 and C26:0/C22:0 ratios were also analyzed. Results: 33 women (29 symptomatic) were analyzed. Symptomatic and asymptomatic women presented significantly different  $m \pm sd$  ages ( $43.9 \pm 10.2$  vs  $24.3 \pm 4.6$ ), JOA ( $14.5 \pm 1.7$  vs  $16.6 \pm 0.2$ ) and SSPROM ( $86.6 \pm 7.9$  vs  $98.4 \pm 1.1$ ) scores ( $p < 0.05$ ). Both JOA ( $r = -0.68$ ) and SSPROM ( $r = -0.65$ ) correlated with age, irrespectively of the disease status ( $p = 0.0001$ , Spearman). There were no remarkable findings on NCS except for the fibular superficial nerve amplitudes that correlated with age at onset of symptoms among the heterozygotes ( $r_s = 0.55$ ,  $p = 0.015$ ). Of all heterozygotes, 72% presented delayed latencies in the central ascending conduction studies from the lower limbs: P40. SSPROM and P40 latency were significantly correlated ( $r_s = -0.47$ ,  $p = 0.018$ ). Types and positions of mutations and inactivation pattern were not associated with the disease status. NSE values were different between heterozygotes and controls ( $12.9 \pm 7$  and  $7.2 \pm 7$   $\mu\text{g/l}$   $p = 0.012$ ,

Mann-Whitney U). The higher the VLCFA levels and the more skewed the inactivation pattern as the older the women were at the time of the VLCFA sample collection. Discussion: neurologic manifestations clearly correlated to age and were quite common in the present cohort. There were no molecular clues to explain why some women were more affected than others. Both JOA and SSPROM scales were able to discriminate the asymptomatic from the symptomatic heterozygotes. Both scales plus P40 latency and NSE might be useful tools to follow the disease progression in future studies. The neurophysiologic findings supported the previous idea that the neuronal disease in the women has a predominant spinal cord involvement with an ascending pattern and that the beginning of symptoms might be a matter of time.

## **V. Introdução**

### **1. A Adrenoleucodistrofia Ligada ao X**

A adrenoleucodistrofia ligada ao X (X-ALD – OMIM 300100) é uma doença genética do metabolismo dos peroxissomos. Nessa condição, a degradação dos ácidos graxos de cadeia muito longa saturados (ou VLCFA, do inglês *very long chain fatty acids*) encontra-se impedida ou muito limitada (Moser, 1997). Uma seqüência de estudos estabeleceu os mecanismos básicos da doença. Usando cromatografia planar, foi demonstrado um aumento no colesterol esterificado na substância branca e córtex dos lobos occipitais e parietais (Forsyth et al., 1971) de pacientes X-ALD. Estudos de microscopia eletrônica observaram estrias atípicas nas células adrenocorticais consistentes com lamelas intracitoplasmáticas e inclusões lipídicas lamelares. Estas inclusões lipídicas também foram encontradas nos testículos, células de Schwann e macrófagos cerebrais de pacientes X-ALD (Powers et al., 1974). Este material encontrado nas adrenais e substância branca cerebral era resistente a extração com acetona e etanol, mas muito solúvel em solventes monopolares como hexano e clorofórmio (Johnson et al., 1976). Análises subseqüentes demonstraram que as inclusões continham colesterol, fosfolipídeos e gangliosídeos esterificados com ácidos graxos de cadeia muito longa (Igarashi et al., 1976). O defeito de oxidação dos VLCFAs foi demonstrado através de carbonos radiomarcados nos quais a oxidação do C24:0 e C26:0 nos fibroblastos estava reduzida em pacientes X-ALD enquanto a de C16:0 era normal (Singh et al., 1981). Com o aprofundamento dos estudos, ficou claro que a X-ALD afeta principalmente a córtex adrenal, a mielina do Sistema Nervoso Central (SNC) e os axônios centrais e periféricos dos homens hemizigotos (Geel et al., 2001).

O defeito de  $\beta$ -oxidação na X-ALD é diretamente ligado à disfunção do ABCD1. Isto foi evidenciado ao bloquear-se a função do ABCD1 em fibroblastos de controles através de um anticorpo específico e, com isto, obter-se a redução da  $\beta$ -oxidação a níveis observados em fibroblastos de pacientes X-ALD (Wiesinger et al., 2013).

## 2. Aspectos moleculares da X-ADL

O defeito genético da X-ALD foi mapeado no cromossomo Xq28 através de estudos de ligação com o gene G-6-PD (Migeon et al., 1981) e marcadores polimórficos (Oberle et al., 1985; Aubourg et al., 1987). Através de clonagem posicional, o gene foi clonado e originalmente chamado de gene da adrenoleucodistrofia (Mosser et al., 1993). O gene da X-ALD, denominado ABCD1 contém 10 éxons e que ocupa 19.9 kb do DNA genômico no braço longo do cromossomo X (Xq28). A ABCD1 é uma proteína cassete ligadora de ATP (ABC) da mesma categoria de proteínas transportadoras ABC (Kemp et al., 2011).

Muitas mutações foram identificadas (Kemp et al, 2001, Pereira et al, 2012). A maioria delas (58%) é privada, ou seja, não é observada fora de uma única família. A mutação mais comum é uma deleção AG dos nucleotídeos 1801-1802 no éxon 5. Essa mutação acontece em 12% das famílias e em todos os grupos étnicos. Das mutações descritas, 51% são perda de sentido (do inglês – *missense*), 28% são mudanças de matriz de leitura (do inglês – *frameshift*), 12% são sem sentido (do inglês – *nonsense*), 6% são inserções ou deleções e 3% são grandes deleções. As mutações *missense* foram encontradas em todo o gene, mas os locais mais comuns foram o do domínio da membrana e o do domínio de ligação ao ATP, o que enfatiza a importância desses domínios na função da proteína ALD (<http://www.x-ald.nl>).

Não há relação direta entre o tipo de mutação no ABCD1 e o fenótipo clínico. Isto foi constatado com base em algumas observações como: todos os fenótipos clínicos podem

ocorrer em uma mesma família (Berger et al., 1994); mutações que sabidamente causam uma perda completa da ALDP, como grandes deleções, podem ser associadas a diferentes fenótipos, mesmo com a forma AMN de início tardio (Smith et al., 1999); a deleção idêntica de dinucleotídeos no éxon 5 pode levar a diferentes espectros clínicos (Smith et al., 1999; Kemp et al., 1994) e; gêmeos monozigóticos foram descritos com fenótipos completamente diferentes (Korenke et al., 1996).

### **3. A proteína da X- ALD**

O produto normal do gene é uma proteína estrutural, chamada proteína da adrenoleucodistrofia (ALDP), contém 745 aminoácidos e localiza-se na membrana do peroxissomo (Mosser et al, 1993). A ALDP representa estruturalmente um meio transportador com um domínio transmembrana hidrofóbico e um domínio hidrofílico ligador de nucleotídeos. Ela, presumivelmente, necessita se dimerizar para formar uma unidade funcional (Higgins et al., 1992). Três outros meio-transportadores estruturalmente similares a ALDP foram identificados: ALDRP “ALD-related protein” (Lombard-Platet et al., 1996; Holzinger et al., 1997) , PMP70 (Shani et al., 1997) e P70R ou PMP69 (PMP70 related protein) (Holzinger et al., 1997; Shani et al., 1997). A ligação de dois dímeros cria um transportador funcionalmente ativo, no qual os dois domínios de membrana formam um canal através do qual o substrato é transportado. Acredita-se que a combinação dos componentes individuais é que dá a especificidade ao transportador e assim, a ALDP poderia formar um homodímero ou ligar-se com os outros três transportadores ABCs adicionais: PMP70, P70R e a ALDR, com os quais poderia formar heterodímeros (Moser, 1997).

A ADLP está ausente em 70% dos pacientes X-ALD. Por razões ainda não compreendidas, mesmo mutações *missense* podem causar ausência total do produto

gênico e ainda assim não predizerem o fenótipo do paciente. A principal anormalidade bioquímica é o acúmulo de VLCFA, em especial os de 26 carbonos (ácido hexacosanóico) e 24 carbonos (ácido tetracosanóico). A beta-oxidação dessas substâncias dá-se comumente dentro dos peroxissomos. Supõe-se que o defeito estrutural (ou a ausência) da ALDP impeça o transporte desses VLCFA para dentro ou para fora dos peroxissomos, limitando, assim, sua degradação (Moser et al, 1997). No entanto, alguns estudos não puderam encontrar alterações na  $\beta$ -oxidação em tecidos de camundongos deficientes em ALDP (McGuinness et al., 2003; Oezen et al., 2005) o que levanta a questão da participação direta da ALDP na degradação dos VLCFA.

A expressão da ALDP foi investigada em tecido e linhagens celulares de camundongos (Troffer-Charlier et al., 1998) e em tecidos humanos (Mosser et al., 1993) e mostra um predomínio na glândula adrenal, rim, pulmão e músculo. Através de imunistoquímica foi evidenciada sua expressão cerebral e o aumento de níveis de ALDP em oligodendrócitos em trabalho de remielinização e astrócitos em atividade (Fouquet et al., 1997). Estudos de expressão mostram forte presença de RNA mensageiro (mRNA) na glândula pituitária, adrenais, testículos, fígado, rins, trato digestivo, músculos cardíaco e esquelético, pele, placenta e cérebro fetal. Enquanto amostras de cérebro de adultos como um todo ou separadamente do córtex cerebral, do putamen, do globo pálido, do caudado, do cerebelo e da medula apresentaram mRNA baixos (Höftberger et al., 2007).

Uma das importantes questões para entender a funcionabilidade da ALDP ~e seu padrão de dimerização: como homodímeros ou heterodímeros com um complementar específico ou, ainda, com diferentes complementares em diferentes tecidos de acordo com a necessidade e disponibilidade do outro meio transportador ABC. Provavelmente a maioria dos tipos celulares apresenta pelo menos pelo menos 2 transportadores ABC

diferentes (Berger et al., 1999; Fouquet et al., 1997). Em 1999, foi demonstrado que tanto homo quanto heterodimerização ocorre nas metades C-terminal de ALDP, ALDRP e PMP70. Duas mutações causadoras de doença encontradas na metade C-terminal da ALDP (P484R e R591Q) afetam tanto a homo quanto a heterodimerização da ALDP (Liu et al., 1999). Estudos de co-imunoprecipitação demonstraram homodimerização da ALDP e heterodimerização da ALDP com ALDRP e PMP70 (Liu et al., 1999; Smith et al., 1999) e heterodimerização da ALDRP e PMP70 (Liu et al., 1999).

#### **4. Fisiopatologia da X-ALD**

A alteração bioquímica principal da X-ALD, como mencionado anteriormente, é o acúmulo de VLCFA, especialmente o ácido hexacosanóico (C26:0) e o tetracosanóico (C24:0) (Igarashi et al., 1973). A maior parte dos ácidos graxos em humanos são ácidos graxos de cadeia longa, com 16-18 carbonos. Eles são o produto final do complexo citosólico de síntese de ácidos graxos que utiliza acetil-CoA, malonil-CoA e *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) para alongar os ácidos graxos em incrementos de dois em dois carbonos (Colli et al., 1969; Smith, 1994; Wakil, 1989). A síntese de VLCFA saturados, monoinsaturados e poliinsaturados ocorre no citosol (Cook et al. 1992). O alongamento dos ácidos graxos requer quatro passos essenciais: condensação entre acil-CoA e malonil-CoA para formar 3-cetoacil-CoA; redução usando NADPH para formar 3-hidroxiacil-CoA; desidratação para trans-2-enoil-CoA e; redução ao ácido graxo completamente alongado-acil-CoA. A reação de condensação inicial é catalizada por uma enzima chamada alongadora de ácidos graxos muito longos (ou do inglês *elongation of very long-chain fatty acids* - ELOVL) e é uma etapa limitante da reação (Cinti et al., 1992). Sete alongases foram identificadas em

mamíferos até o momento e são designadas ELOVL 1-7. Cada reação subsequente é catalizada por uma enzima única (Moon et al., 2003) o que suporta a teoria de que as enlongases são específicas e podem ser futuros alvos para a redução ou desvio da produção de VLCFA.

Sinais de estresse oxidativo e modificação da estrutura cerebral em função da presença excessiva de VLCFA foram documentados em estudos *postmortem* assim como em fibroblastos, plasma e células sanguíneas de pacientes X-ALD. Grandes aumentos de proteínas nitrosiladas, óxido nítrico e produtos de peroxidação de lipídeos foram vistos nas lesões neuroinflamatórias de pacientes com a forma cerebral de X-ALD associadas à astrocitose e microgliose. A manganês-superóxido dismutase, uma enzima mitocondrial que aumenta em resposta ao estresse oxidativo, foi detectada em níveis aumentados através de imunistoquímica nas células de pacientes X-ALD (Powers et al., 2005). A peroxidação de lipídeos não foi somente reportada no sistema nervoso central. Análises de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico no plasma de pacientes X-ALD com a forma cerebral, AMN e heterozigotas também foram detectadas (Deon et al., 2007). Foi demonstrado que o C26:0 em excesso diretamente aumenta a produção e espécies reativas de oxigênio, depleta a glutathione reduzida e diminui o potencial de membrana da mitocôndria (Galea et al., 2012) e isto não é restrito ao ácido hexacosanóico, um excesso de C26:1, também elevado na X-ALD, pode gerar espécies reativas de oxigênio em fibroblastos de humanos (Fourcade et al., 2010).

Quanto à resposta inflamatória, dados sugerem um predomínio de citocinas Th1 mediadas, implicando um maior papel da imunidade celular sobre a humoral. Além disso, células CD8+ notadas de forma proeminente nas lesões cerebrais da X-ALD são células T de tolerância. O CD1, que tem a especial capacidade de apresentar lipídeos como antígenos, é altamente expressado em lesões cerebrais X-ALD e nos traz a

questão do papel dos VLCFA e dos componentes da mielina funcionarem como antígenos na X-ALD (Hudspeth and Raymond, 2007).

Ao nível subcelular, a X-ADL apresenta achados patológicos comuns de dano neuronal como as inclusões citoplasmáticas lamelares nos macrófagos cerebrais, células de Schwann, células de Leydig e células do córtex adrenal. As inclusões lamelares consistem de colesterol esterificado com VLCFA (Igarashi et al., 1976). No entanto, devemos reiterar que existem duas formas bastante definidas de envolvimento neuronal: as formas mieloneuropáticas e a forma cerebral.

Das formas não-cerebrais, a AMN aflige a quase totalidade dos hemizigotos sobreviventes e consiste em axonopatia distal com degeneração mielínica secundária iniciando pela região distal do axônio e mielopatia. Ela é muito menos estudada do que a forma desmielinizante, embora seja a apresentação quase universal das heterozigotas sintomáticas.

A marca da AMN é a axonopatia com microgliose, no entanto, sem mudanças significativas da mielina (Powers et al., 2000). Alguns estudos com as formas não cerebrais foram realizados, como a AMN avaliada em um paciente através de medidas de difusão com anisotropia fracionada que evidenciou dano na integridade axonal no sistema coluna dorsal-lemnisco medial e no trato córtico-espinhal comparado a controles. As anormalidades no trato córtico-espinhal eram mais severas do que as vistas no sistema coluna dorsal-lemnisco medial. Isto pode ser devido à contribuição do lemnisco medial que é mais poupado nas axonopatias distais devido a sua natureza transináptica (Zackowski et al., 2006). Os neurônios motores parecem não ser primariamente afetados enquanto o gânglio dorsal apresenta atrofia e inclusões lipídicas anormais nas mitocôndrias (Powers et al., 2001). Inclusões trilamelares são observadas nas células de Schwann em pacientes AMN (Grainger et al., 2010).

Camundongos *knockout* para *Abcd1* desenvolvem um fenótipo semelhante à AMN, mas não à forma desmielinizante cerebral (Pujol et al., 2002). O aparecimento de sintomas nos camundongos *Abcd1 knockout* se dá ao redor de 16 meses, mas o registro de dano oxidativo em proteínas da medula já é visto aos 3 meses (Fourcade et al., 2008). Então, presume-se que o dano oxidativo nos oligodendrócitos é um importante fator iniciador da disfunção axonal na X-ALD (Deon et al., 2007). Fato corroborado pelo achado da capacidade de antioxidantes diminuírem o estresse oxidativo e degeneração axonal medular nestes camundongos a nível celular (Lopez-Erauskin et al., 2011) e em testes clínicos com estes camundongos (Fourcade et al., 2010). Isto reforça a capacidade do C24:0 e C26:0 induzirem estresse oxidativo e terem um importante papel na patogênese de leucodistrofias peroxissômicas (Wanders and Waterham, 2006). Novamente, estudos em camundongos *knockout* *Abcd1* e *Acox1* através de silenciamento de RNA comprovaram a capacidade de indução de estresse oxidativo por C24:0 e C26:0 (Baarine et al., 2012). E estudos recentes com camundongos *Abcd1 knockout* mostram dano oxidativo na medula espinhal e degeneração mitocondrial (Lopez-Erauskin et al., 2012).

A forma cerebral da X-ALD (CALD) aflige ao redor de 40% dos hemizigotos. Na qual as lesões encefálicas são as dominantes e incluem desmielinização extensa na substância branca periventricular (especialmente nas áreas parieto-occipitais), cavitações e infiltrados linfocíticos perivascularares (Moser, 1997). Ao contrário da substância branca, as fibras em U e o córtex são poupados (Powers et al., 1998). As alterações patológicas da forma cerebral infantil lembram aquelas vistas na Esclerose Múltipla. Ambas são caracterizadas por quebra da mielina enquanto os axônios são relativamente poupados, acúmulos de ésteres de colesterol e infiltrado inflamatório perivascular com quebra da barreira hematoencefálica. Contudo a X-ADL difere da

Esclerose Múltipla pelo envolvimento extenso e contínuo dos hemisférios cerebrais, pela localização posterior do infiltrado inflamatório e pelo diferente padrão de produção de citocinas (Van Geel et al, 1997).

No sistema nervoso central, a ALDP é expressa principalmente nos oligodendrócitos, micróglia, astrócitos e células endoteliais (Fouquet et al., 1997), mas não nos neurônios com exceção do hipotálamo, núcleo basal de Meynert, substância cinzenta periarquedutal e no lócus ceruleus (Hoftberger et al., 2007).

Apesar dos oligodendrócitos e axônios serem alvos evidentes na forma cerebral da X-ALD, há a sugestão de que o processo inflamatório não se limita a apenas alguns tipos celulares e o dano nos oligodendrócitos pode ser aumentado pela injúria da micróglia circunjacente via resposta inflamatória (Eichler et al., 2008). A desmielinização cerebral resulta da ativação de astrócitos e morte dos oligodendrócitos (Moser et al., 2001; Singh et al., 2010). Estudos *in vitro* demonstraram que o silenciamento lentiviral do *Abcd1* em astrócitos humanos e oligodendrócitos de camundongos resultou em redução da  $\beta$ -oxidação, acúmulo de VLCFA e alteração da homeostase mitocondrial (Singh et al., 2013).

O envolvimento inflamatório visto nas formas desmielinizantes também parece não ser restrito a estas. Com o mesmo modelo animal de X-ALD, camundongos *knockout* *Abcd1*, viu-se a desregulação de vias de sinalização de fosforilação oxidativa, adipocitocina e insulina, *turnover* e síntese de proteínas, respostas pró-inflamatórias NFkappa B-mediadas, respostas inflamatórias relacionadas ao TGF beta e vias de receptores *Toll-like* presentes na AMN (Schluter et al., 2012).

As duas formas neuronais da X-ADL, portanto, apresentam destruição da mielina em diferentes graus e correspondem a fisiopatologias distintas. A identificação de biomarcadores associados a algum dano especificamente neuronal ou mielínico é uma

meta importantíssima da pesquisa relacionada a X-ALD. Um biomarcador associado ao dano mielínico poderia identificar os meninos que desenvolverão a forma cerebral em estágios pré-clínicos, e com isso antecipar medidas terapêuticas e evitar insultos irreversíveis. Biomarcadores associados ao dano neuronal poderiam esclarecer a fisiopatologia da doença e ajudar a reconhecer agentes farmacológicos mais eficazes para essa condição.

## **5. Os VLCFA e a X-ALD.**

A associação entre AMN e VLCFA é clara, mas permanece incerto se a anormalidade nos VLCFA está diretamente relacionada à causa da neuropatologia ou fatores patogênicos secundários são necessários e o aumento de VLCFA é um epifenômeno. Há evidência de que o acúmulo de VLCFA tem um efeito deletério na estrutura e função da membrana, mas a grande variabilidade de fenótipos da X-ALD mesmo dentro das mesmas famílias e a falta de correlação entre as concentrações dos VLCFAs e as apresentações neurológicas sugerem que fatores além do acúmulo dos VLCFAs estão envolvidos (Knazek et al., 1983 e Ho et al., 1994). Não foi possível ainda estabelecer uma relação direta entre as concentrações de VLCFA e alterações na condução periférica (Chaudhry et al., 1996). Estudos demonstraram que a presença de C26:0 perturba a estabilidade da membrana celular (Ho et al., 1995). A mielina normal contém principalmente ácidos graxos de cadeia longa (16 a 20 carbonos). Em contraste, a mielina cerebral de pacientes X-ALD contém grandes quantidades de VLCFA. Avalia-se que a presença destes VLCFA em grande quantidade na mielina cerebral possa interferir em sua função através de diversos mecanismos como o desdobramento da camada de mielina, indução da apoptose dos oligodendrócitos resultando em ativação

glial e secreção de citocinas ou alteração da função da membrana pela presença de maior quantidade de VLCFA (Singh et al., 1992).

Os VLCFA estão presentes em diferentes lipídeos em pacientes X-ALD, mas a maior quantidade é encontrada nos gangliosídeos, fosfatidilcolina e frações de ésteres de colesterol.

Em cérebros normais, gangliosídeos contendo VLCFA são virtualmente ausentes (Pestronk et al., 1991) e, portanto, podem estar envolvidos na ativação do sistema imune na X-ALD. Apesar de ainda não clara a participação dos níveis de VLCFA, os locais de acúmulo e quantidades podem estar diretamente ligados a severidade da doença (Asheuer et al., 2005). Além do fator ativação do sistema imune, como discutido anteriormente, os VLCFA tem sido cada vez mais implicados no estresse oxidativo envolvidos na fisiopatologia da doença.

## **6. A apresentação clínica da X-ALD**

As apresentações clínicas da X-ALD são bastante amplas. Comumente o diagnóstico da família é iniciado por um hemizigoto com a forma cerebral. A incidência mínima estimada para os recém-nascidos homens na região sul do Brasil é de 1:35.000 (Jardim et al, 2010). Sua variabilidade fenotípica é muito alta e não pode ser prevista nem pelos níveis dos VLCFA nem pela história familiar (Moser, 1997, Mahmood et al, 2005), o que significa que não se pode correlacioná-los a quaisquer genótipos mesmo dentro de uma mesma família. Três fenótipos principais podem ser reconhecidos entre os indivíduos do sexo masculino: a forma cerebral infantil, a adrenomieloneuropatia e a forma *Addison only*. Estes fenótipos podem existir isoladamente ou em combinação.

**6.1 Forma cerebral infantil (CCALD)**, caracterizada por áreas de desmielinização, geralmente progressiva, que antecedem os sintomas e progridem até envolver todo o telencéfalo (Aubourg, 1996).

**6.2 Adrenomieloneuropatia (AMN)**, caracterizada por acometimento nervoso medular e periférico. A abertura do quadro, comumente, se dá através de sinais e sintomas de neuropatia periférica e acometimento medular que pode ser representado por paraparesia progressiva associada à incontinência urinária, à disfunção sexual e, eventualmente, tetraparesia. Usualmente, inicia-se na vida adulta e é de lenta progressão (Chaudhry et al, 1996; Geel et al., 2001). O quadro mieloneuropático normalmente é acompanhado de insuficiência adrenal e, portanto, chamado de Adrenomieloneuropatia.

**6.3 Insuficiência adrenal isolada (“Addison only”)**, na qual o indivíduo se apresenta sem evidência de anormalidades neurológicas que possam ser atribuídas a X-ADL, mas apresenta diferentes graus de disfunção ou insuficiência adrenal (Moser et al., 2001).

#### **6.4 A apresentação clínica de mulheres heterozigotas**

Muitas mulheres heterozigotas desenvolverão um quadro neurológico na vida adulta (O'Neill et al., 1984; Moser et al., 1993) não existindo até hoje nenhum marcador que preveja qual portadora de X-ALD desenvolverá sintomas.

O quadro clínico mais comum inclui paraparesia leve a moderada e perda sensitiva nos membros inferiores, semelhante à AMN dos hemizigotos. Contudo, os sintomas neurológicos aparecem mais tarde na vida e progridem mais lentamente do que nos homens (Moser et al, 1997; Van Geel et al, 1997). A percentagem das heterozigotas sintomáticas aumenta com a idade, variando entre 16 e 53% em séries mais antigas (Moser et al., 1991), embora em séries posteriores, ainda que sujeitas a vieses de

recrutamento, o número de sintomáticas seja bem maior – por exemplo, 85% das heterozigotas recrutadas para um estudo de neuroimagem (Fatemi et al, 2003). Está descrito que as alterações neurofisiológicas antecedem os sinais e sintomas (Restuccia et al, 1997).

O envolvimento encefálico é bem menos comum e inclui alguns relatos de déficit cognitivo (Moser et al, 1989; Ménage et al, 1993). Ao redor de 4% das heterozigotas podem apresentá-lo (Fatemi et al, 2003) e, quando o fazem, são bastante sintomáticas e distinguíveis das AMN.

A disfunção adrenal é incomum nas heterozigotas, embora uma redução subclínica na reserva de glicocorticóides possa estar presente na maioria das heterozigotas (El-Deiry et al, 1997).

Um estudo utilizando potenciais evocados motores, somatossensitivos e auditivos de tronco avaliou 8 heterozigotas. Apesar do pequeno número, pode-se reafirmar algumas impressões anteriores: os potenciais evocados motores dos membros inferiores eram todos anormais enquanto os de membros superiores eram normais confirmando o predomínio de envolvimento distal nas heterozigotas. As vias somatossensitivas foram freqüentemente afetadas também com predomínio nos membros inferiores (Schmidt et al., 2000). Enquanto a neuropatia periférica é um achado comum nos hemizigotos AMN e características tanto axonais quanto desmielinizantes podem ser vistas (Aubourg et al, 1992), ou seja, vias somatossensitivas centrais e periféricas parecem estar igualmente acometidas (Kaplan et al, 1997), aparentemente, as vias centrais somatossensitivas em mulheres sintomáticas são o foco das alterações causadoras dos sintomas de AMN. Seguindo a mesma idéia, tem-se a avaliação através de potenciais evocados auditivo de tronco. Os componentes I e II do potencial evocado auditivo de tronco são gerados nas porções periféricas do nervo acústico enquanto os componentes III, IV e V representam

potenciais gerados nas porções baixas do tronco cerebral (Scherg et al., 1985). A avaliação da presença de alterações nos componentes III-V nas heterozigotas (Schmidt et al, 2000) indica a presença de lesões nas porções centrais do trato acústico, novamente sugerindo que o acometimento das mulheres heterozigotas é, essencialmente, central. Em 1984, Tonbinatsu et al estudou duas heterozigotas assintomáticas e encontrou intervalos N13-N20 do potencial evocado somatossensitivo dos membros superiores aumentado na paciente mais velha, enquanto o potencial evocado visual era normal em ambas e o potencial evocado auditivo de tronco era alterado e sua poção central também em ambas as pacientes. Um estudo com 38 heterozigotas sintomáticas encontrou alterações nas conduções axonais periféricas em 67% delas (Chaundry et al, 1996). Já um estudo com um menor número, 5 sintomáticas flahou em demonstrar alterações na condução periférica (Koelman et al, 1996). Ao estudar as conduções centrais, Restuccia et al, 1997 encontrou Alterações nos SEP tibiais em 12 das 19 mulheres estudas e alterações dos SEP medianos em 10 das heterozigotas estudas enquanto as conduções periféricas eram todas normais. Estudos subseqüentes comprovaram o acometimento central. Em 8 sintomáticas estudadas, todas apresentavam aumentos da latência P40 que reflete a passagem do estímulo elétrico através da medula após a estimulação do nervo tibial, já a medida do N20, que mede esta mesma passagem após a estimulção do nervo mediano estava alterada em 3 das 8 heterozigotas (Schmidt et al, 2001) o que sugere fortemente a natureza ascendente da doença. Este mesmo estudo avaliou ainda os potenciais evocados motores (que avaliam as fibras descendentes da medula) e encontrou alterações em 7/8 pacientess e Potenciais evocados auditivos de tronco (BAEP) componentes I e II que normais em todas enquanto os componentes III e V foram anormais em 75 e 56% respectivamente. VEP

normais em 7/8. Pillion et al, 2006 estudou 15 heterozigotas independente dos seu estado sintomático e encontrou aumento das latências I-V em 5/15 pacientes.

Um estudo com perspectiva de tratamento, mas que ainda necessita de maior número de paciente e tempo de acompanhamento avaliou 5 heterozigotas através de SEP antes do uso de Óleo de Lorenzo e 2 meses após o uso. Antes do tratamento a latência do P40 era anormal em 4/5 e o intervalo N24-P40 prolongado também em 4/5 enquanto os SEP Medianos eram normais. Após o tratamento, houve uma diminuição significativa da latência do P40 e 1/5 paciente permaneceu dentro da faixa da anormalidade (Cappa et al, 2012).

### **7. Por que parte das heterozigotas se torna sintomática? A inativação do cromossomo X.**

Dois níveis de heterogeneidade são documentados nas mulheres heterozigotas para a X-ALD. Primeiro, a heterogeneidade clínica, já descrita. E segundo, a heterogeneidade bioquímica. Quinze por cento das heterozigotas obrigatórias apresentam níveis normais de VLCFA (Moser et al., 1998) A principal hipótese levantada para explicar as manifestações clínicas de uma parte das heterozigotas reside no fenômeno de inativação do cromossomo X.

A inativação do cromossomo X (XCI) foi primeiramente identificada por Lyon em 1961 e resulta na inativação transcripcional randômica de um dos dois cromossomos X presentes nas células normais de uma mulher no estágio inicial do desenvolvimento (Lyon MF, 1961; Huynh KD *et al*, 2003; Okamoto I *et al.*, 2004). Esse processo permite realizar a compensação de dose de muitos genes ligados ao X entre mulheres, que normalmente têm dois cromossomos X (Gartler SM e Riggs AD, 1983; Lyon MF, 1989).

A XCI é regulada por um locus localizado no cromossomo X chamado *XIC* (centro de inativação do cromossomo X) (Avner P *et al* E, 2001). *XIC* é definido como uma região do cromossomo X na qual um sinal de inativação exerce seu efeito *in cis* ao longo deste cromossomo (Hendrich BD *et al.*, 1997). *XIC* determina o cromossomo X a ser inativado e também participa do início do fenômeno, iniciando a repressão da transcrição do locus *XIC* (Lavrov SA e Kibanov MV, 2007).

Esse fenômeno epigenético envolve RNAs não codificantes, transcrição anti-senso, modificações de histonas e metilação do DNA para distinguir os dois cromossomos X geneticamente idênticos como ativos e silenciar um deles dentro do mesmo núcleo (Erwin e Lee JT, 2008). Uma vez silenciado, mecanismos epigenéticos garantem a manutenção do silenciamento nas futuras divisões celulares.

Teoricamente, a XCI ocorre de forma aleatória. Porém, na população feminina sem doenças ligadas ao X, 5-20% das mulheres tendem a uma inativação não randômica (enviesamento) (Gale RE *et al.* 1997; Plenge RM *et al.*, 1997; Lanasa MC *et al.*, 1999).

O processo de inativação está sujeito a diversas influências durante o desenvolvimento normal e em resposta a patologias citogenéticas ou monogênicas. Está bem documentado que deleções e duplicações citogeneticamente detectáveis resultam na inativação preferencial do cromossomo X mutado, provavelmente devido à letalidade celular multigênica (Thode A *et al.*, 1988; Wells S *et al.*, 1991). Por outro lado, translocações balanceadas ou inserções resultam na inativação preferencial do cromossomo X não mutado, presumivelmente devido à dosagem letal anormal nos fragmentos autossômicos (Mattei MG *et al.*, 1982).

Existem evidências tanto favoráveis quanto desfavoráveis. Em um relato de caso, em uma grande série publicada apenas como resumo houve evidências de uma função

ausente ou reduzida do cromossomo X não-ALD (portanto, inativação preferencial do mesmo) em mulheres com envolvimento cerebral ou doença de Addison (Hershkovitz E, Narkis G, Shorer Z, et al. 2002; Naidu S et al. 1997). Já em um estudo caso-controle, a inativação preferencial do X normal foi atribuída tanto ao acaso como à presença de outra mutação no cromossomo inativado (Watkiss et al, 1993). Já no estudo de Salsano et al., 2012, com 33 mulheres, o X carregando a mutação no *Abcd1* foi expresso preferencialmente. E há estudos como Feigenbaum et al., 1996 com outras 15 heterozigotas, nos quais nenhum deles encontrou associação entre o padrão de inativação e a presença de sintomas clínicos.

Em outro estudo caso-controle, um terço de 22 portadoras de X-ALD apresentou inativações preferenciais, enquanto as inativações foram randômicas em 7 parentes não heterozigotas e em 35 controles (Maier et al, 2002). As mulheres com inativações preferenciais tinham mais sintomas. Entretanto, essas inativações preferenciais encontradas nas sintomáticas tanto atingiram o cromossomo normal (o esperado), como o cromossomo X com a mutação ALD.

Devemos nos recordar de ao menos dois vieses de observação. O primeiro é o de que os estudos existentes analisaram as proporções entre clones de células periféricas continuamente substituídas, como fibroblastos e leucócitos, e que não participam do fenótipo da doença. Padrões de inativação do X em células do SNC seriam não somente mais estáveis na vida, como teriam uma relação direta com a degeneração neuronal apresentada pelas mulheres afetadas. Esses padrões jamais foram estudados seja em neurônios, seja em células gliais.

O segundo é a mudança de proporções entre as duas populações celulares das mulheres durante a sua vida, por conta de vantagens seletivas relacionadas a determinados períodos do ciclo vital. Novamente, exemplos contraditórios foram encontrados na

literatura. Migeon et al (1981) perceberam quanto mais jovens as heterozigotas X-ALD, mais equânimes eram as proporções entre os clones com X mutantes e os clones com X normais;

Finalmente, é possível que a presença de VLCFA intracelulares elevados seja favorável, neutra ou desfavorável, de acordo com cada tipo celular. Essas diferenças teóricas poderiam explicar os resultados divergentes, uma vez que os mesmos foram obtidos em diferentes contextos – estudos em clones de fibroblastos ou de leucócitos, e dosagens plasmáticas gerais.

#### **8. Tratamento da X-ADL relevante para as mulheres.**

Os estudos com Óleo de Lorenzo, uma mistura de ácido oléico e erúico, ácidos graxos insaturados que diminuem o alongamento de ácidos graxos saturados, associados a uma dieta restrita em VLCFA demonstraram pouca eficácia em interromper a progressão da doença cerebral nos pacientes com prejuízo neurológico já estabelecido. Entretanto, alguns estudos defendem que o Óleo possa reduzir a frequência e a gravidade das manifestações neurológicas nos meninos que o receberam desde um período ainda assintomático (Moser et al, 2002; Berger and Gartner, 2006). Um estudo investigou o Óleo de Lorenzo como forma de prevenir ou retardar a progressão da forma AMN nos hemizigotos e heterozigotas. As 5 heterozigotas participantes eram sintomáticas e apresentavam mielopatia eventualmente acompanhada de neuropatia periférica. Duas apresentavam lesões cerebrais desmielinizantes vistas na ressonância nuclear magnética. Os níveis de VLCFA foram normalizados, mas não houve mudança no estado clínico nem nas lesões cerebrais exceto por uma limitada melhora na condução nervosa periférica das pacientes femininas (Aubourg, 1993). Os hemizigotos progrediram os sintomas independentemente do tratamento.

Devido à falta de biomarcador e a lenta progressão da doença nas heterozigotas, é difícil avaliar se não houve eficácia do tratamento ou somente a necessidade de maior tempo de acompanhamento.

Um estudo através do uso de potenciais evocados visuais (VEP – do inglês *visual evoked potentials*) com 26 heterozigotas usando o Óleo de Lorenzo por 2 anos mostrou que os potenciais evocados visuais de base (que eram normais) após 2 anos continuavam iguais, contudo, o Óleo de Lorenzo não preveniu a piora dos VEP em um paciente hemizigoto com a apresentação AMN (Kaplan et al., 1993). Um estudo menor com 3 heterozigotas sintomáticas acompanhadas por 4 anos também falhou em mostrar melhora clínica e eletrofisiológica com o uso do Óleo de Lorenzo (van Geel et al., 1999). Como citado anteriormente, um estudo avaliou 5 heterozigotas através de SEP antes e após 2 meses de uso de Óleo de Lorenzo. Antes do tratamento a latência P40 era anormal em 4/5 heterozigotas e o intervalo N24-P40 prolongado também em 4/5 enquanto os SEP Medianos eram normais. Após o tratamento, houve uma diminuição significativa da latência do P40 e apenas 1/5 pacientes permaneceu dentro da faixa da anormalidade (Cappa et al, 2012).

Além do Óleo de Lorenzo, a lovastatina, um inibidor da HMG-Coa reductase que comprovadamente reduz os níveis de VLCFA e o 4-fenilbutirato foram propostos como possíveis agentes terapêuticos, mas sua eficácia clínica ainda não foi demonstrada (Kemp et al, 1998; Singh, Khan et al, 1998; Singh, Pahan et al, 1998).

Um estudo recente (Singh et al., 2013) utilizando tratamento com um inibidor da deacetilase de histonas, o ácido suberoilânido hidroxâmico (SAHA) corrigiu o distúrbio mitocondrial causado pelos VLCFA através da redução dos VLCFA e da *upregulation* da expressão de Abcd2/Abcd3 e inibição de enzimas de enlongamento dos VLCFA em astrócitos e oligodendrócitos deficientes em Abcd1. SAHA também

aumentou a expressão de ABCD2 em cultura células hipocampais. Outro estudo avaliou a ação da Pioglitazona (Morató et al. 2013) por sua capacidade de reduzir a expressão de ELOVL3. O ELOVL3 está envolvido no alongamento dos ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, na produção endógena de VLCFA. Neste estudo, apesar da Pioglitazona não ter diminuído marcadamente os níveis de VLCFA, houve uma melhora na função mitocondrial sugerindo que o benefício se dá através de outros mecanismos como o aumento da biogênese mitocondrial e de anti-oxidantes.

Alguns estudos demonstraram que combinações de anti-oxidantes podem ser benéficas em patologias associadas a estresse oxidativo (Rodriguez et al., 2007). Um grupo avaliou camundongos *Abcd1*<sup>-/-</sup>, *Abcd1*<sup>-/-</sup> tratados com um coquetel de anti-oxidantes ( $\alpha$ -tocopherol, N-acetilcisteína e ácido  $\alpha$ -lipóico) e *wildtype* quanto à presença de marcadores de estresse oxidativo e dano neuronal da medula espinhal. Os resultados obtidos mostram prevenção do dano medular nos camundongos *Abcd1*<sup>-/-</sup> em uso dos anti-oxidantes em comparação com os *Abcd1*<sup>-/-</sup>, além de manutenção das atividades relacionadas à integridade da medula espinhal sugerindo que este possa ser um caminho no tratamento dos pacientes AMN (López-Erauskin et al., 2011).

Estas são novas perspectivas de tratamento para Adrenoleucodistrofia ligada ao X, mas, apesar dos avanços, para as mulheres heterozigotas, não há, ainda, um tratamento preconizado.

## **9. Possíveis Biomarcadores de dano axonal**

Como ressaltado na descrição clínica das heterozigotas, a evolução dos sintomas é lenta e biomarcadores são essenciais para avaliar a eficácia de um tratamento. Os estudos neurofisiológicos parecem deixar evidente que o dano medular das heterozigotas é

axonal, ou seja, substâncias liberadas durante o dano/ruptra de um neurônio poderiam ser bons biomarcadores da progressão da doença.

### **9.1 A Enolase como marcador de lesão neuronal**

A enolase específica de neurônio (NSE) é uma enzima citoplasmática que está envolvida na rota de degradação da glicose. A isoforma  $\gamma\gamma$  dessa enzima é encontrada predominantemente em neurônios e células neuroendócrinas em diferenciação, assim como em tumores que se originam dessas células. Uma vez que esta proteína não é secretada, um aumento dos seus níveis no sangue e líquido parecem estar associados a injúrias que afetem a integridade das células neuronais como o que já foi descrito no trauma crânio encefálico, acidente vascular cerebral, epilepsia e Doença de Machado Joseph (Tort et al 2005).

## **10. Eletrofisiologia e a Adrenoleucodistrofia ligada ao X.**

Como descrito previamente, AMN é uma axonopatia distal que afeta a coluna dorsal e os tratos córtico-espinhais. A literatura descreve que pelo menos 20% das mulheres desenvolvem alterações neurológicas similares a AMN dos hemizigotos ao longo da vida, no entanto, de mais leve intensidade e de lenta progressão (Chaudhry et al, 1996). Portanto, a avaliação destas mulheres requer tanto métodos que acessem os nervos periféricos quanto à medula espinhal. A função eferente central é fisiologicamente avaliada examinando os potenciais evocados motores (MEP). De fato, o estudo dos MEPs revelou-se freqüentemente anormal em pacientes AMN. O tempo de condução motora central reflete essencialmente a função do trato motor no sistema nervoso central. Contudo, não indica o nível no qual o trato motor está sendo acometido: se intracranial, extracranial ou ambos (Schmidt et al, 2001). Potenciais evocados sensitivos

são especialmente úteis para a avaliação da função da medula espinhal. Potenciais evocados somatossensitivos iniciam com a entrega de um estímulo elétrico no nervo mediano na altura do punho. Um pulso suficiente para causar uma contração de 1-2 cm de amplitude no hálux. Com a entrega deste estímulo, salvas de potenciais de ação viajam pelo nervo através as fibras sensórias e motoras até o ombro, produzindo um pico na chegada. Este pico é chamado N9. No curso da condução, as fibras sensórias atravessam as raízes nervosas e entram na medula espinhal. O pulso passa, então, às colunas posteriores enviando sinapses colaterais para a medula cervical. Essa atividade central dá origem ao pico conhecido como N13. O N13 é mais adequadamente medido sobre a quinta vértebra cervical. Demais conduções pela medula posterior ascendem passando a decussação leminiscal. O pico P14 medido no escalpo é gerado neste nível. Como a condução continua ascendendo, passa ao leminisco medial e ao mesencéfalo, em seguida, ao tálamo, um pico negativo é detectado no escalpo: N18. Depois de fazer sinapse no tálamo e atravessar a cápsula interna, o N20 é registrado sobre o córtex somatossensitivo contralateral ao nervo mediano estimulado e corresponde a chegada do impulso nervoso a região somatossensitiva primária.

A estimulação do nervo tibial no nível do calcanhar dá origem a uma série de eventos semelhantes aos descritos anteriormente. Um potencial N8 pode ser detectado sobre o nervo tibial posterior na altura do joelho. Um potencial N22 pode ser detectado sobre a coluna lombar alta correspondendo a atividade das sinapses das fibras sensórias colaterais à medida que o estímulo entra na medula lombar. Mais rostralmente, um potencial cervical pode ocasionalmente ser detectado sobre a coluna cervical. O P37, um potencial de escalpo é visto discretamente lateral a linha média e ipsilateral à perna estimulada. O P37 reflete a ativação da área somatossensitiva primária (fissura Rolando). O maior pico positivo corresponde ao P40 e é registrado no vértex e Cpi. O

P40 aparece logo após o N37 que é registrado no hemisfério contralateral. Imediatamente após o N37, o P40 espalha-se pelo hemisfério ipsilateral e é registrado no escalpo centro-parietal. Devido à latência aproximada entre o maior pico positivo P40 (ipsilateral) e o negativo N37 (contralateral), acreditava-se que estes picos representavam duas pontas de um dipolo (Seyal et al., 1983), com o P40 sendo distribuído paradoxalmente no hemisfério ipsilateral (Cruse et al., 1982; Desmedt e Bourguet, 1985; Kakigi e Shibasaki, 1992; Lesser et al., 1987; Yamada et al., 1996). Esta lateralização paradoxal foi explicada por características anatômicas da representação cortical do pé que reside na superfície mesial do hemisfério. A negatividade primária na superfície mesial do hemisfério projetaria um campo positivo (P40) na direção do hemisfério ipsilateral ao estímulo. Contudo, vários estudos anteriores notaram uma pequena diferença de latência entre o N37 e o P40 sugerindo que são picos independentes (Beric e Prevec, 1981; Desmedt e Bourguet, 1985; Pelosi et al., 1988; Vas et al., 1981). Seguindo o P40, há uma negatividade (N50) que mostra uma distribuição muito semelhante ao P40, mas com uma área anterior maior (Valeriani et al, 1997).

A eletroneurografia periférica é uma medida da passagem de impulsos elétricos por um determinado nervo periférico (Tankisi, 2005). O estudo de condução de um nervo pode ser definido como indução da propagação do potencial de ação no sistema nervoso periférico e a gravação subsequente do impulso neural em uma localização distante do local de geração do impulso (Dumitru, 2002).

Pelo fato de predominarem os sinais de acometimento de neurônio superior na apresentação AMN, sinais clínicos de neuropatia periférica podem não ser tão evidentes ao exame clínico (Chaundhry et al, 1996). Estudos de condução nervosa periférica, neste caso, são extremamente úteis em detectar ou confirmar o acometimento nervoso

periférico, além de fornecer características da patologia (axonal vs desmielinizante), identificar o tipo de fibra envolvida (sensitiva vs motora) e definir a distribuição e severidade do dano. Seus principais componentes são a condução sensitiva e a condução motora. A condução sensitiva mede as fibras sensoriais dando informações sobre a integridade dos nervos através latência e velocidade que marcam o tempo para o potencial viajar através de dois pontos determinados e é uma medida de condução ao longo de um nervo e da amplitude medida do “baseline” ao pico, de pico-a-pico e é uma medida do número de fibras conduzindo a resposta. A condução motora é um potencial de ação composto muscular e representa a soma de todos os potenciais de ação musculares individuais. Os parâmetros registrados normalmente são a latência de início, a amplitude e a duração da resposta de ambos os pontos. A velocidade de condução é calculada entre os dois pontos. A latência de início da resposta distal mede a condução do segmento distal e é uma marca de sincronia dos axônios e a amplitude é uma marca indireta no número de axônios conduzindo a resposta (Johnsen et al, 2000).

Estudos eletrofisiológicos com heterozigotas sugerem um padrão predominantemente central de acometimento neurológico ao contrário dos homens hemizigotos nos quais tanto tratos periféricos como os somatossensitivos centrais parecem estar igualmente acometidos (Kaplan PW, 1997; Aubourg, 1997 e Boureau, 1992).

## **VI. Justificativas**

A Adrenoleucodistrofia, entre as doenças genéticas, tem alta prevalência e incidência. O tratamento através de transplante de medula óssea para as formas cerebrais está bem estabelecido. Já as formas degenerativas, tanto femininas quanto masculinas permanecem sem um tratamento modificador do curso da doença. Os diversos estudos feitos até o momento caracterizam a AMN como uma doença degenerativa com o estresse oxidativo como candidato principal em sua fisiopatologia. Por ser de lenta progressão, um biomarcador é essencial para acompanharmos a progressão da doença, o efeito de uma intervenção e anteciparmos o início dos sintomas. Como o padrão de acometimento das mulheres é descrito como principalmente axonal e as mulheres apresentam a forma AMN “pura”, ou seja, praticamente sem o risco de migração para a forma cerebral, decidimos estudá-las como modelo da doença degenerativa da X-ALD e assim evitarmos vieses, uma vez que um hemizigoto pode estar iniciando uma forma cerebral e ser avaliado ainda em um estágio pré-sintomático. Para esta avaliação, consideramos necessária a aplicação de escalas clínicas com foco em dano medular, avaliações neurofisiológicas para detectar alterações na condução nervosa mesmo em estado pré-sintomático e comparar os achados com os resultados das escalas clínicas, assim como a reavaliação dos papéis dos VLCFA e da lyonização do X e por último, após os estudos anteriores nos permitirem uma compreensão da evolução da AMN nas heterozigotas, a procura por um biomarcador. Um biomarcador é essencial em qualquer doença de lenta progressão, pois permite acompanhar a evolução da doença, prever o início dos sintomas e, especialmente, planejar uma estratégia terapêutica.

## **VII. Objetivos**

### **1. Geral**

Descrever as manifestações clínicas das mulheres heterozigotas para ALD e correlacionar essas manifestações com a eletrofisiologia e os marcadores: proteína NSE.

### **2. Específicos**

1-Descrever a proporção de heterozigotas afetadas versus as não afetadas em uma amostra de casos identificados a partir do banco de famílias ALD da nossa instituição.

2- Quantificar as manifestações das heterozigotas através dos escores clínicos PROMSS – Progressive Myelopathy Score System - e a escala JOA para mielopatias progressivas; e através dos estudos neurofisiológicos sobre as velocidades de condução motora e sensitiva e Potencial evocado Somatossensitivo.

3- Correlacionar o estado sintomático, idade e o estado de heterozigose com as concentrações séricas da proteína NSE.

4 – Correlacionar o padrão de Lyonização do X com os sintomas clínicos e as os estudos neurofisiológicos.

5- Avaliar a relação das concentrações dos VLCFAs com os demais parâmetros em estudo.

### **VIII. Artigo aceito para publicação no Orphanet Journal of Rare Diseases**

This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance.

Fully formatted

PDF and full text (HTML) versions will be made available soon.

## **Neurological impairment among heterozygote women for X-linked Adrenoleukodystrophy: a case control study on a clinical, Neurophysiological and biochemical characteristics**

*Orphanet Journal of Rare Diseases* 2014, **9**:6 doi:10.1186/1750-1172-9-6

Clarissa Toller Habekost (clatroller@gmail.com)

Pedro Schestatsky (pedro.schestatsky@gmail.com)

Vitor Felix Torres (vtorres@hcpa.ufrgs.br)

Daniella Moura de Coelho (dcoelho@hcpa.ufrgs.br)

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

Vitor Torrez (vitortorrez@gmail.com)

Jean Pierre Oses (jean.pierre.oses@gmail.com)

Luis Valmor Portela (roskaportela@gmail.com)

Fernanda dos Pereira (fdossantosp@gmail.com)

Ursula Matte (umatte@hcpa.ufrgs.br)

Laura Bannach Jardim ([ljardim@hcpa.ufrgs.br](mailto:ljardim@hcpa.ufrgs.br))

**ISSN** 1750-1172

**Article type** Research

**Submission date** 2 December 2013

**Acceptance date** 3 January 2014

**Publication date** 13 January 2014

**Article URL** <http://www.ojrd.com/content/9/1/6>

This peer-reviewed article can be downloaded, printed and distributed freely for any purposes (see copyright notice below).

Articles in *Orphanet Journal of Rare Diseases* are listed in PubMed and archived at PubMed Central.

For information about other BioMed Central publications go to

<http://www.biomedcentral.com/>

## Orphanet Journal of Rare Diseases

© 2014 Habekost *et al.*

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License

(<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver

(<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

# **Neurological impairment among heterozygote women for X-linked Adrenoleukodystrophy: a case control study on a clinical, neurophysiological and biochemical characteristics**

Clarissa Toller Habekost<sup>1,11</sup>

Email: [clatroller@gmail.com](mailto:clatroller@gmail.com)

Pedro Schestatsky<sup>5,7</sup>

Email: [pedro.schestatsky@gmail.com](mailto:pedro.schestatsky@gmail.com)

Vitor Felix Torres<sup>7</sup>

Email: [vtorres@hcpa.ufrgs.br](mailto:vtorres@hcpa.ufrgs.br)

Daniella Moura de Coelho<sup>6</sup>

Email: [dcoelho@hcpa.ufrgs.br](mailto:dcoelho@hcpa.ufrgs.br)

Carmen Regla Vargas<sup>4,6</sup>

Email: [crvargas@hcpa.ufrgs.br](mailto:crvargas@hcpa.ufrgs.br)

Vitor Torrez<sup>2</sup>

Email: [vitortorrez@gmail.com](mailto:vitortorrez@gmail.com)

Jean Pierre Oses<sup>10,12</sup>

Email: [jean.pierre.oses@gmail.com](mailto:jean.pierre.oses@gmail.com)

Luis Valmor Portela<sup>2,3,12</sup>

Email: [roskaportela@gmail.com](mailto:roskaportela@gmail.com)

Fernanda dos Santos Pereira<sup>8</sup>

Email: [fdossantosp@gmail.com](mailto:fdossantosp@gmail.com)

Ursula Matte<sup>1,9,11</sup>

Email: [umatte@hcpa.ufrgs.br](mailto:umatte@hcpa.ufrgs.br)

Laura Bannach Jardim<sup>1,5,6,8,11,\*</sup>

\* Corresponding author

Email: [ljardim@hcpa.ufrgs.br](mailto:ljardim@hcpa.ufrgs.br)

<sup>1</sup> Post-Graduation Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Post-Graduation Program in Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup> Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup> Department of Analysis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

<sup>5</sup> Department of Internal Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

- 6 Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
- 7 Neurology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
- 8 Laboratory of Genetic Identification, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
- 9 Laboratory of Gene Therapy, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
- 10 Laboratório de Neurociências Clínicas, Centro de Ciências da Vida e da Saúde, Universidade Católica de Pelotas, Pelotas, Brazil
- 11 Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INAGEMP), Porto Alegre, Brazil
- 12 Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCTEN), Porto Alegre, Brazil

# **Abstract**

## **Background**

Neurologic impairments in female heterozygotes for X-linked Adrenoleukodystrophy (XALD) are poorly understood. Our aims were to describe the neurological and neurophysiological manifestations of a cohort of X-ALD heterozygotes, and to correlate them with age, disease duration, mutations, X-inactivation and serum concentrations of a marker of neuronal damage, neuron-specific enolase (NSE).

## **Methods**

All 45 heterozygotes identified in our region, with previous VLCFA and molecular diagnosis, were invited to be evaluated through myelopathy scales JOA and SSPROM, nerve conduction studies and somatosensory evoked responses. X inactivation pattern was tested by HUMARA methylation assay. Serum NSE was measured by eletrochemiluminescence.

## **Results**

Thirty-free heterozygote women were recruited: 29 (87%) were symptomatic. Symptomatic and asymptomatic women presented different  $m \pm sd$  ages ( $43.9 \pm 10.2$  versus  $24.3 \pm 4.6$ ), JOA ( $14.5 \pm 1.7$  versus  $16.6 \pm 0.2$ ) and SSPROM ( $86.6 \pm 7.9$  versus  $98.4 \pm 1.1$ ) scores ( $p < 0.05$ ). Both JOA ( $r = -0.68$ ) and SSPROM ( $r = -0.65$ ) correlated with age, irrespectively of the disease status ( $p = 0.0001$ , Spearman). Delayed latencies in the central ascending conduction studies on the lower limbs were present in 72% of all heterozygotes, and correlated with SSPROM ( $r = -0.47$ ,  $p = 0.018$ , Spearman). NSE values were higher in heterozygote than in control women ( $12.9 \pm 7$  and  $7.2 \pm 7$  ng/ml,  $p = 0.012$ , Mann-Whitney U). Mutation severity and inactivation patterns were not associated with neurologic status.

## **Conclusion**

Neurologic manifestations, clearly related to age, were quite common in the present cohort. JOA and SSPROM scales were able to discriminate the asymptomatic from the symptomatic heterozygotes. Both scales might be useful tools to follow disease progression, in future studies.

## **Keywords**

X-linked Adrenoleukodystrophy, X-ALD heterozygote females, X-ALD carriers, JOA, SSPROM, Neuron-specific enolase, Evoked potentials, Nerve conduction, X inactivation, Spastic Paraplegia.

## Background

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD, OMIM #300100) is the most common peroxisomal disorder worldwide [1,2]. Affecting the metabolism of saturated very long chain fatty acids (VLCFAs), X-ALD is caused by a defect in *ABCD1* gene that codes for ALD protein [3], a peroxisomal membrane protein that belongs to the ATP-binding cassette superfamily of membrane transport proteins [4]. *ABCD1* mutations give rise to obvious phenotypes in hemizygote men, such as the classical cerebral form of ALD (CALD) and the adrenomyeloneuropathy (AMN), among others [4].

A very limited number of studies addressed manifestations in female carriers; some authors stated that affected women are under recognized and undertreated [5]. Early reports said that 20 to 50% of heterozygotes might present a mild to severe myeloneuropathy that resembles AMN, this clinical picture being related to ageing [6]. The myelopathic component of AMN is characterized by a distal axonopathy that affects the dorsal column and the corticospinal tract [7]. Neurophysiologic studies showed central and peripheral abnormalities and suggested the prominence of axonal dysfunction [8].

VLCFA were established a long time ago as biomarkers for X-ALD. Elevated plasma VLCFA levels are the diagnostic gold-standard for X-ALD in men and present 15-20% of false negative results in women, for whom a molecular investigation is the main diagnostic tool [4].

In addition to diagnostic concerns, there are no reasonable mechanistic explanations for the variability regarding the presence and absence of neurological impairments in heterozygote females. Although brain VLCFA levels correlated with CALD in hemizygotes [9], plasma VLCFA levels have never been related to X-ALD phenotypes in men and women [4]. It is

well known that genotypes do not correlate with phenotypes, in X-ALD [4]. Skewed X chromosome inactivation was also investigated, bringing contradictory results [10-12]. Alterations in oxidative stress parameters such as thiobarbituric acid-reactive substances [13] have been described in female carriers, without further exploring their potential associations with phenotypes.

Therefore, clinical and biochemical biomarkers of disease progression in heterozygotes for X-ALD are lacking. In this sense, we aimed to describe the symptomatic status of our XALD heterozygote cohort; to measure the neurological manifestations through myelopathy scales JOA and SSPROM, peripheral nerve conduction studies and somatosensory evoked responses; to measure plasma levels of a neuron disease marker, neuron-specific enolase (NSE); and to look for associations between these parameters and independent variables such as age, age at onset, mutations, X inactivation pattern and plasma VLCFA.

## Methods

### Population and clinical evaluations

All women previously identified as heterozygotes for X-ALD, in South Brazil, were invited to participate in this study. All had molecular analyses and VLCFA dosages performed in our institution, as reported elsewhere [14]. To be included, they had to be over 18 years old and give the informed consent. Exclusion criteria were the presence of any abnormality on the following exams at recruitment: lymphocytes count, hemoglobin, erythrocytes median corpuscular volume, sedimentation rate, vitamin B12, thyroid stimulating hormone, proteinogram, VDRL (Venereal disease research laboratory), FTA-Abs (Fluorescent Treponemal Antibody- absorption), antibodies anti-HTLV (Human T lymphotropic virus) and Anti-HIV (Human Immunodeficiency Virus), oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases, qualitative urine test, thrombocytes, glucose and creatine.

The interview started with an open question about any disability or presence of symptoms in the heterozygote. After that, the interviewer (CTH) described the symptoms of spasticity, paraparesis, sensory losses and loss of sphincter control, and explained that these symptoms could be present in heterozygote females. After that, the interviewer asked again about the presence and age at onset (AO) of motor disability, sensory losses and/or loss of sphincter control and the answer to this was taken into account. Heterozygote women were then classified according to their responses; as symptomatic if complaints of neuropathic pain, paresthesia, sphincter dysfunction or paresis were present, or as asymptomatic if these complaints were absent. Data such as age, AO, disease duration (DD), family and ABCD1 mutations were collected.

Neurological impairment and disability were evaluated through two myelopathy scales: the Japanese Orthopaedic Association (JOA) [15] and the Severity Score System for Progressive Myelopathy (SSPROM) [16]. JOA includes questions about motor disability of upper and

lower limbs, about sensory losses and about sphincter function. SSPROM includes questions about these same domains, plus questions about motor strength and tonus/reflexes. In this sense, both scales measure disability as well as neurological impairment.

We elected two SSPROM domains to measure disability. SSPROM's motor disability domain was based on and mirrors the Overall Disability Sum Score [17], while SSPROM's sphincter domain was based and recapitulates the "sphincter dysfunction" domain of Kurtzke functional systems scores [18]. An overall disability evaluation was then measured by these two SSPROM domains (0 to 50 points; Table 1). Since a minimally important difference has not been determined for the disability parameters so far, we have arbitrated that women with an overall score  $\leq 47$  points were already disabled.

In order to produce a "disease severity score" where the neurological impairment was corrected by the disease duration, the SSPROM reciprocal of each woman was divided by disease duration. This severity score was then compared among groups stratified by risk factors such as mutation position, mutation severity, NSE and inactivation patterns.

Blood samples were taken and neurophysiological studies (described below) were performed within 15 days of evaluation.

### **Neurophysiological studies**

Motor and sensory nerve conduction studies in several nerves were performed in the right side of the body (Table 2). Motor conduction velocity (m-NCV), distal latency and amplitude for both compound muscle action potential (CMAP) and sensory nerve action potential (SNAP) were measured according to standard techniques in which normal values were considered within 2-SD from the mean [19]. Somatosensory evoked responses (SSER) were measured using the 10/20 electrode placement international system and recorded according to standard techniques [19]. The latencies of N8, P40 and N50 were recorded after tibial nerve stimulation, and N9 and N20

after median nerve stimulation. Only P40 and N20 latencies were included into regression analyses. Normal latency values were considered according to Chiappa [20] and based on the patient's height. The upper limits of normal values were given in Table 3.

Both, nerve conduction studies and SSER were performed using a Nihon –Kohden (*Neuropack S1* MEB-9400 K) 4 channel EMG/EP system.

### **VLCFA**

Plasma docosanoic (C22:0), tetracosanoic (C24:0) and hexacosanoic (C26:0) acids were obtained previously to the present study, and were analyzed as described by others [21].

Values of C26:0 (in  $\mu\text{m/L}$ ) and of discriminant factor  $3,805(\text{C24:0}/\text{C22:0}) + 5,296(\text{C26:0}/\text{C22:0}) + 5,15(\text{C26:0})$  [22] were studied in the present heterozygote females.

The discriminant factor's value of 10.86 discriminated X-ALD heterozygote from normal homozygote women, with 15% of false-negative results.

### **Enolase quantification**

Serum NSE was measured using an electrochemiluminescent assay provided by Roche DiagnosticsR, Indianapolis, IN, a double sandwich assay that uses an antibody anti-NSE bound with ruthenium (luminescent label). The reaction and quantification were performed by Elecsys-2010 (Roche). No hemolyzed samples were used. The assay was carried out in duplicate and the confidence variance was within 5%. NSE concentrations were also measured in thirteen unrelated, normal women used as a control group.

### **Inactivation studies**

Genomic DNA was obtained from peripheral leukocytes by the salting out procedure [23].

#### **Xinactivation**

patterns were assessed for skewing with the human androgen-receptor locus (HUMARA) methylation assay [24]. Prior to digestion, informative women were identified by PCR at HUMARA locus and capillary electrophoresis. For the informative women ( $n =$

20), digestion of 100 ng genomic DNA with the methylation-sensitive restriction endonuclease, *HpaII*, and subsequent PCR amplification of the HUMARA polymorphic CAG repeat was used to determine X-inactivation status in X-ALD heterozygotes. The degree of chromosome X inactivation was calculated using the formula  $[(d1/u1) / (d1/u1 + d2/u2)]$ , where d = digested, u = undigested sample, and the two allele peaks (1 and 2) are compared [25]. Inactivation ratios less than 70:30 were considered random. Ratios greater than or equal to 70:30 and less than or equal to 90:10 were considered moderately skewed. Ratios greater than 90:10 were considered highly skewed [26].

### **Statistical analyses**

Patient characteristics are given as mean  $\pm$  SD and range, when applicable. Categorical variables were represented by absolute and relative frequencies and were compared through Fisher exact test. The majority of continuous variables did not show a normal distribution on the Shapiro-Wilk test, and therefore were tested by Mann-Whitney U, Spearman correlation and, when applicable, by stepwise linear regression. Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ . All statistical tests were performed in PASW 18.3.

## Results

### Clinical findings

Forty five heterozygote women (belonging to 25 families) had been detected by molecular studies in our institution, from 2008 to 2013. Thirty three heterozygotes (or 73% of the total heterozygotes detected in our region) gave their consent and were included in this study. The another 27% (12 women) were lost: six were not found by two phone calls and letter, two refused to participate in the study and another four fulfilled exclusion criteria. The mean  $\pm$  sd ages of the 33 participants and of the 12 non-participants, in 2013, were of  $41.2 \pm 11.9$  and  $40.9 \pm 15$ , respectively (ns, t test). Twenty-nine of the 33 participants classified themselves as symptomatic and four, as asymptomatic, after learning about X-ALD symptoms in females. Their general characteristics are present in Table 1.

Symptomatic were significantly older and presented worse JOA and SSPROM scores and higher disability scores than asymptomatic women. Significant differences in SSPROM scores were due to a high proportion of symptomatic females (27/29) with spasticity/hyperreflexia; and to motor disabilities (Table 1). The auto-classification and the disability scores did not perfectly match: normal scores in the overall disability evaluation were obtained in all four asymptomatic but also in 15/29 symptomatic women. Overall disability was related to SSPROM and JOA scores, but not to age, age at onset of symptoms, neurophysiologic studies and other biomarkers (data not shown).

Among symptomatic women, although SSPROM correlated with age and DD, only DD was maintained on linear regression ( $r = -0.73$ ,  $p = 0.0001$ , Spearman;  $B = -1.91$ ,  $EP = 0.28$ ).

When all heterozygote women were analyzed together, the association with age was confirmed ( $r = -0.65$ ,  $p = 0.0001$ , Spearman;  $B = -0.43$ ,  $EP = 0,10$ , by Linear regression) (Figures 1A and 1C).

**Figure 1 Associations relating JOA and SSPROM scales to independent variables age, disease duration and somato-sensory evoked responses.** (A and B) Disease duration of symptomatic heterozygotes. (C and D) Age at examination all heterozygotes. (E) Somatosensory evoked responses of lower limbs of all heterozygotes.

Similar associations were found regarding to JOA. Among symptomatic women, although JOA scores were at first correlated with age, AO and DD, only DD was significantly related to JOA on stepwise linear regression ( $r = -0.61$ ,  $p < 0.001$ , Spearman;  $B = -0.37$ ;  $EP = 0.07$ ). When all heterozygotes were analyzed together, JOA correlated with age ( $r = -0.68$ ,  $p = 0.0001$ , Spearman;  $B = -0.09$ ;  $EP = 0.02$ , Linear regression) (Figures 1B and 1D).

Mean  $\pm$  sd of disease severity, or  $1 / (\text{SSPROM} \times \text{DD})$ , among symptomatic women, were  $3.7 \pm 2.6$ . This score did not correlate with age or any other parameters.

Symptomatic classification produced more associations with independent parameters than the disability classification, in this cohort. Due to that, it was maintained as the stratification criteria between the present heterozygote women, when necessary.

## **Nerve conduction studies**

Twenty-two out of 33 heterozygotes (20 symptomatic and 2 asymptomatic women) performed neurophysiologic studies. The others denied for personal reasons. Nineteen (including one asymptomatic heterozygote) presented at least one altered proof. Results are presented in Table 2.

All m-NCV and most of s-NCV were normal, and there were no correlations between NCVs and symptomatic status, age, AO, DD, disability status, JOA, SSPROM, disease severity, inactivation studies or plasma NSE concentrations (data not shown). Twelve out of 20 symptomatic heterozygotes showed reduced s-NCV of the median nerve, measured on the elbow. This finding was unrelated to any variable under study (data not shown).

No evidence of generalized axonal damage was found in any of the women studied, since the majority of CMAPs and SNAPs amplitudes were between the normal range. The amplitude of fibular superficial nerve SNAPs correlated with AO among the heterozygotes ( $r = 0.55$ ,  $p = 0.015$ , Spearman).

## **Somatosensory evoked responses**

Twenty-five heterozygote females (including those 22 females with nerve studies) were tested for SSE. Eighteen (17 symptomatic) presented delayed latencies in the central ascending conduction studies starting on the lower limbs (evoked potential P40) (Table 3).

Latencies of the evoked potentials were not related to age, disability, disease severity or to the symptomatic status of the heterozygote women (ns, Spearman and Mann-Whitney U tests). SSPROM correlated weakly with lower limbs evoked potential latencies ( $r = -0.47$ ,  $p = 0.018$ , Spearman, Figure 1E).

## **Mutations found in *ABCD1* gene**

The mutations detected on *ABCD1* gene are depicted on Additional file 1: Table S1. These mutations were stratified according to their exonic position in the gene as well as divided according to their severity in missense or nonsense/frameshift. Mutation severity or position did not correlate either to age at onset of symptoms or to disease severity (Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis, data not shown).

### **X Chromosome inactivation patterns**

Twenty heterozygotes were informative in the technique applied to determine the inactivation pattern. Six had a skewed inactivation pattern of 70:30 or more. Skewed inactivation was not associated to symptomatic state (ns, Fisher exact test), disability, SSPROM, JOA, disease severity (ns, Spearman) or AO (ns, Linear Regression). A curious trend to relate larger skewing with age was also seen ( $r = 0.37$ ,  $p = 0.1$ , Spearman).

### **NSE**

The median  $\pm$  sd values of NSE were higher in heterozygotes than in controls ( $12.9 \pm 7$  versus  $7.2 \pm 7$  ng/ml,  $p = 0.012$ , Mann-Whitney U, Figure 2). Both heterozygote and control groups had similar ages ( $41.2 \pm 11.9$  and  $35.5 \pm 10.4$  years, ns, M-W U).

## **Figure 2 NSE among the X-ALD heterozygotes and the control women.**

NSE was not correlated with age, either among all women or just among heterozygotes. No correlations were found between NSE and AO, disability or symptomatic status, inactivation studies, position of mutation in ABCD1 gene, SSPROM, JOA, disease severity, evoked responses or other neurophysiology parameters (data not shown).

## **VLCFA**

VLCFA had been determined at the time of diagnosis of the present 33 heterozygotes, sometimes several years before the present evaluation. Their mean  $\pm$  sd ages at the collection were of  $30 \pm 11.3$  (range: 7 to 43) years-old. In the case of symptomatic women, for whom the symptom onset has been determined as year zero, blood collections were done at a  $-3.8 \pm 4.5$  (range: -12 to 3) years from the start of their symptoms. Correlations of VLCFA levels with age at the time of blood collection and with time from disease start were then tested. There were direct correlations between age and both C26:0 and VLCFA discriminant factor ( $r = 0.58$ ,  $p = 0.011$  and  $r = 0.60$ ,  $p = 0.007$ , Spearman, Additional file 2: Figure S1).

## Discussion

We examined 73% of all known heterozygote women for X-ALD followed in our institution, and detected significant clinical and neurophysiologic impairments in 87% of them. The clinical scales JOA and SSPROM were able to differentiate symptomatic from asymptomatic heterozygotes. Both scales were associated with DD of the symptomatic cases and with age in the overall group. Abnormalities in somatosensory evoked responses, mostly from the lower limbs, were quite frequent. A plasma protein related to neuronal damage, NSE, was associated with the heterozygote state. All these might be candidates as biomarkers for disease progression in heterozygotes for X-ALD.

Quantifying physical disability and neurologic burden is essential to understanding the progression rate of any disease [5]. In the present report, three levels of consequences related to the heterozygote state for X-ALD were measured: subjective perception, neurologic impairment and disability. Being symptomatic is a yes/or/no subjective perception.

Neurologic impairment was measured by JOA and SSPROM scales, and by neurophysiologic studies. Disability reflects dysfunctions on performance and activity; we measured it by using specific domains of SSPROM. Disability needs an arbitrary cutoff. Disability scores obtained in the present group were very mild. Due to that, we decided to include even small disabilities in the dichotomic, positive group. We have then stratified heterozygote women both by their symptomatic and disability states.

We have obtained 29 symptomatic and 4 asymptomatic women; in contrast, there were 14 disabled and 19 non-disabled women. Although the disability stratification seemed to produce more even groups, it failed to be associated with age or with DD. In contrast, symptomatic status correlated with age, JOA, and SSPROM; moreover, DD - in other words, the duration of symptoms - correlated with both JOA and SSPROM. Therefore, symptomatic classification produced more useful information than its counterpart (disability).

Neurological impairment was better evaluated by clinical scales than by neurophysiology. Both JOA and SSPROM scales were able to discriminate symptomatic from asymptomatic heterozygotes, with almost no overlap, correlated very well with DD in the symptomatic group, and with age in the overall group.

The lack of any substantial alterations on peripheral neurophysiology reported here corroborates the findings of Schmidt and Cols [8]. One interesting finding was the direct correlation of fibular SNAP with AO. Reduced SNAP is commonly related to an inherent susceptibility of the fibular nerve for entrapments. Why did it correlate with AO, is an issue that deserves investigation in other heterozygotes.

After clinical scores, the SSER of lower limbs have shown the most prevalent abnormalities in heterozygote women. Similar results have been seen by others [8,27-30] SSER of lower limbs correlated with SSPROM and this might be taken as an external validation for SSPROM usefulness among X-ALD heterozygotes. On the other hand, SSER were not associated with any other measurement of disease progression like age and disease duration. X chromosome inactivation has been studied as a modifying factor that could influence clinical presentation in women with X linked disorders. Relating a skewed inactivation in peripheral leukocytes to a neuronal disorder, as in the heterozygote women with X-ALD, is a complex hypothesis. If this association would exist, at least two possible mechanisms should be invoked: a good mirroring between neurons and leukocytes, where a skewed X inactivation in neurons would be related to differences in clinical presentation; and/or an intercellular mechanism, operating from skewed cells other than neurons. Differently from some authors [12] but similar to others [11], we did not find any association between inactivation and symptomatic status or neurological scores. We observed a trend relating an increased skewing with age, which is in accordance with literature [31].

VLCFA also increased with age, at least in this cohort, whose blood collections had been

done between 7 and 43 years of age. Other authors have observed a similar finding in this age group, with decreasing VLCFA concentrations in women older than 50 years old [32].

Although both VLFCA and skewing inactivation increased with age in our group, no association was found with increasing neurological symptoms.

NSE is a cytoplasmatic glycolytic enzyme found in neurons and cells with neuroendocrine differentiation. Since NSE is not physiologically secreted, an increase of its serum concentrations can be associated with structural damage to neuronal cells [33]. NSE concentrations were higher in heterozygote women than in controls, in the present study. Since NSE was not associated with symptomatic or disability status, nor with any variable related to disease progression, we were not able to show a clear potential for NSE as a biomarker for disease progression in this disease.

According to former studies, around 50% of X-ALD heterozygotes showed some degree of neurologic involvement [6]. Our results were quite different: 87% were symptomatic, with neurological impairments as measured by JOA and SSPROM scores. Our large proportion of symptomatic women was quite surprising. Although one cannot rule out a selection bias favoring the recruitment of symptomatic heterozygotes, the similitude between the mean ages of the recruited and of the non-recruited heterozygote women works against this conjecture. Our rates might be explained by different measurements of neurological burden: perhaps former reports relied on disabilities rather than impairments. Our experience showed that disabilities were mild in general, with the exception of sphincter dysfunctions (Table 1). Impairments, on the other hand, were clearly present, the major impact being the corticospinal involvement (Table 1).

Emotional issues should also be remembered. Male X-ALD is a catastrophic disease for families. A mother or a female caregiver of an affected boy usually lives in very stressful conditions, where priorities are put in hemizygote men rather than in her well-being. Maybe

the actual numbers of symptomatic heterozygote females had been previously underestimated, due to a hasty report of these women about their healthy states. The hypothesis that the majority of heterozygote females will present a neurologic impairment is not negligible. Moreover, the associations between JOA and SSPROM with age might suggest that the symptomatic status is a matter of time and that, as heterozygote females grow older, they get symptomatic.

With the prominent involvement of pyramidal tracts, X-ALD presenting in symptomatic heterozygotes and as male AMN, can be seen as one form of complicated spastic paraplegia (SPG) [34]. Therapeutic trials in men and women with AMN and in SPGs in general are expected in a near future, and it will be important to decide what scales to use on them. Recently, some studies have measured the neurological impairment of SPGs by the Spastic Paraplegia Rating Scale (SPRS) [35]. In contrast, we have used two instruments fitted to measure both disability and impairment, scales that might be called disease severity scoring systems (or 3S): the scales JOA and SSPROM. SSPROM was developed to follow metabolic progressive myelopathies such as AMN; so far, only the present and the description studies have used it [16]. JOA was developed to follow cervical compression myelopathies [15], and it is probably the most used neurologic scale for myelopathies so far. For a clinical trial, several properties of the chosen scale will be essential to guarantee the best design, such as validity, reliability and sensitivity to change. At this very moment, it is not clear what scale will be best fitted to a future trial for AMN. Comparisons of these characteristics among different scales are needed and should be done in a near future.

## Conclusions

Neurologic impairments are frequent and are clearly related to age and to the CNS involvement, in heterozygote females. SSER of lower limbs and plasma NSE concentrations were altered in the majority of heterozygote females. Since they did not differentiate between symptomatic and asymptomatic heterozygotes, nor were related to age or disease duration, we cannot postulate them as good candidates as biomarkers of disease progression. VLFCFA and skewing inactivation were also unable to separate symptomatic from asymptomatic heterozygotes. Both increased with age, but dissociated from the increasing neurological symptoms. Among the number of potential biomarkers of disease progression, JOA and SSPROM presented the most robust associations with disease duration and age. Besides that, SSPROM correlated with SSER of lower limbs. We suggest that JOA and SSPROM might be valuable instruments in future natural history studies in heterozygotes for X-ALD.

## **Abbreviations**

AMN, Adrenomyeloneuropathy; AO, Age at onset; C22:0, Docosanoic acid; C24:0, Tetracosanoic acid; C26:0, Hexacosanoic acid; CALD, Cerebral form of ALD; CMAP, Compound muscle action potential; DD, Disease duration; HUMARA, Human androgenreceptor locus; JOA, Japanese Orthopaedic Association scale of myelopathy; m-NCV, Motor conduction velocity; NSE, Neuron-specific enolase; SNAP, Sensory nerve action potential; SPG, Spastic paraplegia; SPRS, Spastic Paraplegia Rating Scale; SSER, Somatosensory evoked responses; SSPROM, Severity Score System for Progressive Myelopathy; VLCFA, Very long chain fatty acids; X-ALD, X-linked Adrenoleukodystrophy.

## **Competing interests**

The author's declared that they have no competing interests.

## **Authors' contributions**

CTH conceived the study, participated in the design of the study, carried out the recruitment, interviews and clinical studies, and helped to draft the manuscript. PS carried out the SSER studies and participated in the analysis. PS and VTF carried out peripheral neurophysiology studies and participated in the analysis of the data. DMC performed VLCFA analyses and helped in the coordination of data. CRV performed VLCFA analyses and helped in the acquisition of funding. VT performed NSE analyses and participated in the analysis of data. LVP performed NSE studies and helped in the acquisition of funding. FSP carried out the molecular genetic studies and participated in the analysis. UM participated in the molecular analysis and in the coordination of data. LBJ conceived the study, participated in the design and coordination of the study, performed the statistical analysis, and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## **Acknowledgements**

We would like to thank the patients and their families for taking part in this study. We would also like to thank Raphael M. Castilhos and Deborah Blank for their technical assistance and contribution in early stages of this project; Karina C. Donis, André dos Anjos and Jonas Alex Saute for their contribution in recruiting some patients; and Ana Louzada for her technical assistance in the neurophysiological studies. This work was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), Project GPPG HCPA 110308; and by Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCTEN), Porto Alegre, Brazil. CTH were funded by INAGEMP - Instituto Nacional de Genética Médica Populacional. Pereira FS, Matte U, Portela LV and Jardim LB are funded by CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

## References

1. Bezman L, Moser AB, Raymond GV, Rinaldo P, Watkins PA, Smith KD, Kass NE, Moser HW: **Adrenoleukodystrophy: incidence, new mutation rate, and results of extended family screening.** *Ann Neurol* 2001, **49**(4):512–517.
2. Dubois-Dalcq M, Feigenbaum V, Aubourg P: **The neurobiology of X-linked adrenoleukodystrophy, a demyelinating peroxisomal disorder.** *Trends Neurosci* 1999, **22**(1):4–12. Review.
3. Mosser J, Lutz Y, Stoeckel ME, Sarde CO, Kretz C, Douar AM, Lopez J, Aubourg P, Mandel JL: **The gene responsible for adrenoleukodystrophy encodes a peroxisomal membrane protein.** *Hum Mol Genet* 1994, **3**(2):265–271.
4. Moser H, Smith K, Watkins P, Powers J, Moser A: **X-linked adrenoleukodystrophy.** In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Edited by Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D. New York, N.Y: McGraw-Hill; 2001:3257–3301.
5. Jangouk P, Zackowski KM, Naidu S, Raymond GV: **Adrenoleukodystrophy in female heterozygotes: underrecognized and undertreated.** *Mol Genet Metab* 2012, **105**(2):180–185.
6. Moser HW, Moser AB, Naidu S, Bergin A: **Clinical aspects of adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy.** *Dev Neurosci* 1991, **13**:254–261.
7. Zackowski KM, Dubey P, Raymond GV, Mori S, Bastian AJ, Moser HW: **Sensorimotor function and axonal integrity in adrenomyeloneuropathy.** *Arch Neurol* 2006, **63**:74–80.
8. Schmidt S, Träber F, Block W, Keller E, Pohl C, von Oertzen J, Schild H, Schlegel U, Klockgether T: **Phenotype assignment in symptomatic female carriers of X-linked adrenoleukodystrophy.** *J Neurol* 2001, **248**(1):36–44.
9. Asheuer M, Bieche I, Laurendeau I, Moser A, Hainque B, Vidaud M, Aubourg P: **Decreased expression of ABCD4 and BG1 genes early in the pathogenesis of X-linked adrenoleukodystrophy.** *Hum Mol Genet* 2005, **14**(10):1293–1303. Epub 2005 Mar 30.

10. Migeon BR, Moser HW, Moser AB, Axelman J, Sillence D, Norum RA:  
**Adrenoleukodystrophy: evidence for X linkage, inactivation, and selection favoring the mutant allele in heterozygous cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981, **78**(8):5066–5070.
11. Watkiss E, Webb T, Bunday S: **Is skewed X inactivation responsible for symptoms in female carriers for adrenoleucodystrophy?** *J Med Genet* 1993, **30**(8):651–654.
12. Maier EM, Muntau AC KS, Wichers M, Braun A, Roscher AA: **Symptoms in carriers of adrenoleukodystrophy relate to skewed X inactivation,** *Ann. Neurol* 2002, **52**:683–688.
13. Deon M, Sitta A, Barschak AG, Coelho DM, Terroso T, Schmitt GO, Wanderley HY, Jardim LB, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR: **Oxidative stress is induced in female carriers of X-linked adrenoleukodystrophy.** *J Neurol Sci* 2008, **266**(1–2):79–83.
14. Pereira FS, Matte U, Habekost CT, de Castilhos RM, El Husny AS, Lourenço CM, Vianna-Morgante AM, Giuliani L, Galera MF, Honjo R, Kim CA, Politei J, Vargas CR, Jardim LB: **Mutations, clinical findings and survival estimates in South American patients with X-linked adrenoleukodystrophy.** *PLoS One* 2012, **7**(3):e34195.
15. Yanenobu K, Abumi K, Negata K, *et al*: **Interobserver and Intraobserver Reliability of the Japanese Orthopaedic Association Scoring System for Evaluation of Cervical Compression Myelopathy.** *Spine* 2001, **26**:1890–1895.
16. Castilhos RM, Blank D, Netto CB, Souza CF, Fernandes LN, Schwartz IV, Giugliani R, Jardim LB: **Severity score system for progressive myelopathy: development and validation of a new clinical scale.** *Braz J Med Biol Res* 2012, **45**(7):565–572.
17. Merkies ISJ, Schmitz PIM, van der Meché FGA, *et al*: **Clinimetric evaluation of a new overall disability scale in immune mediated polyneuropathies.** *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002, **72**:596–601.
18. Kurtzke JF: **Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS).** *Neurology* 1983, **33**:1444–1452.

19. Dumitru D, Amato AA: **Acquired neuropathies**. In *Electrodiagnostic Medicine*. 2nd edition. Edited by Dumitru D, Zwarts MJ, Amato A. Philadelphia: Hanley and Belfus Inc; 2002:937–1041.
20. Chiappa KH: *Evoked Potentials in Clinical Medicine*. New York: Raven Press; 1997.
21. Moser HW, Moser AB: **Measurement of saturated very long chain fatty acid in plasma**. In *Techniques of diagnostic human biochemical genetics*. Edited by Hommes FA. New York: Wiley; 1991.
22. Moser AB, Kreiter N, Bezman L, Lu S, Raymond GV, Naidu S, Moser HW: **Plasma very long chain fatty acids in 3,000 peroxisome disease patients and 29,000 controls**. *Ann Neurol* 1999, **45**(1):100–110.
23. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells**. *Nucleic Acids Res* 1988, **16**(3):1215.
24. Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW: **Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgenreceptor gene correlates with X chromosome inactivation**. *Am J Hum Genet* 1992, **51**(6):1229–1239.
25. Sharp A, Robinson D, Jacobs P: **Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women**. *Hum Genet* 2000, **107**:343–349.
26. Landgraf JMA, Cottle A, Plenge RM, Friez M, Schwatz CE, Longshore J, Willard HF: **X Chromosome-Inactivation Patterns of 1,005 Phenotypically Unaffected Females**. *Am. J. Hum. Gent* 2006, **79**:493–499.
27. Moloney JB, Masterson JG: **Detection of adrenoleucodystrophy carriers by means of evoked potentials**. *Lancet* 1982, **2**:852–853.
28. Garg BP, Markand ON, DeMyer WE, Warren C Jr: **Evoked response studies in patients with adrenoleukodystrophy and heterozygous relatives**. *Arch Neurol* 1983, **40**:356–359.

29. Shimizu H, Moser HW, Naidu S: **Auditory brainstem response and audiologic findings in adrenoleukodystrophy: its variant and carrier.** *Otolaryngol Head Neck Surg* 1988, **98**:215–220.
30. Restuccia D, Di Lazzaro V, Valeriani M, Oliviero A, Le Pera D, Colosimo C, Burdi N, Cappa M, Bertini E, Di Biase A, Tonali P: **Neurophysiological abnormalities in adrenoleukodystrophy carriers. Evidence of different degrees of central nervous system involvement.** *Brain* 1997, **120**(7):1139–1148.
31. Mengel-From J, Thinggaard M, Christiansen L, Vaupel JW, Orstavik KH, Christensen K: **Skewed X inactivation and survival: a 13-year follow-up study of elderly twins and singletons.** *Eur J Hum Genet* 2012, **20**(3):361–364.
32. Stradomska TJ, Tylki-Szymańska A: **Decreasing serum VLCFA levels in ageing XALD female carriers.** *J Inherit Metab Dis* 2001, **24**(8):851–857.
33. Tort AB, Portela LV, Rockenbach IC, Monte TL, Pereira ML, Souza DO, Rieder CR, Jardim LB: **S100B and NSE serum concentrations in Machado Joseph disease.** *Clin Chim Acta* 2005, **351**(1–2):143–148.
34. Finsterer J, Löscher W, Quasthoff S, Wanschitz J, Auer-Grumbach M, Stevanin G: **Hereditary spastic paraplegias with autosomal dominant, recessive, X-linked, or maternal trait of inheritance.** *J Neurol Sci* 2012, **318**(1–2):1–18.
35. Schüle R, Holland-Letz T, Klimpe S, Kassubek J, Klopstock T, Mall V, Otto S, Winner B, Schöls L: **The Spastic Paraplegia Rating Scale (SPRS): a reliable and valid measure of disease severity.** *Neurology* 2006, **67**(3):430–434.

## List of Tables

**Table 1 Clinical characteristics of the local cohort of X-ALD heterozygote women**

	X-ALD Heterozygotes			p*
	All heterozygotes participant	Symtomatic	Asymtomatic	
N (families)	(16) 33	29	4	
Age at examination	41.2 ± 11.9	43.9 ± 10.2 (24–61)	24.3 ± 4.6 (20–30)	0.005
Age at onset of symptoms		39.4 ± 10 (21–59)		
Disease duration		4.5 ± 3.3		
JOA (range: -2 to17)	14.8 ± 1.8	14.5 ± 1.7	16.6 ± 0.2	0.005
SSPROM (range: 0 to 100)	88 ± 8.4	86.6 ± 7.9	98.4 ± 1.1	0.001
SSPROM Motor Disability (range: 0 to 30)	27.6 ± 2.6	27.3 ± 2.6	30 ± 0	0.023
SSPROM Motor Strength (0 to 20)	18.9 ± 2	19.1 ± 1.3	17.5 ± 5	ns
SSPROM sensory losses (0 to 20)	16.4 ± 2.4	16.1 ± 2.3	18.5 ± 9	ns
SSPROM spasticity/ hyperreflexia (0 to 10)	6.1 ± 2.1	5.7 ± 1.8	9.4 ± 1.2	0.05
SSPROM sphincter contro (0 to 30)	27.6 ± 2.6	17.8 ± 2.3	20 ± 0	ns

\* Mann-Whitney U.

**Table 2 Nerve conduction studies according to the presence or absence of symptoms of 22 ×-ALD heterozygote women**

Neuroconduction studies, right side (Mean ± sd) (range)		All 22 heterozygotes	Presence of symptoms		p*
			Symptomatic (20)	Asymptomatic (2)	
Motor conduction velocity (m/s)	Median	57 ± 6.2 (47–73)	56.9 ± 6.5	58.9 ± 2.2	ns
	(results above the cutoff value of 49,2)		(2)	(0)	
	Fibular	48.1 ± 5 (40–55)	47.3 ± 4.9	53.2 ± 1	ns
	(results above the cutoff value of 45.3)		(3)	(0)	
	Tibial	49.5 ± 4.6 (44–63)	49.2 ± 4.6	54.4	ns
	(results above the cutoff value of 39.9)		(0)	(0)	
Sensitive conduction velocity (m/s)	Median	49.4 ± 3.9 (42–59)	49.2 ± 4	52 ± 2	ns
	(results above the cutoff value of 51.7)		(12)	(0)	
	Ulnar	52.6 ± 6 (44–66)	52.8 ± 6.3	51.3 ± 0.6	ns
	(results above the cutoff value of 53.8)		(3)	(0)	
	Fibular superficial	53.7 ± 5.7 (44–64)	53.1 ± 5.4	58.4 ± 7.5	ns
	(results above the cutoff value of 35)		(0)	(0)	
Motor conduction amplitude (mV)	Median	9 ± 3.6 (2–16)	9 ± 3.7	9.2 ± 0.5	ns
	(results under the cutoff value of 3.3)		(1)	(0)	
	Fibular	4 ± 1.9 (1–7)	4 ± 1.8	3.9 ± 3.2	ns
	(results under the cutoff value of 1.6)		(1)	(0)	
	Tibial	7.7 ± 4.7 (2 to 19)	7.6 ± 5	8.1 ± 2.3	ns
	(results under the cutoff value of 2,8)		(1)	(0)	
Sensitive conduction amplitude (µV)	Median	14.5 ± 5.8 (5 to 29)	14.5 ± 5.9	15.2 ± 7	ns
	(results under the cutoff value of 15.1)		(3)	(0)	
	Ulnar	11.3 ± 6 (5 to 27)	11.4 ± 6.4	10.9 ± 3.3	ns
	(results under the cutoff value of 5.8)		(0)	(1)	
	Fibular	15.3 ± 6.6 (5 a 30)	15.3 ± 6.5	15.4 ± 11	ns
	(results under the cutoff value of 10)		(2)	(1)	

\* Mann-Whitney U.

**Table 3 Somatosensory evoked responses according to the presence or absence of symptoms of 25 ×-ALD heterozygote women**

Somatosensory evoked responses		All 25 heterozygote females	Presence of symptoms		p
			Symptomatic women: 23	Asymptomatic women: 2	
Upper Limbs (N20, or somatosensory cortex contralateral to the wrist stimulated) in ms	Mean ± sd	19.2 ± 1.1	20.1 ± 4.2	18 ± 0.9	ns *
	Above the cutoff value of 20.5 ms	6/25	6/23	0/2	ns #
Lower Limbs (P40, or somatosensory cortex ipsilateral to the tibial nerve stimulated) in ms	Mean ± sd	38 ± 2,5	55.3 ± 32.8	38.9 ± 3.8	ns *
	Above the cutoff value of 41,5 ms	18/25	17/23	1/2	ns #

\* Mann-Whitney U; m/s = meters per second; mV – milivolts; μV = microvolts.

## List of figures

**Figure 1 Associations relating JOA and SSPROM scales to independent variables age, disease duration and somato-sensory evoked responses.** (A and B) Disease duration of symptomatic heterozygotes. (C and D) Age at examination all heterozygotes. (E) Somatosensory evoked responses of lower limbs of all heterozygotes.

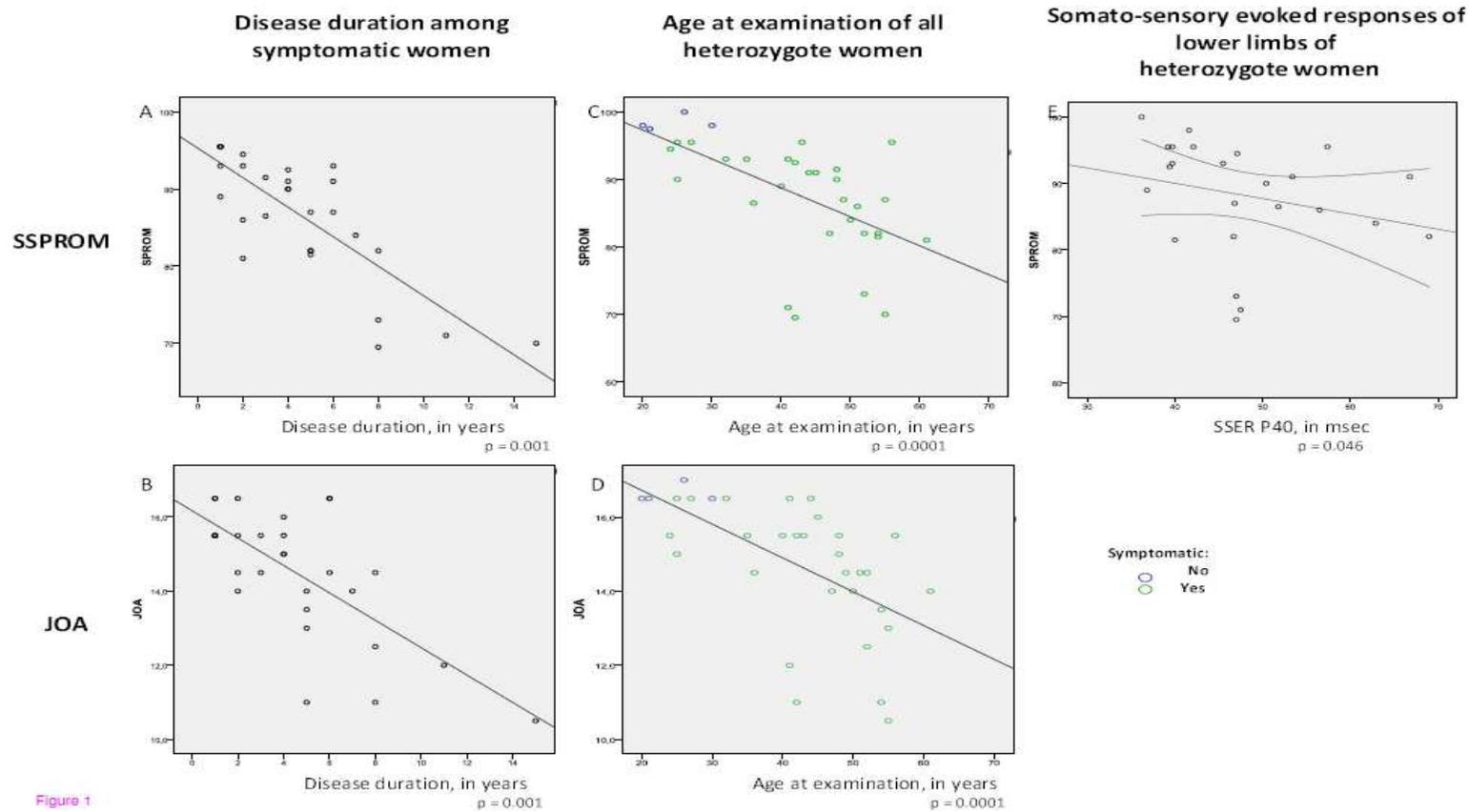
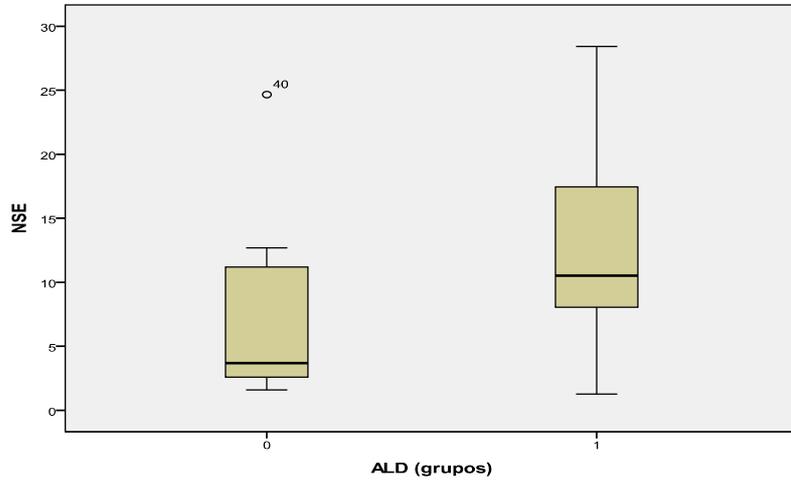


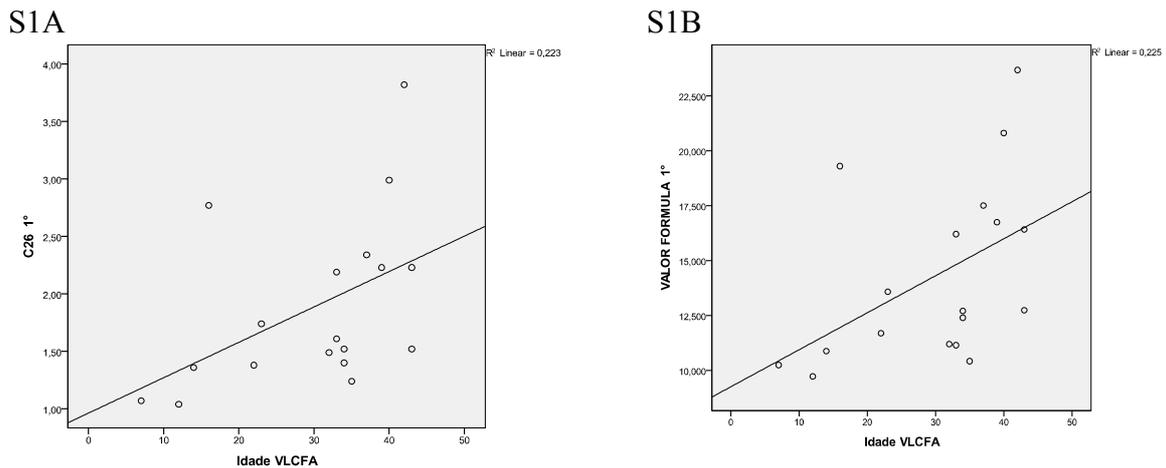
Figure 1

**Figure 2 - NSE among the X-ALD heterozygotes and the control women.**

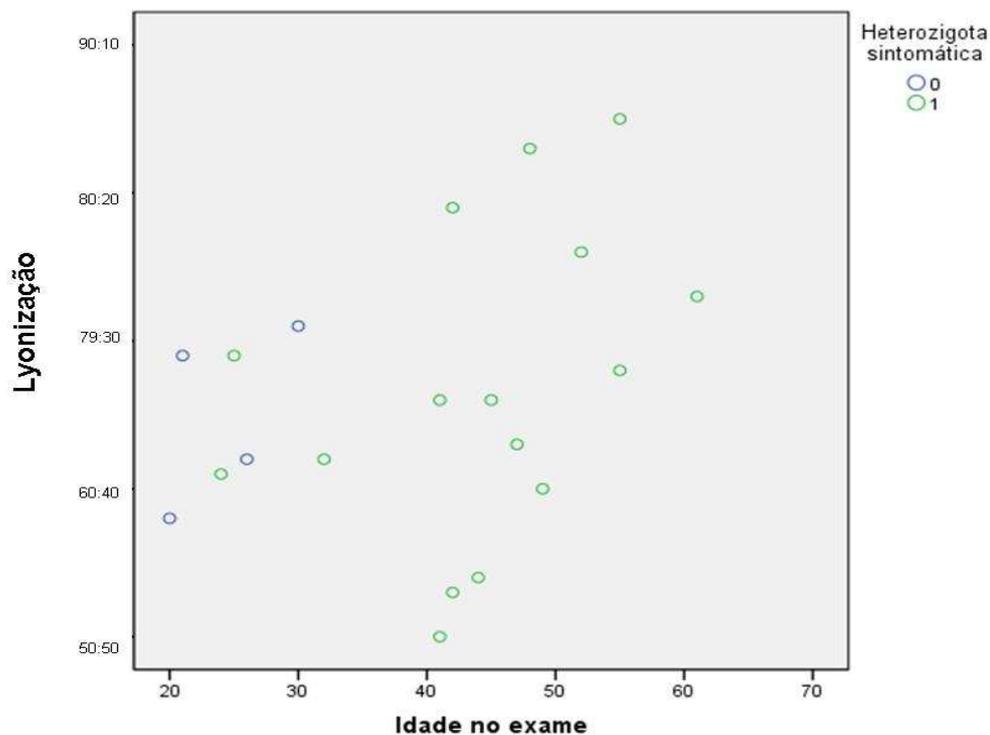


## List of Supplemental Material

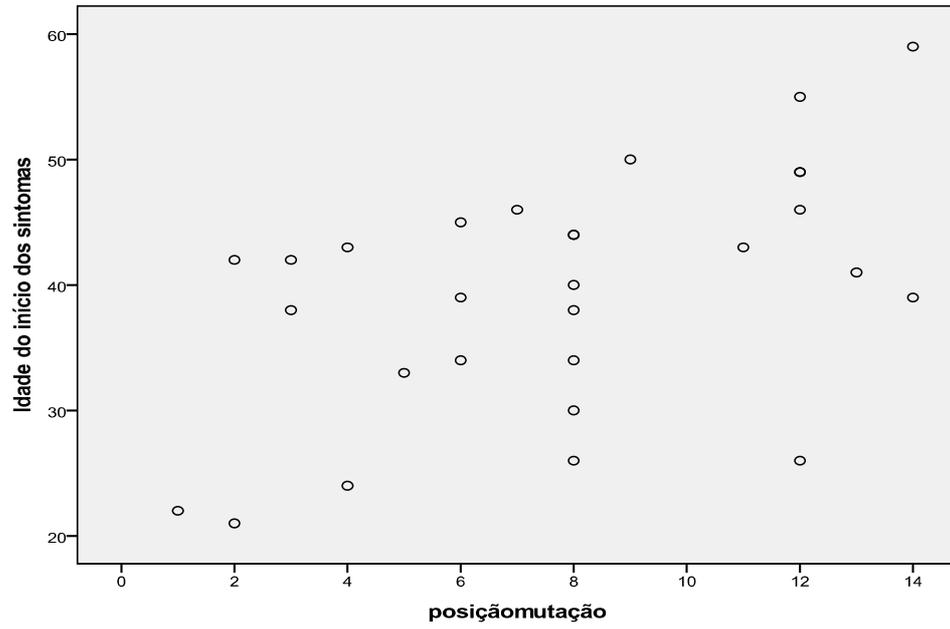
**Supplemental Material Figure 1-Associations between age and (S1A) C26:00 plasma levels and (S1B) VLCFA discriminative factor  $3,805(C24:0/C22:0)+5,296(C26:0/C22:0)+5,15(C26:0)$**



**Supplemental Material Figure 2 – Association between the X inactivation pattern and the age at examination of the X-ALD heterozygotes.**



**Supplemental Material Figure 3 – Age at onset of symptoms in relation to the position of the mutation in the gene.**



**Supplemental Material Table 1 – Correlations found between the clinical scales (JOA and SSPROM) and the other variables studied in the X-ALD heterozygotes.**

		Clinical scales		
		JOA	SPROMM	
Age (n=33)		ns	ns	
Age at onset (n=29)		ns	ns	
Disease duration (n=29)		<0,001	<0,001	
Mutation position (n=33)		ns	ns	
Neurophysiologic studies (n=22)				
Peripheral neurophysiology	Motor conduction velocities	Median	ns	ns
		Fibular	ns	ns
		Tibial	ns	ns
	Motor amplitudes	Median	ns	ns
		Fibular	ns	ns
		Tibial	ns	ns
	Sensory conduction velocities	Median	ns	ns
		Ulnar	ns	ns
		Tibial	ns	ns
	Sensory amplitudes	Median	ns	ns
		Ulnar	ns	ns
		Tibial	ns	ns
Evoked potential latencies	Upper limbs (N9)		ns	ns
	Upper limbs (N20)		0.079	0.053
	Lower limbs (P40)		0.088	0.018
	Lower limbs (N50)		ns	0.035

Ns: non significant

## X. Discussão

O presente estudo recrutou 33 de 45 potenciais mulheres heterozigotas (aproximadamente 73%) para o gene ABCD1 diagnosticadas em nosso centro. Destas 45, 39 foram contatadas, 2 não tiveram interesse em participar do estudo. Das 37 restantes 4 foram excluídas por apresentarem outras possíveis causas de mielopatia ou neuropatia periférica. Nota-se que a amostra foi extremamente representativa do grupo de mulheres heterozigotas. Se considerarmos que das 33 mulheres que participaram, apenas 4 eram assintomáticas, temos um percentual elevado em comparação a algumas descrições prévias da literatura. Sabe-se que as 4 pacientes excluídas por outras potenciais causas de mieloneuropatia já eram sintomáticas. Então, se incluíssemos as 4 mulheres que não participaram da avaliação inicial e considerássemos que todas fossem assintomáticas, ainda haveria uma elevada proporção de mulheres com sintomas relacionados à Adrenoleucodistrofia ligada ao X , 29/41 (aproximadamente 71%). Este elevado número foi surpreendente. Pode-se imaginar que o número de sintomáticas seja realmente elevado ou que haja uma tendência de as mulheres com sintomas procurarem atendimento mais freqüentemente. Poderíamos também cogitar que as mulheres que procuraram atendimento fossem mais velhas e como demonstrado anteriormente, à medida que a idade avança a probabilidade de sintomas neurológicos iniciarem também avança. No entanto, comparando-se a idade entre as heterozigotas que participaram do estudo e das que não participaram, não há diferença estatística entre suas idades ( $40.9 \pm 15$  and  $41.2 \pm 11.9$ , ns, **Tabela 1**), logo um viés de seleção não teria sido evitado com o recrutamento de todo o grupo de 45 mulheres. De fato, estudos que recrutam heterozigotas que vem para atendimento não por sua condição, mas acompanhando seus filhos, tem maior probabilidade de apresentarem menos vieses [Moser et al 1991]. Conforme estes autores, em torno de 50% das heterozigotas X-ALD apresentam algum

grau de acometimento neurológico. Nós reconhecemos que a relativa desproporção entre sintomáticas e assintomáticas pode ser uma limitação do presente estudo, contudo, cabe ressaltar que associações independentes entre as escalas JOA e SSPROM com idade sugere que o estado sintomático pode ser um evento tempo dependente.

No que tange nosso conhecimento, estudos anteriores evidenciaram a presença freqüente de sintomas medulares e, eventualmente, periféricos nas heterozigotas, mas até o momento, outras causas de mielopatia e neuropatia periférica não haviam sido estudadas e separadas para evitar vieses de detecção.

Em relação à avaliação clínica, é desafiador achar um instrumento adequado de quantificação da desabilidade física, mas, essencial para entender a taxa de progressão de uma doença neurológica. Escalas clínicas como a *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) e a *Functional Independence Measure* (FIM) nos dão um quadro geral, mas tem pouca sensibilidade quanto aos sintomas (Jangouk et al 2012). Avaliações quantitativas são necessárias para detectar alterações sutis ao longo do tempo, especialmente se estas avaliações necessitam focar-se em determinadas áreas dos sistemas acometidos pela doença. Em nosso estudo utilizamos duas escalas clínicas, a *Japanese Orthopaedic Association Scores System* (JOA) e a *Progressive Myelopathy Score System* (SSPROM). Ambas avaliam funções como capacidade para alimentar-se, manter-se em pé, locomover-se, além de questionar sobre funções vesicais e proprioceptivas. A JOA foi desenvolvida para avaliar pacientes com compressão cervical degenerativa, enquanto a SSPROM, para avaliar mielopatias metabólicas progressivas (Yonenobu et al., 2001; Castilhos et al., 2012). Então, para aumentar o conhecimento sobre a progressão da doença neurológica nas mulheres, ambas as escalas foram aplicadas e comparadas com os demais parâmetros coletados durante o estudo.

As escalas neurológicas foram significativamente diferentes entre os dois grupos (assintomáticas vs sintomáticas). A pequena superposição entre os grupos indica que a SSPROM e a JOA são acuradas em confirmar o estado clínico, especialmente se considerarmos que a diferença atingiu significância mesmo com o pequeno número de assintomáticas. Além disso, as escalas associaram-se significativamente com a duração dos sintomas, mostrando a natureza progressiva da doença. As escalas, também, apresentaram uma tendência de associação com a idade de início dos sintomas e a idade atual. Por esta associação não ter significância estatística, podemos levantar a hipótese de que outros fatores possam estar agindo para o início dos sintomas.

O estado clínico (assintomática vs sintomática) claramente associou-se com a idade e, apesar de poucas, as assintomáticas eram significativamente mais jovens do que as sintomáticas fazendo-nos pensar que a idade seja um fator determinante no aparecimento dos sintomas. Logo, para avaliar a precocidade de sintomas, a eletrofisiologia periférica e central foi estudada.

Após os escores clínicos, os potenciais evocados somatossensitivos de membros inferiores mostram anormalidades prevalentes em todo o grupo de heterozigotas, assim como resultados visto por outros (Moloney et al 1982; Garg et al 1983; Shimizu et al 1988; Restuccia et al 1997; Schmidt et al 2001). O potencial P40 correlacionou-se bem com a duração da doença e a escala SSPROM o que indica o valor do uso de ambos, escalas e potenciais evocados dos membros inferiores, ao avaliar as heterozigotas. A ausência de correlação significativa, apenas uma tendência de maiores latências do P40 e N50 com idade de início dos sintomas e idade atual pode ser devido ao fato de que mesmo as assintomáticas e as pacientes mais jovens já apresentem latências distais prolongadas e, portanto não puderam ser separadas do resto do grupo. Deve ser considerado que o grupo de assintomáticas era proporcionalmente pequeno e isto pode

ter influenciado na ausência de achados. Como a duração da doença foi fortemente relacionada a escores mais baixos nas escalas clínicas, também se viu correlações entre a SSPROM e o aumento da latência nos potenciais evocados de membros inferiores. A presença apenas de uma tendência de associação entre a escala JOA e o P40 pode ser devido ao fato desta escala variar menos do que a SSPROM.

Assim como outros (Schmidt et al 2001), não encontramos alterações substanciais na neurofisiologia periférica. Dois achados interessantes, no entanto, devem ser levantados: apesar de dano mielínico periférico não ser esperado nas heterozigotas, 12 de 22 mulheres apresentaram velocidades do mediano (medidas no cotovelo) abaixo dos *cutoffs*. O segundo é a correlação da amplitude do SNAP do fibular superficial com a idade ao exame. Quanto mais tarde o início da doença, melhores os valores de amplitude. Então, questionamos se a associação com o início precoce de sintomas pode estar relacionada à integridade axonal sensitiva distal ou, o acometimento periférico é um evento tardio na evolução clínica da AMN nas heterozigotas e aquelas com idade de início mais precoce, também apresentavam maior tempo de sintomas, logo maior tempo para que o dano periférico iniciasse. Apesar dos achados descritos acima, danos axonais ou mielínicos difusos não foram encontrados.

Somando-se os achados da eletrofisiologia e as escalas clínicas com suas associações à duração da doença, idade de início dos sintomas e idade atual, fica a questão de que as assintomáticas talvez não sejam completamente livres de acometimento e, talvez, dado tempo o suficiente, todas venham a apresentar sintomas.

O padrão de inativação do X foi estudado anteriormente como causa das diferenças de gravidade e início da doença nas heterozigotas (Jangouk et al 2012). A inativação do X foi estudada como fator modificador que pode influenciar a apresentação de doenças ligadas ao X. Sabe-se que a proporção de X inativados muda ao longo da vida (Lyon

MF, 1961; Huynh KD *et al*, 2003; Okamoto I *et al.*, 2004). Nos homens e mulheres com formas mieloneuropáticas de X-ALD, os neurônios tornam-se disfuncionais e entram em uma via de morte celular. Se uma inativação enviesada de leucócitos periféricos estiver relacionada ao padrão de inativação nos neurônios que estão claramente envolvidos na fisiopatologia da doença, dois possíveis mecanismos podem estar atuando: uma correspondência perfeita entre o padrão de inativação do X dos leucócitos e dos neurônios ou mecanismos intercelulares de ação e, ambas, são hipóteses complicadas. Diferentemente de alguns autores (Maier *et al* 2002) mas semelhante a outros (Watkiss *et al*, 1993), nós não achamos associação entre a inativação do X e o estado sintomático ou os escores neurológicos. Houve, apenas, uma tendência a uma inativação mais enviesada à medida que a idade das heterozigotas avaliadas aumentava ( $r = 0.37$ ,  $p = 0.1$ , Spearman, **Mat Sup Figura 2**). Também houve uma tendência de as mulheres com melhores escores nas escalas clínicas apresentarem maior proporção de inativação enviesada. Um dos nossos resultados trouxe dúvidas em retirar a inativação do X dos possíveis mecanismos de doença: a associação entre maiores concentrações dos VLCFAs e a idade. Infelizmente, os VLCFA não foram coletados simultaneamente com os estudos de inativação, então, no momento, não podemos explorar a possibilidade desta relação. Outros autores observaram que os VLCFAs diminuía à medida que as heterozigotas X-ALD envelheciam (Stradomska *et al* 2001), então estes achados necessitam ser confirmados no futuro.

Podemos apenas especular que o padrão de inativação neuronal permanece o mesmo ao longo da vida, mas as células da glia poderiam acompanhar o padrão dos leucócitos periféricos. Então, neste caso, a inativação, dependendo do X favorecido, poderia ser danosa ou protetora dependendo da proporção de X livre de mutação para X-ALD presente nas células gliais.

Um biomarcador de dano neuronal é de extrema utilidade para acompanhar uma doença de lenta progressão ou para prever o início dos sintomas cerebrais no caso dos homens hemizigotos. A Enolase (NSE) específica de neurônios é uma enzima glicolítica citoplasmática na qual a isoforma gama-gama é encontrada nos neurônios e células neuroendócrinas em diferenciação. Como a NSE não é secretada fisiologicamente, o aumento dos seus níveis plasmáticos podem ser associados a danos estruturais nos neurônios tal qual reportado no trauma crânio-encefálico (Pleines et al, 2001), Acidente Vascular Cerebral (Herrmann et al 2003), crise epilépticas (Büttner et al 1999) e doença de Machado-Joseph (Tort et al 2005). A NSE pode, então, ser considerada um marcador de dano em patologias do sistema nervoso. E como esperado, as concentrações plasmáticas de NSE foram maiores nas heterozigotas do que nos controles. Infelizmente não foi possível associar a NSE com nenhuma outra variável relacionada à progressão e à gravidade da doença nas heterozigotas, tais como a idade de início, a idade atual, a duração da doença, a posição e o tipo de mutações, as escalas JOA e SSPROM ou os estudos neurofisiológicos centrais. No entanto, uma tendência de associação entre a NSE e amplitude do nervo sensitivo fibular superficial ocorreu. Como este aumento de amplitude indica um acometimento axonal periférico, talvez este dano tenha mais facilmente elevado os níveis plasmáticos de NSE do que em mulheres que tiveram apenas dano central. Fica a questão de que uma medida de NSE líquórica possa refletir melhor a presença de dano neuronal central. A outra hipótese que pode ser levantada é a possibilidade de que, uma vez que a NSE correlacionou-se significativamente ao estado de heterozigose, talvez quase todas as heterozigotas já tenha algum grau de dano neuronal e, portanto, a NSE não foi capaz de distingui-las.

Em nosso grupo, 4 de 37 mulheres apresentavam outros fatores de risco para mieloneuropatias. No entanto, elas não eram estatisticamente diferentes em relação à

idade de início dos sintomas, à idade atual, às escalas SSPROM e JOA e à duração dos sintomas. Esta avaliação precisa de um número maior de heterozigotas para determinar sua real influência sobre a fisiopatologia da doença.

## **IX. Conclusões**

Concluimos que a presença de sintomas está claramente relacionada à idade e, ao contrário dos homens hemizigotos que apresentam acometimento central e periférico relativamente proporcional (Aubourg et al., 2002), as mulheres heterozigotas X-ALD tem na medula seu principal foco de sintomas. As duas escalas clínicas foram capazes de diferenciar heterozigotas assintomáticas e sintomáticas e foram associadas com a duração da doença, enquanto as anormalidades no potencial evocado somatossensitivo, especialmente dos membros inferiores, foi muito freqüente, inclusive nas assintomáticas. Por serem escalas que avaliam principalmente danos medulares e pelo fato dos potenciais evocados somatossensitivos de membros inferiores estarem freqüentemente alterados, inclusive nas assintomáticas, acreditamos que as alterações neurofisiológicas antecedem o aparecimento de sintomas confirmando dados descritos anteriormente por Restuccia et al, 1997 e podem ser um bom marcador de início da doença. A proteína NSE foi associada ao estado de heterozigose e também deve ser considerada uma candidata a biomarcador da doença. Enfim, ressaltamos a importância do diagnóstico diferencial de mieloneuropatias nas heterozigotas X-ALD e o tratamento das condições associadas quando adequado.

## X. Referências bibliográficas

- 1 Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet.* 1992 Dec;51(6):1229-39.
- 2 Asheuer M, Bieche I, Laurendeau I, Moser A, Hainque B, Vidaud M, Aubourg P (2005) Decreased expression of ABCD4 and BG1 genes early in the pathogenesis of X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet* 14:1293–1303.
- 5 Aubourg P, Adamsbaum C, Lavallard- Rousseau MC, Lemaitre A, Boureau F, Mayer M, Kalifa G (1992) Brain MRI and electrophysiologic abnormalities in preclinical and clinical adrenomyeloneuropathy. *Neurology* 42:85–91
- 3 Aubourg P, Adamsbaum C, Lavallard-Rousseau MC, Rocchiccioli F, Cartier N, Jambaqué I, Jakobezak C, Lemaitre A, Boureau F, Wolf C, et al. A two-year trial of oleic and erucic acids ("Lorenzo's oil") as treatment for adrenomyeloneuropathy. *N Engl J Med.* 1993 Sep 9;329(11):745-52
- 4 Aubourg P, Sack GH, Meyers DA, Lease JJ, Moser HW. Linkage of adrenoleukodystrophy to a polymorphic DNA probe, *Ann. Neurol.* 21 (1987) 349–352.
- 6 Aubourg P, Adamsbaum C, Lavallard Rousseau MC, Lemaitre. Somatosensory evoked potentials in adrenomyeloneuropathy. *Neurology* 48:1662–1667; 1997
- 7 Avner P, Heard E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet.* 2001 Jan;2(1):59-67. Review
- 8 Baarine M, Andréoletti P, Athias A, Nury T, Zarrouk A, Ragot K, Vejux A, Riedinger JM, Kattan Z, Bessede G, Trompier D, Savary S, Cherkaoui-Malki M, Lizard G. Evidence of oxidative stress in very long chain fatty acid-treated oligodendrocytes and potentialization of ROS production using RNA interference-directed knockdown of ABCD1 and ACOX1 peroxisomal proteins. *Neuroscience.* 2012 Jun 28;213:1-18.
- 9 Berger J, Albet S, Bentejac M, Netik A, Holzinger A, Roscher A, Bugaut M, Forss-Petter S. The four murine peroxisomal ABC-transporter genes differ in constitutive, inducible and developmental expression, *Eur. J. Biochem.* 265 (1999) 719–727.
- 10 Berger J, Gärtner J. X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, biochemical and pathogenetic aspects. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Dec;1763(12):1721-32.
- 11 Berger J, Molzer B, Fae I, Bernheimer H. X-linked adrenoleukodystrophy (ALD): a novel mutation of the ALD gene in 6 members of a family presenting with 5 different phenotypes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205 (1994) 1638–1643.
- 12 Berić A, Prevec TS. The early negative potential evoked by stimulation of the tibial nerve in man. *J Neurol Sci.* 1981 May;50(2):299-306.
- 13 Bezman L, Moser AB, Raymond GV, Rinaldo P, Watkins PA, Smith KD, Kass NE, Moser HW. Adrenoleukodystrophy: incidence, new mutation rate, and results of extended family screening. *Ann Neurol.* 2001 Apr; 49(4):512-

- 14 Boureau A, Mayer F, Kalifa M G (1992) Brain MRI and electrophysiologic abnormalities in preclinical and clinical adrenomyeloneuropathy. *Neurology* 42:85–91
- 15 Burns T.M. and Mauermann M.L., The Evaluation of Polyneuropathies . *Neurology* 2011;76;S6
- 16 Büttner T, Lack B, Jäger M, Wünsche W, Kuhn W, Müller T, Przuntek H, Postert T. Serum levels of neuron-specific enolase and s-100 protein after single tonic-clonic seizures. *J Neurol.* 1999 Jun;246(6):459-61.
- 17 Cappa M, Bizzarri C, Petroni A, Carta G, Cordeddu L, Valeriani M, Vollono C, De Pasquale L, Blasevich M, Banni S. A mixture of oleic, erucic and conjugated linoleic acids modulates cerebrospinal fluid inflammatory markers and improve somatosensorial evoked potential in X-linked adrenoleukodystrophy female carriers. *J Inherit Metab Dis.* 2012 Sep;35(5):899-907
- 18 Castilhos RM, Blank D, Netto CB, Souza CF, Fernandes LN, Schwartz IV, Giugliani R, Jardim LB. Severity score system for progressive myelopathy: development and validation of a new clinical scale. *Braz J Med Biol Res.* 2012 Jul;45(7):565-72.
- 19 Chaudhry V, Moser HW, Cornblath DR. Nerve conduction studies in adrenomyeloneuropathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 61 (1996) 181–185.
- 20 Chiappa KH: *Evoked Potentials in Clinical Medicine.* New York, Raven Press, 1997.
- 21 Cinti DL, Cook L, Nagi MN, Suneja SK (1992) The fatty acid chain elongation system of mammalian endoplasmic reticulum. *Prog Lipid Res* 31:1–51.
- 22 Colli W, Hinkle PC, Pullman ME (1969) Characterization of the fatty acid elongation system in soluble extracts and membrane preparations of rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 244:6432–6443.
- 23 Cook L, Nagi MN, Suneja SK, Hand AR, Cinti DL (1992) Evidence that beta-hydroxyacyl-CoA dehydrase purified from rat liver microsomes is of peroxisomal origin. *Biochem J* 287:91–100.
- 24 Cruse R, Klem G, Lesser RP, Leuders H. Paradoxical lateralization of cortical potentials evoked by stimulation of posterior tibial nerve. *Arch Neurol.* 1982 Apr;39(4):222-5.
- 25 DeLisa JA, Mackenzie K, Baran EM. *Manual of Nerve Conduction Velocity and Somatosensory Evoked Potential* (2nd ed.) New York, Raven Press, 1987.
- 26 Deon M, Sitta A, Barschak AG, Coelho DM, Pigatto M, Schmitt GO, Jardim LB, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR. Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy *Int. J. Dev. Neurosci.* 25 (2007) 441–444.
- 27 Deon M, Sitta A, Barschak AG, Coelho DM, Terroso T, Schmitt GO, Wanderley HY, Jardim LB, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR. Oxidative stress is induced in female carriers of X-linked adrenoleukodystrophy. *J Neurol Sci.* 2008 Mar 15;266(1-2):79-83.

- 28 Desmedt JE, Bourguet M. Color imaging of parietal and frontal somatosensory potential fields evoked by stimulation of median or posterior tibial nerve in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1985 Jan;62(1):1-17.
- 29 Dubey P, Fatemi A, Huang H, Nagae-Poetscher L, Wakana S, Barker PB, et al. Diffusion tensor-based imaging reveals occult abnormalities in adrenomyeloneuropathy. *Ann Neurol* 2005;58:758–66.
- 30 Dubois-Dalcq M, Feigenbaum V, Aubourg P. The neurobiology of X-linked adrenoleukodystrophy, a demyelinating peroxisomal disorder. *Trends Neurosci.* 1999 Jan;22(1):4-12. Review.
- 31 Dumitru, D, Zwarts MJ, Amato, AA. *Electrodiagnosis Medicine*, 2<sup>nd</sup> Edition. 2002
- 32 Eichler FS, Ren JQ, Cossoy M, Rietsch AM, Nagpal S, Moser AB, Frosch MP and Ransohoff RM. Is Microglial Apoptosis an Early Pathogenic Change in Cerebral X-Linked Adrenoleukodystrophy? *Annals of Neurology* Vol 63 No 6 June 2008
- 33 el-Deiry SS, Naidu S, Blevins LS, Ladenson PW. Assessment of adrenal function in women heterozygous for adrenoleukodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Mar;82(3):856-60
- 34 Erwin JA, Lee JT. New twists in X-chromosome inactivation. *Curr Opin Cell Biol.* 2008 Jun;20(3):349-55.
- 35 Fatemi A, Barker PB, Uluğ AM, Nagae-Poetscher LM, Beauchamp NJ, Moser AB, Raymond GV, Moser HW, Naidu S. MRI and proton MRSI in women heterozygous for X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurology.* 2003 Apr 22;60(8):1301-7.
- 36 Forsyth CC, Forbes M, Cumings JN. Adrenocortical atrophy and diffuse cerebral sclerosis, *Arch. Dis. Child.* 46 (1971) 273–284.
- 37 Fouquet F, Zhou JM, Ralston E, Murray K, Troalen F, Magal E, Robain O, Dubois-Dalcq M, Aubourg P. Expression of the adrenoleukodystrophy protein in the human and mouse central nervous system, *Neurobiol. Dis.* 3 (1997) 271–285.
- 38 Fouquet F, Zhou JM, Ralston E, Murray K, Troalen F, Magal E, Robain O, Dubois-Dalcq M, Aubourg P. Expression of the adrenoleukodystrophy protein in the human and mouse central nervous system. *Neurobiol. Dis.* 3 (1997) 271–285.
- 39 Fourcade S, Lopez-Erauskin J, Galino J, Duval D, Naudi A, Jove M, Kemp S, Villarroya F, Ferrer I, Pamplona R, Portero-Otin R, Pujol A, Early oxidative damage underlying neurodegeneration in X-adrenoleukodystrophy, *Hum. Mol. Genet.* 17 (2008) 1762–1773.
- 40 Fourcade S, Ruiz M, Guilera C, Hahnen E, Brichta L, Naudi A, Portero-Otín M, Dacremont G, Cartier N, Wanders R, Kemp S, Mandel JL, Wirth B, Pamplona R, Aubourg P, Pujol A. Valproic acid induces antioxidant effects in X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet.* 2010 May 15;19(10):2005-14.
- 41 Gale RE, Fielding AK, Harrison CN, Linch DC. Acquired skewing of X-chromosome inactivation patterns in myeloid cells of the elderly suggests stochastic clonal loss with age. *Br J Haematol.* 1997 Sep;98(3):512-9.
- 42 Galea E, Launay N, Portero-Otin M, Ruiz M, Pamplona R, Aubourg P, Ferrer I, Pujol A. Oxidative stress underlying axonal degeneration in adrenoleukodystrophy: a paradigm for multifactorial neurodegenerative

- diseases? *Biochim Biophys Acta*. 2012 Sep;1822(9):1475-88
- 43 Garg, B.P., Markand, O.N., DeMyer, W.E, Warren Jr, C., Evoked response studies in patients with adrenoleukodystrophy and heterozygous relatives, *Arch. Neurol.* 40 (1983) 356–359.
- 44 Gartler SM, Riggs AD. Mammalian X-chromosome inactivation. *Annu Rev Genet.* 1983;17:155-90. Review.
- 45 Grainger BT, Papchenko TL, Danesh-Meyer HV (2010) Optic nerve atrophy in adrenoleukodystrophy detectable by optic coherence tomography. *J Clin Neurosci* 17:122–124.
- 46 Hendrich BD, Plenge RM, Willard HF. Identification and characterization of the human XIST gene promoter: implications for models of X chromosome inactivation. *Nucleic Acids Res.* 1997 Jul 1;25(13):2661-71
- 47 Herrmann M, Ehrenreich H. Brain derived proteins as markers of acute stroke: their relation to pathophysiology, outcome prediction and neuroprotective drug monitoring. *Restor Neurol Neurosci.* 2003;21(3-4):177-90.
- 48 Hershkovitz E, Narkis G, Shorer Z, Moser AB, Watkins PA, Moser HW, Manor E. Cerebral X-linked adrenoleukodystrophy in a girl with Xq27-Ter deletion. *Ann Neurol.* 2002 Aug;52(2):234-7.
- 49 Higgins CF. ABC transporters. From microorganisms to man, *Annu. Rev. Cell Biol.* 8 (1992) 67–113.
- 50 Ho JK, Moser H, Kishimoto Y, Hamilton JA (1995) Interactions of a very long chain fatty acid with model membranes and serum albumin. Implications for the pathogenesis of adrenoleukodystrophy. *J Clin Invest* 96:1455–1463.
- 51 Hoftberger R, Kunze , I. Weinhofer, F. Boul-Enein, T. Voigtlander, I. Oezen, G. Amann, H. Bernheimer, H. Budka, J. Berger, Distribution and cellular localization of adrenoleukodystrophy protein in human tissues: implications for X-linked adrenoleukodystrophy, *Neurobiol. Dis.* 28 (2007) 165–174.
- 52 Holzinger A, Kammerer A, Berger J, Roscher AA. cDNA cloning and mRNA expression of the human adrenoleukodystrophy related protein (ALDR), a peroxisomal ABC-transporter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239 (1997) 261–264.
- 53 Holzinger A, Kammerer S, Roscher AA. Primary structure of human PMP69, a putative peroxisomal ABC-transporter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237 (1997) 152–157.
- 54 <http://www.x-ald.nl>
- 55 Hudspeth MP, Raymond GV. Immunopathogenesis of adrenoleukodystrophy: current understanding. *J Neuroimmunol.* 2007 Jan;182(1-2):5-12.
- 56 Huynh KD, Lee JT. Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos. *Nature.* 2003 Dec 18;426(6968):857-62.
- 57 Igarashi M, Schaumburg HH, Powers J, Kishimoto Y, Kolodny E, Suzuki K. Fatty acid abnormality in adrenoleukodystrophy, *J. Neurochem.* 26 (1976) 851–860.

- 58 Jangouk P, Zackowski KM, Naidu S, Raymond GV. Adrenoleukodystrophy in female heterozygotes: underrecognized and undertreated. *Mol Genet Metab.* 2012 Feb;105(2):180-5
- 59 Jardim LB, da Silva AC, Blank D, Villanueva MM, Renck L, Costa ML, Vargas CR, Deon M, Coelho DI, Vedolin L, de Castro CG Jr, Gregianin L, Bonfim C, Giugliani R. X-linked adrenoleukodystrophy: clinical course and minimal incidence in South Brazil. *Brain Dev.* 2010 Mar;32(3):180-90.
- 60 Johnsen B, Fuglsang-Frederiksen A. Electrodiagnosis of polyneuropathy. *Neurophysiol Clin.* 2000 Dec;30(6):339-51.
- 61 Johnson AB, Schaumburg HH, Powers JM, Histochemical characteristics of the striated inclusions of adrenoleukodystrophy, *J. Histochem. Cytochem.* 24 (1976) 725–730.
- 62 Kakigi R, Shibasaki H. Effects of age, gender, and stimulus side on the scalp topography of somatosensory evoked potentials following posterior tibial nerve stimulation. *J Clin Neurophysiol.* 1992 Jul;9(3):431-40.
- 63 Kaplan PW, R.J. Tusa, J. Shankroff, J. Heller, H.W. Moser, Visual evoked potentials in adrenoleukodystrophy: a trial with glycerol trioleate and Lorenzo oil, *Ann. Neurol.* 34 (1993) 169–174.
- 64 Kaplan PW, Tusa RJ, Rignani J, Moser HW (1997) Somatosensory evoked potentials in adrenomyeloneuropathy. *Neurology* 48:1662–1667
- 65 Kemp S, Ligtenberg MJ, van Geel BM, Barth PG, Wolterman RA, Schoute F, Sarde CO, Mandel JL, van Oost BA, Bolhuis PA. Identification of a two base pair deletion in five unrelated families with adrenoleukodystrophy: a possible hot spot for mutations, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202 (1994) 647–653.
- 66 Kemp S, Theodoulou SL, Wanders RJ. Mammalian peroxisomal ABC transporters: from endogenous substrates to pathology and clinical significance, *Br. J. Pharmacol.* 164 (2011) 1753–1766.
- 67 Kemp S, Wei HM, Lu JF, Braiterman LT, McGuinness MC, Moser AB, Watkins PA, Smith KD. Gene redundancy and pharmacological gene therapy: implications for X-linked adrenoleukodystrophy. *Nat Med.* 1998 Nov;4(11):1261-8.
- 68 Knazek RA, Rizzo WE, Schuiman JD, Dave JR. Membrane microviscosity is increased in the erythrocytes of patients with adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. *Clin Invest* 1983;72:245-8.
- 69 Korenke GC, Fuchs F, Krasemann E, Doerr HG, Wilichowski E, Hunneman DH, Hanefeld F. Cerebral adrenoleukodystrophy (ALD) in only one of monozygotic twins with an identical ALD genotype. *Ann. Neurol.* 40 (1996) 254–257.
- 70 Lanasa MC, Hogge WA, Kubik C, Blancato J, Hoffman EP. Highly skewed X-chromosome inactivation is associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Am J Hum Genet.* 1999 Jul;65(1):252-4.
- 71 Landgraf JMA, Cottle A, Plenge RM, Friez M, Schwartz CE, Longshore J, and Willard HF. X Chromosome–Inactivation Patterns of 1,005 Phenotypically Unaffected Females. *Am. J. Hum. Genet.* 2006;79:493–499.
- 72 Lavrov SA, Kibanov MV. Noncoding RNAs and chromatin structure. *Biochemistry (Mosc).* 2007 Dec;72(13):1422-38. Review.
- 73 Lesser RP, Lüders H, Dinner DS, Hahn J, Morris H, Wyllie E, Resor S. The source of 'paradoxical lateralization' of cortical evoked potentials to posterior tibial nerve stimulation. *Neurology.* 1987 Jan;37(1):82-8.
- 74 Liu LX, Janvier K, Berteaux-Lecellier V, Cartier N, Benarous R, Aubourg

- P. Homo- and heterodimerization of peroxisomal ATP-binding cassette half-transporters, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 32738–32743.
- 75 Lo, Y.L, Xu, L.Q, Leoh, T.H, Dan, Y.F, Tan, Y.E, Nurjannah, S, Ratnagopal, P. Superficial peroneal sensory and sural nerve conduction studies in peripheral neuropathy. *Journal of Clinical Neuroscience* 13 (2006) 547-540.
- 76 Lombard-Platet G, Savary S, Sarde CO, Mandel JL, Chimini G, A close relative of the adrenoleukodystrophy (ALD) gene codes for a peroxisomal protein with a specific expression pattern, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1996) 1265–1269.
- 77 López-Erauskin J, Fourcade S, Galino J, Ruiz M, Schlüter A, Naudi A, Jove M, Portero-Otin M, Pamplona R, Ferrer I, Pujol A. Antioxidants halt axonal degeneration in a mouse model of X-adrenoleukodystrophy. *Ann Neurol.* 2011 Jul;70(1):84-92
- 78 Lyon MF. X-chromosome inactivation as a system of gene dosage compensation to regulate gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1989;36:119-30. Review.
- 79 Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.), *Nature.* 1961 Apr 22;190:372-3.
- 80 Mahmood A, Dubey P, Moser HW, Moser A. X-linked adrenoleukodystrophy: therapeutic approaches to distinct phenotypes. *Pediatr Transplant.* 2005 Dec;9 Suppl 7:55-62. Review.
- 81 Maier, E.M, Kammerer, S Muntau, A.C, Wichers, M, Braun, A, Roscher, A.A, Symptoms in carriers of adrenoleukodystrophy relate to skewed X inactivation, *Ann. Neurol.* 52 (2002) 683–688
- 82 Mattei MG, Mattei JF, Ayme S, Giraud F. X-autosome translocations: cytogenetic characteristics and their consequences. *Hum Genet.* 1982;61(4):295-309.
- 83 McGuinness MC, Lu JF, Zhang HP, Dong GX, Heinzer AK, Watkins PA, Powers J, Smith KD, 2003. Role of ALDP (ABCD1) and mitochondria in X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol. Cell. Biol.* 23, 744–753.
- 84 Ménage P, Carreau V, Tourbah A, Fontaine B, Paturneau-Jouas M, Gout O, Lubetzki C, Baumann N, Lyon-Caen O. Symptomatic heterozygotic adrenoleukodystrophy in adults. 10 cases. *Rev Neurol (Paris).* 1993;149(8-9):445-54
- 85 Migeon BR, Moser HW, Moser A, Axelman J, Sillence D, Norum RA. Adrenoleukodystrophy: evidence for X-linkage, inactivation and selection favoring the mutant allele in heterozygous cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78 (1981) 5066–5070 )
- 86 Moloney, J.B, Masterson, J.G. Detection of adrenoleukodystrophy carriers by means of evoked potentials, *Lancet* 2 (1982) 852–853.
- 87 Moon YA, Horton JD (2003) Identification of two mammalian reductases involved in the two-carbon fatty acyl elongation cascade. *J Biol Chem* 278:7335–7343.
- 88 Morató L, Galino J, Ruiz M, Calingasan NY, Starkov AA, Dumont M, Naudí A, Martínez JJ, Aubourg P, Portero. Pioglitazone halts axonal degeneration in a mouse model of X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain.* 2013 Aug;136(Pt 8):2432-43.
- 89 Moser HW SK, Watkins PA, Powers J, Moser AB (2001) X-linked adrenoleukodystrophy. In: CR Scriver AB, Sly WS, Valle D, *The Metabolic*

- and Molecular Bases of Inherited Disease. New York: McGraw Hill. 3257–3301.
- 90 Moser HW, Moser AB, Naidu S, Bergin A. Clinical aspects of adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. *Dev Neurosci* 1991;13:254-61.)
- 91 Moser HW. Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain*. 1997 Aug;120 ( Pt 8):1485-508. Review.
- 92 Moser HW. Lorenzo oil therapy for adrenoleukodystrophy: a prematurely amplified hope. *Ann Neurol*. 1993 Aug;34(2):121-2.
- 93 Moser HW, Dubey P, Fatemi A. Progress in X-linked adrenoleukodystrophy. *Curr Opin Neurol*. 2004 Jun;17(3):263-9. Review.
- 94 Moser HW, Mihalik SJ, Watkins PA. Adrenoleukodystrophy and other peroxisomal disorders that affect the nervous system, including new observations on L-pipecolic acid oxidase in primates. *Brain Dev*. 1989;11(2):80-90. Review
- 95 Moser HW, Moser AB, Frayer KK, Chen W, Schulman JD, O'Neill BP, Kishimoto Y. Adrenoleukodystrophy: increased plasma content of saturated very long chain fatty acids. 1981. *Neurology*. 1998 Aug;51(2):334 and 9 pages following.
- 96 Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H, Poustka AM, Mandel JL, Aubourg P. Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature*. 1993 Feb 25;361(6414):726-30.
- 97 Mosser J, Lutz Y, Stoeckel ME, Sarde CO, Kretz C, Douar AM, Lopez J, Aubourg P, Mandel JL. The gene responsible for adrenoleukodystrophy encodes a peroxisomal membrane protein. *Hum Mol Genet*. 1994 Feb;3(2):265-71.
- 98 Naidu S, Dlouhy SR, Geraghty MT, Hodes ME. A male child with the rumpshaker mutation, X-linked spastic paraplegia/Pelizaeus-Merzbacher disease and lysinuria. *J Inher Metab Dis*. 1997 Nov;20(6):811-6.
- 99 Oberle I, Drayna D, Camerino G, White R, Mandel JL. The telomere of the human X-chromosome long arm: presence of a highly polymorphic DNA marker and analysis of recombination frequency, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82 (1985) 2824–2828.
- 100 Oezen, I., Rossmannith, W., Forss-Petter, S., Kemp, S., Voigtländer, T., Moser-Thier, K., Wanders, R., Bittner, R., Berger, J., 2005. Accumulation of very long-chain fatty acids does not affect mitochondrial function in adrenoleukodystrophy protein deficiency. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1127–1137.
- 101 Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science*. 2004 Jan 30;303(5658):644-9
- 102 O'Neill BP, Moser HW, Saxena KM, Marmion LC. Adrenoleukodystrophy: clinical and biochemical manifestations in carriers, *Neurology* 34 (1984) 798–801.

- 103 Pelosi L, Cracco JB, Cracco RQ, Hassan NF. Comparison of scalp distribution of short latency somatosensory evoked potentials (SSEPs) to stimulation of different nerves in the lower extremity. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1988 Nov-Dec;71(6):422-8.
- 104 Pereira Fdos S, Matte U, Habekost CT, de Castilhos RM, El Husny AS, Lourenço CM, Vianna-Morgante AM, Giuliani L, Galera MF, Honjo R, Kim CA, Politei J, Vargas CR, Jardim LB. Mutations, clinical findings and survival estimates in South American patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *PLoS One.* 2012;7(3):e34195.
- 105 Pestronk A (1991) Invited review: motor neuropathies, motor neuron disorders, and antiglycolipid antibodies. *Muscle Nerve* 14:927–936.
- 106 Pleines UE, Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Joller H, Trentz O, Kossmann T. S-100 beta reflects the extent of injury and outcome, whereas neuronal specific enolase is a better indicator of neuroinflammation in patients with severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2001 May;18(5):491-8.
- 107 Plenge RM, Hendrich BD, Schwartz C, Arena JF, Naumova A, Sapienza C, Winter RM, Willard HF. A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation. *Nat Genet.* 1997 Nov;17(3):353-6.
- 108 Powers JM, DeCiero DP, Cox C, Richfield EK, Ito M, Moser AB, Moser HW (2001) The dorsal root ganglia in adrenomyeloneuropathy: neuronal atrophy and abnormal mitochondria. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:493–501.
- 109 Powers JM, DeCiero DP, Ito M, Moser AB, Moser HW. Adrenomyeloneuropathy: a neuropathologic review featuring its noninflammatory myelopathy, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59 (2000) 89–102.
- 110 Powers JM, Moser HW. Peroxisomal disorders: genotype, phenotype, major neuropathologic lesions, and pathogenesis. *Brain Pathol.* 1998 Jan;8(1):101-20. Review
- 111 Powers JM, Pei Z, Heinzer AK, Deering R, Moser AB, Moser HW, Watkins PA, Smith KD. Adreno-leukodystrophy: oxidative stress of mice and men. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64 (2005) 1067–1079.
- 112 Powers JM, Schaumburg HH, Adreno-leukodystrophy (sex-linked Schilder's disease). A pathogenetic hypothesis based on ultrastructural lesions in adrenal cortex, peripheral nerve and testis, *Am. J. Pathol.* 76 (1974) 481–491.
- 113 Pujol A, Hindelang C, Callizot N, Bartsch U, Schachner M, Mandel JL. Late onset neurological phenotype of the X-ALD gene inactivation in mice: a mouse model for adrenomyeloneuropathy, *Hum. Mol. Genet.* 11 (2002) 499–505.
- 114 Restuccia D, Di Lazzaro V, Valeriani M, Oliviero A, Le Pera D, Colosimo C, Burdi N, Cappa M, Bertini E, Di Biase A, Tonali P. Neurophysiological abnormalities in adrenoleukodystrophy carriers. Evidence of different degrees of central nervous system involvement. *Brain.* 1997 Jul;120 (Pt 7):1139-48.
- 115 Rodriguez MC, MacDonald JR, Mahoney DJ, et al. Beneficial effects of creatine, CoQ10, and lipoic acid in mitochondrial disorders. *Muscle Nerve*

- 2007;35:235–242.
- 116 Salsano E, Tabano S, Sirchia SM, Colapietro P, Castellotti B, Gellera C, Rimoldi M, Pensato V, Mariotti C, Pareyson D, Miozzo M, Uziel G. Preferential expression of mutant ABCD1 allele is common in adrenoleukodystrophy female carriers but unrelated to clinical symptoms. *Orphanet J Rare Dis.* 2012 Jan 26;7:10.
- 117 Schaumburg HH, Powers JM, Raine CS, Suzuki K, Richardson EP Jr. Adrenoleukodystrophy. A clinical and pathological study of 17 cases. *Arch Neurol.* 1975 Sep;32(9):577-91.
- 118 Scherg M, von Cramon D (1985) A new interpretation of the generators of BAEP waves I-V: results of a spatiotemporal dipole model. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 62:290–299
- 119 Schluter A, Espinosa L, Fourcade S, Galino J, Lopez E, Ilieva E, Morato L, Asheuer M, Cook T, McLaren A, Reid J, Kelly F, Bates S, Aubourg P, Galea E, Pujol A. Functional genomic analysis unravels a metabolic-inflammatory interplay in adrenoleukodystrophy, *Hum. Mol. Genet.* 21 (2012) 1062–1077.
- 120 Schmidt S, Träber F, Block W, Keller E, Pohl E, Oertzen JV, Schild H, Schlegel U, Klockgether T. Phenotype assignment in symptomatic female carriers of X-linked adrenoleukodystrophy. *J Neurol* (2001) 248:36–44
- 121 Seyal M, Emerson RG, Pedley TA. Spinal and early scalp-recorded components of the somatosensory evoked potential following stimulation of the posterior tibial nerve. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1983 Mar;55(3):320-30
- 122 Shani n, Jimenez-Sanchez g, Steel G, Dean M, Valle D. Identification of a fourth half ABC transporter in the human peroxisomal membrane, *Hum. Mol. Genet.* 6 (1997) 1925–1931.
- 123 Shimizu, H, Moser, H.W, Naidu, S. Auditory brainstem response and audiologic findings in adrenoleukodystrophy: its variant and carrier, *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 98 (1988) 215–220
- 124 Singh H, Brogan M, Johnson D, Poulos A (1992) Peroxisomal beta-oxidation of branched chain fatty acids in human skin fibroblasts. *J Lipid Res* 33:1597–1605.
- 125 Singh I, Moser HW, Moser AB, Kishimoto Y, Adrenoleukodystrophy: impaired oxidation of long chain fatty acids in cultured skin fibroblasts and adrenal cortex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102 (1981) 1223–1229.
- 126 Singh I, Pujol A (2010) Pathomechanisms underlying X-adrenoleukodystrophy: a three-hit hypothesis. *Brain pathology* 20: 838–844.
- 127 Singh J, Khan M, Pujol A, Baarine M, Singh I. Histone deacetylase inhibitor upregulates peroxisomal Fatty Acid oxidation and inhibits apoptotic cell death in abcd1-deficient glial cells. *PLoS One.* 2013 Jul 26;8(7):e70712.
- 128 Singh I, Pahan K, Khan M. Lovastatin and sodium phenylacetate normalize the levels of very long chain fatty acids in skin fibroblasts of X-adrenoleukodystrophy. *FEBS Lett.* 1998 Apr 24;426(3):342-6.
- 129 Singh I, Khan M, Key L, Pai S. Lovastatin for X-linked adrenoleukodystrophy. *N Engl J Med.* 1998 Sep 3;339(10):702-3
- 130 Smith KD, Kemp S, Braiterman LT, Lu JF, Wei HM, Geraghty M, Stetten G, Bergin JS, Pevsner J, Watkins PA. X-linked adrenoleukodystrophy: genes, mutations, and phenotypes, *Neurochem. Res.* 24 (1999)

- 521–535.
- 131 Smith S (1994) The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J* 8:1248–1259.
- 132 Stradomska TJ, Tylki-Szymańska A. Decreasing serum VLCFA levels in ageing X-ALD female carriers. *J Inherit Metab Dis.* 2001 Dec;24(8):851-7.
- 133 Tankisi H, Pugdahl K, Fuglsang-Frederiksen A, Johnsen B, de Carvalho M, Fawcett PR, Labarre-Vila A, Liguori R, Nix WA, Schofield IS; Esteem Project. Pathophysiology inferred from electrodiagnostic nerve tests and classification of polyneuropathies. Suggested guidelines. *Clin Neurophysiol.* 2005 Jul;116(7):1571-80.
- 134 Thode A, Laing S, Partington MW, Turner G. Is there a fragile(X) negative Martin-Bell syndrome? *Am J Med Genet.* 1988 May-Jun;30(1-2):459-71. Review.
- 135 Tort AB, Portela LV, Rockenbach IC, Monte TL, Pereira ML, Souza DO, Rieder CR, Jardim LB. S100B and NSE serum concentrations in Machado Joseph disease. *Clin Chim Acta.* 2005 Jan;351(1-2):143-8.
- 136 Troffer-Charlier, N., Doerflinger, N., Metzger, E., Fouquet, F., Mandel, J.L., Aubourg, P., 1998. Mirror expression of adrenoleukodystrophy and adrenoleukodystrophy related genes in mouse tissues and human cell lines. *Eur. J. Cell Biol.* 75, 254–264.
- 137 Valeriani M, Restuccia D, Di Lazzaro V, Barba C, Le Pera D, Tonali P. Dipolar generators of the early scalp somatosensory evoked potentials to tibial nerve stimulation in human subjects. *Neurosci Lett.* 1997 Nov 28;238(1-2):49-52.
- 138 van Geel BM, Bezman L, Loes DJ, Moser HW, Raymond GV. Evolution of phenotypes in adult male patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Ann. Neurol.* 49 (2001) 186–194.
- 139 van Geel BM, Assies J, Wanders RJ, Barth PG. X linked adrenoleukodystrophy: clinical presentation, diagnosis, and therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1997 Jul;63(1):4-14.
- 140 Vas GA, Cracco JB, Cracco RQ. Scalp-recorded short latency cortical and subcortical somatosensory evoked potentials to peroneal nerve stimulation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1981 Jul;52(1):1-8.
- 141 Wakil SJ (1989) Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry* 28:4523–4530.
- 142 Watkiss E, Webb T, Bunday S. Is skewed X inactivation responsible for symptoms in female carriers for adrenoleukodystrophy? *J Med Genet.* 1993 Aug;30(8):651-4.
- 143 Wells S, Mould S, Robins D, Robinson D, Jacobs P. Molecular and cytogenetic analysis of a familial microdeletion of Xq. *J Med Genet.* 1991 Mar;28(3):163-6.
- 144 Yamada T. *J Clin Neurophysiol.* 2000 May;17(3):269-79 Neuroanatomic substrates of lower extremity somatosensory evoked potentials
- 145 Yamada T, Matsubara M, Shiraishi G, Yeh M, Kawasaki M. Topographic analyses of somatosensory evoked potentials following stimulation of tibial, sural and lateral femoral cutaneous nerves. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1996 Jan;100(1):33-43.
- 146 Yanenobu K, Abumi K, Negata K, et al. Interobserver and Intraobserver Reliability of the Japanese Orthopaedic Association Scoring System for Evaluation of Cervical Compression Myelopathy. *Spine* 2001;26:1890-

1895.

## **XI. Anexos**

### **1. Termos de consentimento livre e informado**

#### **INFORMAÇÕES SOBRE O PROJETO:**

#### **AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS, DE DANO NEURONAL E MIELÍNICO E DE ELETRONEUROMIOGRAFIA NAS MULHERES PORTADORAS DE ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AO X**

#### **PARA PORTADORAS DA ADRENOLEUCODISTROFIA**

Esta é uma pesquisa que tem por objetivo principal analisar as manifestações clínicas das mulheres heterozigotas para a adrenoleucodistrofia ligada ao X (ALD) e correlacionar esses achados com proteínas e um tipo de células presentes no sangue, que poderiam ser biomarcadores da ALD. A intenção é a de se compreender melhor os mecanismos dessa doença nas mulheres e, talvez, buscar a aquisição de conhecimento que possibilite um futuro tratamento mais eficaz.

As manifestações clínicas serão analisadas através de um exame neurológico padronizado (duas escalas) e de um estudo de eletroneuromiografia. A palavra “Biomarcador” quer dizer uma substância que serve para indicar como está um processo de doença ou como uma doença está respondendo a um tratamento. A ALD não tem muitos biomarcadores e é importante se descobrirem outros. Os que vamos estudar nesse projeto serão obtidos de uma coleta de sangue convencional e vão incluir: as proteínas S100B e NSE, que podem indicar danos de neurônios ou de mielina; e os moduladores da imunidade CD1 e Tregs.

É necessário estudar um grupo de mulheres que não são portadoras da ALD para comparar seus resultados com os das portadoras. Por isso, mulheres reconhecidamente

não afetadas, provenientes de uma família com ALD, também serão convidadas a participar desse estudo.

Você está sendo convidada a participar dessa pesquisa, por ser portadora da ALD. Sua participação, caso estiver de acordo com ela, envolverá (1) uma entrevista clínica; (2) a realização de exame físico neurológico padronizado em duas escalas (chamadas de JOA e de PROMSS); (3) a realização de uma eletromiografia com estudo da velocidade de condução motora e sensitiva, avaliação da resposta simpática cutânea, potencial somatossensitivo medular e cortical e medida do intervalo RR e (4) a coleta de 20 mL de sangue. Entretanto, tudo isso somente será feito, depois de você autorizar a sua participação nesse estudo, entregando um documento assinado por si ou por seu representante legal.

O sangue coletado será armazenado, para fins dessa pesquisa. Ele poderá ser utilizado para outros fins somente mediante a sua autorização por escrito, tanto no presente termo de consentimento, como em documentos futuros. Solicitaremos sua autorização expressa para qualquer nova pesquisa para a qual cogitarmos em aproveitar o material armazenado. Por isso, ficaremos com seu endereço e telefone. Novos projetos de pesquisa que aparecerem no futuro, para os quais eventualmente solicitarmos sua aprovação para o aproveitamento do seu material estocado, também deverão obter aprovação prévia da Comissão de Ética Local (chamada de GPPG) e da Comissão Nacional de Pesquisa (chamada de CONEP).

Os riscos envolvidos nessa pesquisa são: mal-estar pela passagem de corrente elétrica durante a realização do exame, mal-estar passageiro ou mancha roxa no local da coleta de sangue e cansaço. Seu nome será mantido em sigilo pelos pesquisadores envolvidos no estudo, sendo estes dados utilizados apenas para esta pesquisa.

Os resultados definitivos não terão prazo para sua liberação, pois dependem de análises bioquímicas em implementação no laboratório. Esses resultados também não terão uma interpretação direta: ou seja, não serão “bons” ou “maus”. Mesmo assim, se você o desejar, podemos entregá-los assim que ficarem prontos. Nossa estimativa é a de que

isso aconteça no final do estudo, em 2012. Se assim o desejar, por favor, assinale na folha do Termo de Consentimento.

Os resultados dos exames realizados no seu material ficarão guardados em bancos de dados protegidos, aos quais terão acesso somente os pesquisadores envolvidos. Nenhum resultado seu será divulgado ou liberado para terceiros. São considerados dados sigilosos, e estarão apenas à sua disposição ou de seu representante legal.

Pesquisador Responsável: Dr<sup>a</sup> Laura Bannach Jardim

Pesquisador Executor: Clarissa Troller Habekost

Endereço e telefone da pesquisadora responsável, Laura Bannach Jardim,

Serviço de Genética Médica do HCPA

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

Tel.: (51) 3359-8011

Fax: (51) 3359-8010

## 2. Termo de consentimento livre e esclarecido

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
**PROJETO: AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS T**  
**REGULATÓRIAS, DE DANO NEURONAL E MIELÍNICO E DE**  
**ELETRONEUROMIOGRAFIA NAS MULHERES PORTADORAS DE**  
**ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AO X**  
(uma via para o Serviço Executor e outra para o indivíduo)

Responsável: Professora Laura Bannach Jardim  
Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre; e Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Marque a sua resposta a cada um desses itens:

1	Você teve acesso às informações dadas pelo laboratório que vai realizar a pesquisa?	Sim
		Não
2	Ficou com essas informações?	Sim
		Não
3	Você pôde fazer perguntas a respeito do teste?	Sim
		Não
4	As respostas que lhe deram foram satisfatórias?	Sim
		Não
5	Você entendeu que o resultado será sigiloso e somente entregue a você ou a seu representante legal?	Sim
		Não
6	Você entendeu que não há prazo para a entrega dos resultados de seus exames, pois os testes serão feitos como pesquisa?	Sim
		Não
7	Você concorda que a sua amostra seja aproveitada em outras pesquisas, futuras, e para isso seja guardada no laboratório que vai fazer a pesquisa?	Sim
		Não
8	Você entendeu que você está livre para sair do estudo a qualquer momento? sem precisar dar qualquer explicação? sem que isso afete o seu atendimento médico aqui?	Sim
		Não
9	Você gostaria de receber os resultados desta pesquisa?	Sim
		Não
10	Como gostaria de recebê-los?	Por carta
		Em consulta
11	Você concorda em participar desse estudo?	Sim
		Não
12	Qual médico conversou com você sobre este estudo?	

---

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Nome por extenso \_\_\_\_\_  
Paciente ou Responsável legal

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Médico \_\_\_\_\_  
Assinatura Nome por extenso

O médico preenche: ( ) portadora de ALD ( ) não portadora de ALD

Serviço de Genética Médica do HCPA

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

Tel.: (51) 3359-8011

Data:

Fax: (51) 3359-8010

### 3. Progressive Myelopathy Score System (SSPROM)

<b>Subescala de incapacidade</b>			
<b>Disfunção Membros Superiores</b>	<b>Não afetado</b>	<b>Afetado mas não impedido</b>	<b>Impedido</b>
Vestir parte superior do corpo (excluindo botões e zíperes)			
Lavar e pentear os cabelos			
Virar a chave na fechadura			
Usar garfo e faca (colher – aplicável se paciente nunca usou garfo e faca)			
Fechar e abrir botões e zíperes			
<b>Escore Membros Superiores</b>			
Normal			5
Sintomas ou sinais menores em um ou ambos os membros superiores mas não afetando nenhuma das funções listadas.			4
Sintomas ou sinais moderados em um ou ambos os membros superiores afetando mas não impedindo nenhuma das funções listadas.			3
Sintomas ou sinais graves em um ou ambos os membros superiores impedindo ao menos uma função listada.			2
Sintomas ou sinais graves em ambos os membros superiores impedindo todas as funções listadas mas algum movimento propositado ainda possível.			1
Sintomas e sinais graves em ambos os membros superiores impedindo qualquer movimento propositado.			0
<b>Disfunção Membros Inferiores</b>	<b>Não</b>	<b>Sim</b>	<b>Não aplicável</b>
Você tem algum problema para caminhar?			
Você usa algum apoio para caminhar?			
Você caminha por cerca de 10 metros: Sem apoio			

Com uma bengala ou muleta ou segurando no braço de alguém				
Com duas bengalas ou muletas ou com uma bengala ou muleta e segurando no braço de alguém				
Com cadeira de rodas				
Se você usa cadeira de rodas, você consegue dar alguns passos com ajuda?				
Se você está restrito à cadeira de rodas ou à cama, você é capaz de realizar algum movimento propositado?				
<b>Escore Membros Inferiores</b>				
<b>Marcha não afetada</b>			5	
Marcha afetada, mas consegue caminhar independentemente fora de casa			4	
Geralmente usa apoio unilateral para caminhar fora de casa			3	
Geralmente usa apoio bilateral para caminhar fora de casa			2	
Geralmente usa cadeira de rodas para sair de casa, mas capaz de ficar em pé e dar alguns passos com ajuda			1	
Restrito a cadeira de rodas, incapaz de ficar em pé ou dar alguns passos com ajuda			0	
<b>Escore total: Escore Membros superiores + Escore Membros Inferiores</b>				
<b>Subescala de força</b>				
<b>Força em Membros Superiores</b>	Flexão do cotovelo		Abdução do braço	
	D	E	D	E
5 = normal				

4 = reduzida mas impondo alguma resistência contra examinador					
3 = vence a gravidade mas não o examinador					
2 = move se a gravidade for retirada					
1 = esboça movimento mas não desloca a articulação					
0 = normal					
<b>Força em Membros Inferiores</b>		Flexão do joelho		Flexão do quadril	
		D	E	D	E
5 = normal					
4 = reduzida mas impondo alguma resistência contra examinador					
3 = só vence a gravidade, não vence examinador					
2 = move se a gravidade for neutralizada					
1 = esboça movimento mas não desloca a articulação					
0 = plegia					
<b>Escore total: Escore Membros Inferiores + Escore Membros Superiores</b>					
<b>Subescala de Sensibilidade</b>					
<b>Membros Superiores</b>					
Provas	Critério de alteração	D		E	
		Normal (1)	Alterada (0)	Normal (1)	Alterada (0)
Sensibilidade vibratória no punho e no cotovelo.	< 11 seg em alguma das posições.				

Discriminação entre estímulo táctil e algésico usando agulha: 10 vezes. Face externa do braço	> 2 erros em 10				
Dorso da mão					
Discriminação entre água fria (10°C) e quente (40-60°C): 10 vezes (antebraço).	> 2 erros em 10				
Sensibilidade cinético-postural (1º dedo) – 10 vezes	> 2 erros em 10				
<b>Membros Inferiores</b>					
Provas	Critério de alteração	D		E	
		Normal (1)	Alterada (0)	Normal (1)	Alterada (0)
Sensibilidade vibratória no hálux e no joelho.	<11 seg em alguma das posições				
Discriminação entre estímulo táctil e algésico usando agulha: 10 vezes. Face externa na coxa	>2 erros em 10				
Dorso do pé					
Discriminação entre água fria (10°C) e quente (40-60°C): 10 vezes (face externa da perna).	>2 erros em 10				
Sensibilidade cinético-postural (hálux) – 10 vezes	>2 erros em 10				
<b>Escore total: Escore Membros Inferiores + Escore Membros Superiores</b>					

<b>Subescala Espasticidade</b>				
	Membros Superiores		Membros Inferiores	
	D	E	D	E
5 = Sem aumento do tônus muscular				
4 = Aumento leve do tônus.				
3 = Aumento mais marcado do tônus mas as partes afetadas são facilmente fletidas.				
2 = Aumento considerável do tônus, movimentos passivos são difíceis.				
1 = As partes afetadas são rígidas em flexão ou extensão.				
0 = Atonia				
Hiperreflexia nos quatro membros	-10			
Hiperreflexia somente em membros inferiores	-5			
<b>Escore total: somatório do quatro membros</b>				
<b>Subescala de disfunção esfinteriana</b>				
Normal	5			
Hesitação, urgência ou retenção urinárias leve	4			
Hesitação, urgência ou retenção urinária ou fecal moderadas, ou incontinência urinária rara (auto-cateterização intermitente, compressão manual para evacuar a bexiga ou uso dos dedos para evacuar)	3			
Incontinência urinária freqüente	2			
Cateterização quase constante (ou uso constante de medidas para evacuar)	1			

Perda da função vesical e fecal		0
<b>Escore total disfunção esfinteriana</b>		
<b>Cálculo do escore total</b>	<b>Ajustador aritmético</b>	<b>Escore ajustado</b>
Escore total disfunção	X 3	
Escore total força	÷2	
Escore total sensibilidade	Inalterado	
Escore total espasticidade	÷ 2	
Escore total função esfinteriana	X 4	
Total geral (soma dos escores parciais ajustados)		

#### 4. Escala JOA

#### Japanese Orthopaedic Association Scoring System for Cervical Myelopathy (JOA)

##### Funções Motoras

###### *Dedos*

- 0 Incapaz de alimentar-se sozinho com qualquer utensílio, incluindo, colher, garfo e\ou incapaz de abotoar botões de qualquer tamanho
- 1 Incapaz de usar garfo ou faca mas pode comer com colher
- 2 Capaz de comer com faca e garfo mas com muita dificuldade
- 3 Capaz de usar faca ou garfo com pouca dificuldade
- 4 Normal

###### *Ombro e Cotovelo (avaliado pela escore de força MRC no deltóide ou bíceps, o que for mais fraco)*

- força grau 2 ou menor  
2
- força grau 3  
1
- força grau 4  
0
- 5
- 0 força grau 5

###### *Extremidades inferiores*

- 0 Incapaz de manter-se em pé ou caminhar de qualquer forma
- 0,5 Capaz de manter-se me pé mas não de caminhar
- 1 Incapaz de caminhar sem algum suporte
- 1,5 Capaz de caminhar sem suporte mas a marcha é instável
- 5

- 2 Capaz de caminhar independentemente mas necessita de suporte para subir escadas
- 2,5 Capaz de subir escadas sozinho, mas necessita de suporte para descer escadas
- 3 Capaz de marcha acelerada, porém a marcha não é normal
- 4 Normal

### **Funções sensitiva**

#### *Extremidades superiores*

- 0 Perda completa da sensibilidade álgica e tátil
- 0,5 50% ou menos de perda da sensibilidade e\ou dor ou dormência graves
- 1 Mais de 60% de perda da sensibilidade e\ou dor ou dormência moderadas
- 1,5 Sensação subjetiva de dormência de qualquer grau mas sem déficit objetivo
- 2 Normal

#### *Tronco*

- 0 Perda completa da sensibilidade álgica e tátil
- 0,5 50% ou menos de perda da sensibilidade e\ou dor ou dormência graves
- 1 Mais de 60% de perda da sensibilidade e\ou dor ou dormência moderadas
- 1,5 Sensação subjetiva de dormência de qualquer grau mas sem déficit objetivo
- 2 Normal

#### *Extremidades inferiores*

- 0 Perda completa da sensibilidade álgica e tátil
- 0,5 50% ou menos de perda da sensibilidade e\ou dor ou dormência graves

- 1 Mais de 60% de perda da sensibilidade e\ou dor ou dormência moderadas
- 1,5 Sensação subjetiva de dormência de qualquer grau mas sem déficit objetivo
- 2 Normal

**Função vesical**

- 0 Retenção e\ou incontinência urinária
- 1 Sensação de retenção e\ou jato fino e\ou continência incompleta
- 2 Retardo ao urinar e\ou polaciúria
- 3 Normal