

Paula Maria Vieira Jorge

**Adrenoleucodistrofia Ligada  
ao Cromossoma X:  
estudos bioquímicos e moleculares**

PORTO  
**2000**

Paula Maria Vieira Jorge

**ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA  
AO CROMOSSOMA X:  
estudos bioquímicos e moleculares**

PORTO  
**2000**

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas, especialidade de Genética Humana, apresentada no Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto.

**ORIENTADORA:** Doutora Maria Clara Pereira de Sá Miranda (Instituto de Genética Médica Doutor Jacinto de Magalhães, Porto).

**CO-ORIENTADORA:** Professora Doutora Maria João Gameiro de Mascarenhas Saraiva (Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto)

O trabalho apresentado nesta tese foi realizado na Unidade de Enzimologia do Instituto de Genética Médica Doutor Jacinto de Magalhães, sob a orientação da Doutora M.C. Sá Miranda. Este estudo foi subsidiado pela Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica, com as bolsas BD/2290/92 e BD/5289/95.

*Ao meu marido e filha*

*A meus pais*

No cumprimento do decreto-lei 388/70, esclarece-se serem da nossa responsabilidade a execução das experiências que estiveram na base dos resultados apresentados (excepto quando referido em contrário), assim como a sua interpretação e discussão.

# ÍNDICE GERAL

---

	<i>página</i>
<b>CAPÍTULOS</b>	
<b>I. SUMÁRIO, SUMMARY, SOMMAIRE</b>	<b>7</b>
<b>II. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>III. OBJECTIVOS</b>	<b>36</b>
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>38</b>
<b>V. DISCUSSÃO</b>	<b>97</b>
<b>VI. PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>103</b>
<b>VII. APÊNDICES</b>	<b>106</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>121</b>
<b>IX. AGRADECIMENTOS</b>	<b>150</b>

# CAPÍTULO I

---

## *SUMÁRIO, SUMMARY, SOMMAIRE*

A adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X (X-ALD, OMIM N° 300100) é uma doença hereditária caracterizada pela destruição da mielina do sistema nervoso, insuficiência das glândulas supra-renais e acumulação de ácidos gordos de cadeia muito longa (AGCML) em vários tecidos e no plasma. A alteração bioquímica presente na X-ALD é devida à ausência de activação dos AGCML a derivados acil-CoA antes da sua entrada na via de  $\beta$ -oxidação peroxissomal. Este processo é catalisado por uma acil-CoA sintetase dos AGCML (SAGCML).

Clinicamente distinguem-se várias formas que podem coexistir numa mesma família. A divisão dos diferentes fenótipos de X-ALD está relacionada com a idade de início dos primeiros sintomas de X-ALD e com o local onde são detectadas as primeiras lesões no sistema nervoso central. Assim, a forma cerebral de X-ALD é caracterizada por uma progressão inicial lenta seguida de uma evolução muito rápida, enquanto que a adrenomielopatia (AMN) afecta principalmente o sistema nervoso periférico.

A X-ALD é causada por mutações no gene que codifica a proteína da adrenoleucodistrofia (ALDP), localizada na membrana do peroxissoma. A ALDP pertence à família de transportadores ABC, a sua função bem como a sua relação com o defeito bioquímico presente na X-ALD (acumulação de AGCML) ainda estão por esclarecer.

Foram efectuados estudos bioquímicos e genéticos em diferentes amostras biológicas de 20 doentes portugueses com adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X, pertencentes a 10 famílias distintas. Foi testada a possibilidade de uso de diferentes linhas celulares no diagnóstico de X-ALD e identificação de portadoras, tendo-se verificado que os linfócitos após cultura, linfoblastos, não podem ser utilizados no diagnóstico da X-ALD, pois não se verifica acumulação de ácidos gordos de cadeia muito longa como no plasma e nos fibroblastos.

A determinação da frequência de adrenoleucodistrofia numa população de doentes de Addison idiopáticos, utilizando o doseamento dos níveis de AGCML plasmáticos como marcadores para a X-ALD, permitiu demonstrar o defeito bioquímico da X-ALD em 27% dos doentes estudados com doença de Addison. Este valor sobe para 50% se considerarmos apenas os indivíduos com idade de início dos primeiros sintomas inferior aos 16 anos.

A caracterização de mutações do gene da adrenoleucodistrofia em doentes com X-ALD, previamente diagnosticados bioquimicamente, revelou heterogeneidade, tendo sido identificadas duas novas mutações no gene da ALDP: uma no exão 2, 1296delG e outra no exão 9, 2281C>T (T632I) (segundo *Mutation Database for X-linked Adrenoleukodystrophy*, [www.x-ald.nl](http://www.x-ald.nl)). Foram ainda identificadas uma mutação *missense* no exão 8, 2236G>A (R617H) e um polimorfismo no exão 6, estes já referidos na literatura. O polimorfismo, L516L, foi identificado em dois dos doentes estudados. O estudo de vários elementos afectados, hetero- e hemizigotos, de uma família, demonstrou ausência de correlação genótipo/fenótipo.

Foi efectuado o estudo das consequências das mutações presentes no gene da adrenoleucodistrofia ao nível da proteína ALDP tendo-se utilizado para o efeito técnicas de imunofluorescência e *immunoblotting*. Dos nove doentes com X-ALD cujos fibroblastos e linfoblastos foram utilizados para a detecção da ALDP, apenas nas linhas celulares de um dos doentes foi detectada ALDP em quantidades semelhantes ao controlo. Os fibroblastos de cinco doentes com X-ALD (56%) revelaram a ausência da ALDP e em fibroblastos de três doentes (44%) foi evidenciada a presença da ALDP em quantidades reduzidas. Nos fibroblastos destes três doentes a extracção de proteínas dos fibroblastos, na presença de carbonato e posterior *immunoblotting*, permitiu verificar que a ALDP se encontrava no sedimento (*pellet*), indicando localizar-se em estruturas membranares.

Estudos de localização subcelular efectuados em fibroblastos de doentes com ALDP imunoreactiva, demonstraram que esta proteína co-localiza com a catalase, uma enzima peroxissomal, indicando que a ALDP se encontra no peroxissoma apesar de estar presente em quantidades inferiores às detectadas em controlos.

Foram ainda estudadas as famílias em que os casos índice não possuíam ALDP imunoreactiva em fibroblastos, 5 das 9 analisadas (56%). Os resultados obtidos na detecção, por imunofluorescência, da ALDP em fibroblastos de pele após cultura (de possíveis portadoras) indicam que este método pode ser utilizado para identificação de heterozigóticas para a X-ALD. Testou-se ainda a aplicabilidade desta técnica no diagnóstico pré-natal da X-ALD.

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD, OMIM N° 300100) is a serious disorder, affecting the white matter of the nervous system and the adrenal cortex. An accumulation of very long chain fatty acids (VLCFA) is observed in several tissues and plasma. The biochemical defect is due to a defect in the activation of VLCFA to their CoA derivatives catalysed by acil-CoA sintetase (VLCFAS).

Clinically several phenotypes can be distinguished that can coexist in the same family. The classification of the different X-ALD phenotypes is related with the age of onset and the localisation of the first neurological lesions. Thus, the cerebral form of X-ALD is characterised by a slow initial progression followed by a fast evolution, while the adrenomyeloneuropathy (AMN) begins latter and affects mainly the peripheral nervous system.

X-ALD is caused by mutations in a gene coding for a protein located in the peroxisomal membrane, ALDP. This protein belongs to the ABC family of transporters that requires ATP to function as transporter. ALDP function as well as interrelation between ALDP and VLCFAS remains unknown.

Biochemical and genetic studies were performed in different biological samples from 20 Portuguese patients with X-linked adrenoleukodystrophy belonging to 10 different families. The possibility of using different cell lines in the diagnosis and identification of carriers was tested. Lymphocytes in culture cannot be used in the diagnosis of X-ALD, because accumulation of VLCFA does not occur in this cell line as in plasma and fibroblasts.

We used the VLCFA concentration to determine the frequency of X-linked adrenoleukodystrophy in patients with Addison's disease. Biochemical defect of X-ALD was demonstrated in 27% of patients studied; this value rises to 50% if we consider the individuals with age of onset below 16 years.

Mutational analysis of X-ALD gene revealed heterogeneity, in this study we report two new mutations (according *Mutation Database for X-linked Adrenoleukodystrophy*, [www.x-ald.nl](http://www.x-ald.nl)), a missense mutation already published and a polymorphism. The polymorphism, L516L, was identified in two X-ALD patients. The two missense mutations identified were: one in exon 8, 2236G>A (R617H) and other, in exon 9, 2281C>T (T632I), the later not yet described in the literature. A new deletion in exon 2, 1290delG, was also characterised.

The absence of phenotype/genotype correlation was demonstrated after the analysis of several hemizygotes and heterozygotes from one X-ALD family.

X-ALD protein, ALDP, was studied using both Western-blot and immunofluorescence techniques. Normal amounts of ALDP were detected only in one of the nine X-ALD patients studied. Fibroblasts/lymphocytes from five patients (56%) revealed complete absence of the protein coded by X-ALD gene and cell lines from three (44%) revealed ALDP in reduced amounts when compared to normal controls.

Fibroblasts from those three patients were further analysed; protein extraction in the presence of carbonate and immunoblotting using an ALDP monoclonal antibody revealed that ALDP was present in the pellet. Subcellular localisation studies demonstrated that ALDP co-localises with the catalase, a peroxisomal enzyme, indicating that ALDP goes to peroxisomes although it is present in small amounts.

Families with affected male relatives shown to lack ALDP in their fibroblasts, 56% of the patients from this study, were particularly analysed. Immunofluorescence assays for the X-ALD protein ALDP can be used to test for carrier status. Further use of this technique for prenatal diagnosis of X-ALD was also tested.

L'adrenoleucodystrophie liée à l'X (X-ALD, OMIM N° 300100), est une maladie d'origine génétique qui se caractérise par une démyélinisation progressive du système nerveux central et une insuffisance surrénale. On observe dans la X-ALD une accumulation anormale d'acides gras saturés à très longue chaîne, (AGTLC) que résulte d'un trouble de leur  $\beta$ -oxydation qui a lieu normalement dans le peroxyosome. Le déficit biochimique est dû à un défaut d'activation de ces AGTLC en leurs dérivés CoA-Acétylés, catalysé par une acyl-CoA synthétase spécifique des AGTLC.

L'expression phénotypique de la X-ALD est très polymorphe, existant fréquemment au sein d'une même famille. La X-ALD cérébrale c'est à dire la forme la plus grave et la plus fréquente de la maladie et l'adrénomyélonéuropathie (AMN) qui touche de jeunes adultes. La variabilité phénotypique qui caractérise

Le gène de la X-ALD a été localisé en Xq28 et l'isolement du gène a permis de définir la protéine putative codée par ce gène. La protéine, ALDP, s'avère appartenir à la super-famille des protéines à cassette liant l'ATP, protéine qui ont un rôle dans le transport cellulaire de divers substrats.

Ce mémoire rend compte du travail qui a permis l'étude biochimique et génétique chez 20 patient X-ALD portugais de 10 différentes familles. Dans un premier temps ce mémoire rendra compte de la caractérisation du déficit biochimique primaire de la maladie, dans des lignées lymphoblastoïdes. Les lymphocytes sont isolés à partir de sang total et transformés par le virus d'Epstein-Barr (EBV). On'a trouvé que le diagnostic biochimique de la X-ALD n'est possible à partir des lignées lymphoblastoïdes parce que la détection de l'accumulation des AGTLC n'est possible dans des lignées lymphoblastoïdes comme dans plasma et fibroblastes.

La caractérisation biochimique de la X-ALD chez patients avec la maladie d'Addison a permis de démontrer une accumulation d'AGTLC dans 27% de cas étudiés. Chez l'enfant la X-ALD est de fait certainement la première cause d'insuffisance surrénale.

Dans un second temps la caractérisation génétique a permis la détection des mutations dans le gène de l'adrenoleucodystrophie liée à l'X, en trois patients.

Deux de ces mutations entraînant des substitutions affectent des acides aminés conservés: R617H, 2236G>A dans l'exon 8 déjà décrit dans la littérature et une neuf, T632I, 2281C>T dans l'exon 9 (d'accord avec *Mutation Database for X-linked Adrenoleukodystrophy*, [www.x-ald.nl](http://www.x-ald.nl)). Une autre mutation crée un codon stop premature, 1290delG dans l'exon 2.

L'étape suivante été d'étudier l'expression de l'ALDP et de confirmer la localisation de la protéine chez les patients X-ALD. Des lignées cellulaires ont été étudiées en Western-blot et immunofluorescence avec les anticorps anti-ALDP. Chez 5 (56%) patients la protéine est absente. Chez 1 patient une protéine de 75kDa est détectée. Enfin chez 3 autres patients, la protéine est détectée mais en quantité inferior aux témoins.

Afin de confirmer la localisation de l'ALDP, la co-localisation de cette protéine et de la catalase par double immunofluorescence indirecte et deux fluorochromes différents à été effectué. Sur les fibroblastes de ces 3 patients, un marquage ponctué et d'une couleur intermédiaire est observé, confirmant une localisation des deux protéines dans le même organelle.

D'autres études sur les familles des patients X-ALD chez qui aucune protéine n'est détectée ont été réalisées. En immunofluorescence indirecte, les fibroblastes et les amniocytes montrent la protéine ALDP ne semble pas exprimée chez les patients X-ALD ou chez les femmes conductrices qu'ont une double populations des fibroblastes, à la fois un marquage ponctué et l'absence. Ce résultat indiquant que cette méthode peut être utilisé pour l'identification du statut de conductrices et diagnostic prénatal de la X-ALD.

## **CAPÍTULO II**

---

### ***INTRODUÇÃO***

<b>ÍNDICE</b>		<i>página</i>
<b>1.</b>	História	16
<b>2.</b>	Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X	18
<b>2.1</b>	Fenótipos clínicos	18
<b>2.1.1</b>	ALD ligada ao cromossoma X <i>versus</i> ALD neonatal	20
<b>2.2</b>	Bioquímica	21
<b>2.2.1</b>	Ácidos gordos de cadeia muito longa	21
<b>2.2.1.1</b>	Activação e $\beta$ -oxidação	22
<b>2.2.2</b>	Patologia da X-ALD	25
<b>2.2.3</b>	Defeito enzimático	25
<b>2.3</b>	Genética	26
<b>2.3.1</b>	O gene	26
<b>2.3.2</b>	A proteína ALDP	28
<b>2.3.2.1</b>	As proteínas ABC	28
<b>2.3.2.1.1</b>	Funções das proteínas peroxissomais	30
<b>2.4</b>	Terapia	32
<b>2.4.1</b>	Restrição de AGCML da dieta – óleo de Lorenzo	32
<b>2.4.2</b>	Transplante de medula óssea	33
<b>2.4.3</b>	Imunossupressão	34
<b>2.4.4</b>	Terapia génica	34
<b>2.4.5</b>	Uso de fármacos	34

## 1. HISTÓRIA

A adrenoleucodistrofia (X-ALD) ligada ao cromossoma X (OMIM N° 300100) foi identificada como uma nova entidade clínica em 1923, num rapaz que apresentava hiperpigmentação desde os 3-4 anos de idade, progressivas perturbações neurológicas e de comportamento e ainda alterações no funcionamento das glândulas supra-renais (Siemerling e Creutzfeldt, 1923). O nome adrenoleucodistrofia foi proposto por Blaw apenas em 1970 (Blaw, 1970). Fanconi e colaboradores (1963), sugeriram que esta patologia apresentava um modo de transmissão recessivo e ligado ao cromossoma X após terem verificado que todos os casos reportados na literatura até então se referiam a doentes do sexo masculino. Nessa altura especularam que o envolvimento cerebral e das glândulas supra-renais se poderia ficar a dever a um único defeito genético. A expressão fenotípica da X-ALD é amplamente heterogênea, sendo em 1976 reconhecida a primeira forma adulta de X-ALD (Budka *et al*, 1976) e mais tarde pormenorizada e denominada como adrenomieloneuropatia (AMN) (Griffin *et al*, 1977). A evidência de que X-ALD e AMN são a mesma entidade patológica surgiu quando numa mesma família foram detectados 4 casos de adrenoleucodistrofia e um de adrenomieloneuropatia (Davis *et al*, 1979). Willems e colaboradores (1990), verificaram que doentes com X-ALD e AMN pertencentes à mesma família possuem idênticos haplotipos demonstrando que a X-ALD e AMN não são causadas por mutações alélicas diferentes. Até à presente data são inúmeras as publicações que dão conta da variabilidade clínica da X-ALD (Budka *et al*, 1981; Moser *et al*, 1992a; Maris *et al*, 1995), mesmo em gémeos monozigóticos (Sobue *et al*, 1994). A determinação da concentração dos ácidos gordos de cadeia muito longa (AGCML) no plasma (Moser *et al*, 1981) e em eritrócitos (Tsuji *et al*, 1981) rapidamente se tornou na forma de diagnóstico da X-ALD, uma vez que nestes doentes há acumulação de ácidos gordos de cadeia muito longa em vários tecidos e no plasma. O diagnóstico pré-natal é também possível pois a acumulação de AGCML foi detectada em amniócitos após cultura (Moser *et al*, 1982; Singh *et al*, 1984a).

A acumulação de AGCML na X-ALD é uma consequência da deficiente activação destes substratos, processo que é efectuado pela enzima acil-CoA sintetase (Jakobs e Wanders, 1991). A restante via de degradação dos AGCML, que ocorre no interior do peroxissoma, encontra-se, nos doentes com X-ALD, sem qualquer alteração (Singh *et al*, 1984a e b; Wanders *et al*, 1987b).

Em 1981 o gene da X-ALD (ABCD1) foi localizado na banda q28 do cromossoma X (Migeon *et al*, 1981) e posteriormente confirmado por outros autores (Boué, 1985, Aubourg *et al*, 1987). A identificação e caracterização do gene da X-ALD revelou que este codifica uma proteína integrante da membrana do peroxissoma, a ALDP, que pertence ao conjunto de proteínas transportadoras que ligam ATP, a família ABC (Aubourg *et al*, 1993a). A função assim como a relação da ALDP com o defeito bioquímico presente na X-ALD permanecem ainda por esclarecer. A ALDP apresenta um peso molecular de 75 kDa e possui homologia significativa com a proteína de 70 kDa integrante da membrana do peroxissoma (PMP 70) (Mosser *et al*, 1993). Outros 2 homologos da ALDP foram já identificados em humanos (Holzinger *et al*, 1997 a e b). Estão descritas cerca de 250 mutações no gene da X-ALD identificadas em famílias com adrenoleucodistrofia de origens diversas. Cerca de 5% das mutações são deleções parciais do gene, 15-25% são deleções de 1 a 3 pares de bases, 40-50% são mutações *missense*, 20-25% são mutações *frameshift*, 6% são mutações *nonsense* e 5% são mutações de *splice* (Smith *et al*, 1999). A grande maioria das mutações presentes no gene ABCD1, foi identificada em apenas uma família de X-ALD, com a excepção da mutação 1801-1802delAG que foi caracterizada em vários doentes (Kemp *et al*, 1994). Estudos efectuados em fibroblastos de doentes com X-ALD demonstraram que aproximadamente 70% destes fibroblastos apresentam ausência completa da ALDP (Watkins *et al*, 1995 e Kemp *et al*, 1996).

## 2. ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AO CROMOSSOMA X

### 2.1 FENÓTIPOS CLÍNICOS

A X-ALD é uma doença genética, que apresenta um padrão de hereditariedade recessivo ligado ao cromossoma X (Moser *et al*, 1984b) e uma frequência que pode variar entre 1.1 por 100 000 nados vivos nos EUA (Moser *et al*, 1995c), 1.6 por 100 000 na Austrália e Espanha (Kirk *et al*, 1998 e Ruiz *et al*, 1998) e 1 por 200 000 indivíduos do sexo masculino na Holanda (van Geel *et al*, 1994). A tabela 1 lista a frequência dos diferentes fenótipos clínicos observados em doentes com X-ALD de diversos países. Dois terços das portadoras desenvolvem sintomas de X-ALD, aumentando a frequência desta patologia para 1:10 000 (Moser *et al*, 1995c). A taxa de novas mutações ocorre em cerca de 8% dos casos índice, 41% nas mães portadoras e em 25% nas avós portadoras (Aubourg *et al*, 1993a). São consideradas portadoras obrigatórias as filhas de indivíduos afectados e aquelas mães com mais do que um indivíduo afectado.

**Tabela 1** - Frequência relativa dos fenótipos apresentados pelos doentes de X-ALD de diferentes países.

FENÓTIPO	FREQUÊNCIA (%)				
	Espanha n=60 (a)	Austrália n=96(b)	Holanda n=77(c)	França n=366(c)	EUA n=388 (c)
cerebral infantil	} 33	} 52	} 31	} 44.8	39
cerebral adolescente					6
cerebral adulto	16	2	1	4.6	2
adrenomieloparose	27	25	46	40.6	26
doença de Addison	12	16	14	5.8	14
assintomático	12	5	8	4.2	13

(a) Ruiz *et al.*, 1998; (b) Kirk *et al.*, 1998; (c) Bezman and Moser, 1998.

Os fenótipos mais frequentes de X-ALD, que são também os mais graves, incluem as formas cerebrais infantil e adolescente, que afectam rapazes entre os 5 e 12 anos de idade (Blaw, 1970). Os indivíduos afectados por uma forma cerebral possuem inicialmente um desenvolvimento neurológico normal (Moser, 1995a).

Através de estudos de imagem de ressonância magnética (IRM) é possível observar-se que a mielinização se processa normalmente (Berger *et al*, 1992; Uchiyama *et al*, 1991). De forma simultânea com o aparecimento dos sinais de desmielinização, aparecem as alterações de comportamento sendo possível observar-se também um déficit nas funções cognitivas. As IRM destes doentes revelam lesões de desmielinização que se iniciam pela substância branca occipital ou pelo corpo caloso (Jensen *et al*, 1990). Verifica-se de seguida uma evolução rápida dessas lesões desmielinizantes, contemporâneas a um agravamento neurofisiológico. Surgem então défices motores e sensoriais, traduzidos por uma hemiparésia e alterações visuais e auditivas (Loes *et al*, 1994). A evolução até um estado vegetativo e morte ocorre geralmente durante um período de 2 ou 3 anos após início dos primeiros sintomas (Moser, 1986). A insuficiência da glândula supra-renal ocorre em 95% dos casos de X-ALD infantil e juvenil e constitui em cerca de 20% dos casos como o primeiro sintoma da patologia (Moser *et al*, 1991b).

A forma adulta desta doença, chamada adrenomieloneuropatia (AMN), afecta indivíduos de sexo masculino de idades compreendidas entre os 20 e 30 anos (Griffin *et al*, 1977). Caracteriza-se pelo aparecimento de perturbações da marcha e do equilíbrio (Moser *et al*, 1991 a), sendo os nervos periféricos e a espinal medula os principais locais de desmielinização (van Geel *et al*, 1996). A doença apresenta uma progressão mais lenta do que a forma infantil podendo levar a uma hemiparésia por volta dos 40 anos de idade. Aproximadamente 30% dos doentes com AMN desenvolvem alterações cerebrais desmielinizantes e quando surgem, apresentam uma evolução semelhante à observada nas formas infantis (Martin *et al*, 1980). Cerca de 65% dos doentes com AMN apresentam insuficiência supra-renal, que pode permanecer como único sintoma durante 5 a 15 anos (van Geel *et al*, 1994). A insuficiência periférica das glândulas supra-renais, observada na X-ALD, caracteriza-se por uma perturbação das funções gluco- e mineralo-corticóides (Powers *et al*, 1982) que não é acompanhada por alterações ao nível da medula (Bakos *et al*, 1995). Foi também observada frequentemente, nas formas adultas, uma alteração da função gonadal periférica que envolve as células de Leydig e os tubos seminíferos (Powers e Schaumburg, 1981).

Designa-se por doença de Addison (*Addison only*) o fenótipo de X-ALD em que a única alteração presente é a insuficiência supra-renal.

Cerca de 60% das portadoras podem desenvolver sintomas semelhantes aos observados na forma AMN, que incluem alterações na medula espinal e nervos periféricos, podendo levar a uma grave hemiparesia. Não se observam alterações cerebrais graves nas portadoras (Schlote *et al*, 1987) e só excepcionalmente surge insuficiência supra-renal (Heffungs *et al*, 1980).

Denominam-se assintomáticos os indivíduos que nunca manifestaram qualquer sintoma de X-ALD, quer no plano neurológico quer no endocrinológico, embora evidenciem acumulação de ácidos gordos de cadeia muito longa no plasma (Moser *et al*, 1993). A reavaliação destes doentes alguns anos após o diagnóstico revela muitas vezes casos de AMN ou de forma cerebral adulta (van Geel *et al*, 1996).

A acumulação de AGCML saturados é idêntica em qualquer uma das formas de X-ALD (mesmo nos indivíduos assintomáticos), não existindo nenhuma correlação entre a acumulação de AGCML e a severidade da doença (Moser e Moser, 1996b). A co-ocorrência de duas ou mais formas de X-ALD já foi detectada em várias famílias (Moser *et al*, 1995c). Esta variação fenotípica intrafamiliar pode ser explicada pela acção de um ou mais gene(s) modificador(es) autossómicos (Moser *et al*, 1995d) e/ou outros factores ainda não identificados (Korenke *et al*, 1996b).

### **2.1.1 ALD ligada ao cromossoma X versus ALD neonatal**

O termo adrenoleucodistrofia é usado para descrever duas entidades genéticas completamente distintas com alterações no córtex das glândulas supra-renais e na mielina do sistema nervoso.

Na forma ligada ao cromossoma X, a alteração bioquímica presente é a acumulação de ácidos gordos de cadeia muito longa nos tecidos e no plasma, encontrando-se a estrutura do peroxissoma normal. Na forma neonatal (Ulrich *et al*, 1978) o padrão de hereditariedade é autossómico recessivo e verifica-se uma diminuição do número e tamanho dos peroxissomas (Aubourg *et al*, 1986).

A acumulação de ácidos gordos de cadeia muito longa, é uma característica comum às duas formas de adrenoleucodistrofia que, no entanto, resulta de diferentes mecanismos: na forma neonatal, existe uma alteração em todo o processo de  $\beta$ -oxidação daqueles substratos; na forma ligada ao cromossoma X, o defeito envolve apenas activação dos ácidos gordos (Goldfischer *et al*, 1985). Existem outras diferenças fundamentais entre a forma ligada ao X (X-ALD) e a neonatal: (i) na forma neonatal, grande parte dos peroxissomas estão ausentes e os que estão presentes são morfologicamente distintos dos existentes em células de doentes com a forma de adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X que apresentam uma estrutura normal (Vamecq *et al*, 1986); (ii) os doentes com a forma neonatal apresentam uma incapacidade de sintetizar plasmalogéneos e oxidar ácido fitânico (Wanders *et al*, 1987a), têm níveis aumentados de ácido piperólico (Kelley e Moser, 1984) e dos intermediários dos ácidos biliares (Noetzel *et al*, 1983), enquanto que os doentes com X-ALD não apresentam nenhuma destas alterações; (iii) as duas formas de adrenoleucodistrofia nunca ocorreram na mesma família (Lazarow e Moser 1995).

## 2.2 BIOQUÍMICA

Em células de doentes com X-ALD detectam-se níveis de  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos de cadeia longa (C16:0 e C20:0) normais, catalase normal, biossíntese de plasmalogéneos e actividade da enzima DHAP-AT também normais, a única alteração é a acumulação de AGCML (C24:0, C26:0) (Moser *et al*, 1984b).

### 2.2.1 Ácidos gordos de cadeia muito longa

Os ácidos gordos de cadeia muito longa (AGCML) são definidos como ácidos gordos contendo um número de átomos de carbono superior a 22 (C22), podendo ser saturados ou insaturados.

Nas células a percentagem de ácidos gordos de cadeia muito longa em relação à quantidade de ácidos gordos total pode variar entre os 0.1% e 10%. Os AGCML saturados, encontram-se em elevada frequência na esfingomielina dos glóbulos vermelhos e nos lípidos da bainha de mielina do sistema nervoso.

O ácido cerótico (C26:0) representa 1% a 5% do total de ácidos gordos na esfingomielina dos glóbulos vermelhos, cerebrosídeos e sulfatídeos cerebrais (Rizzo *et al*, 1987). Nos restantes tecidos a percentagem de AGCML é muito inferior, sendo que o C26:0 representa cerca de 0.01% e 0.02% de ácidos gordos totais no plasma e glândula supra-renal, respectivamente (Moser *et al*, 1981).

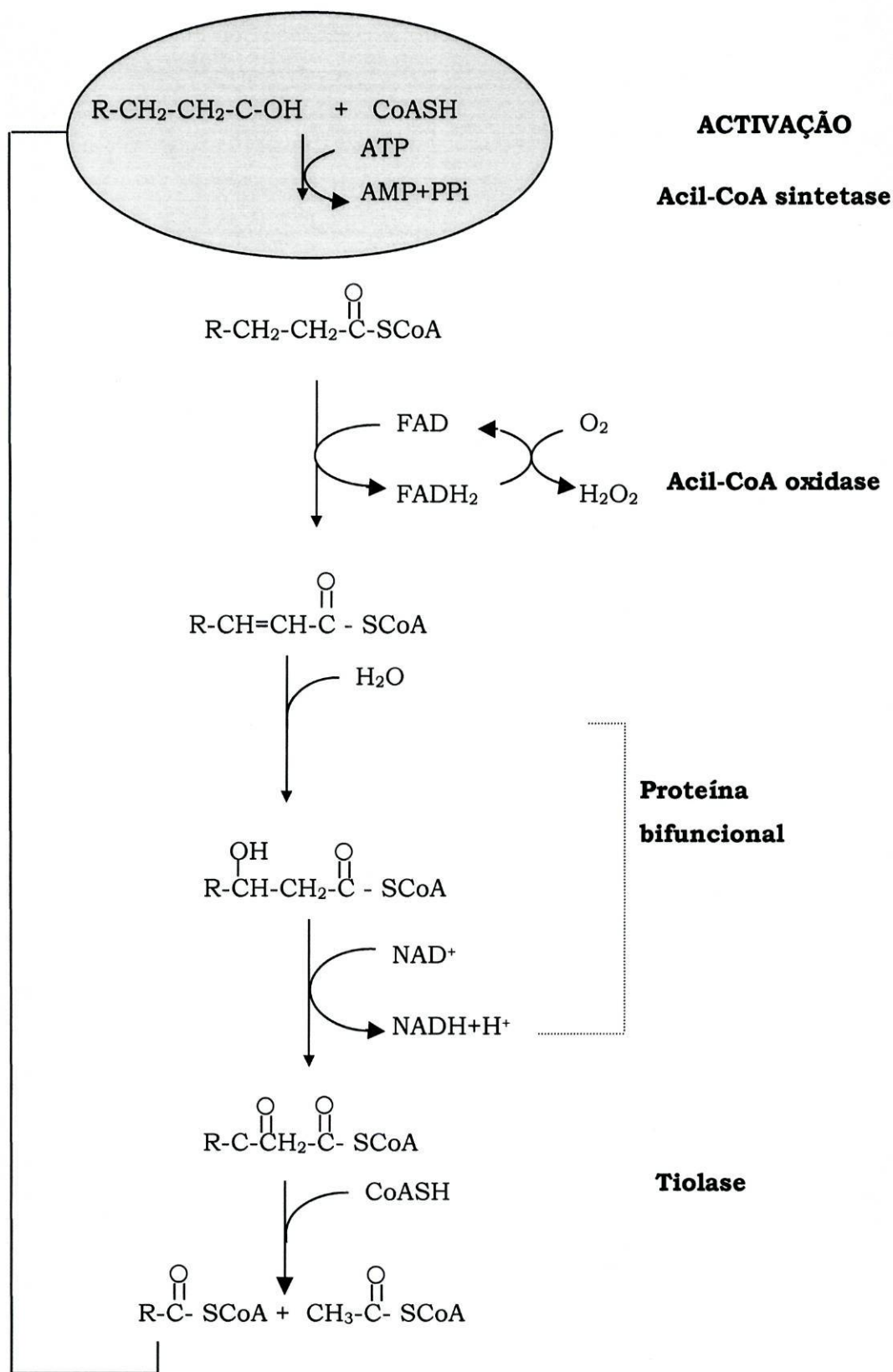
Os AGCML presentes no organismo derivam de duas fontes: da dieta alimentar e da síntese endógena (Kishimoto *et al*, 1980). A síntese de ácidos gordos de cadeia superior a C16 é realizada por intermédio do sistema de alongação (Murad e Kishimoto, 1978). Este sistema de alongação de ácidos gordos é bastante complexo envolvendo reacções de transesterificação e várias proteínas transportadoras (Bourre *et al*, 1976). O sistema de oxidação de ácidos gordos peroxissomal foi identificado em 1976 (Lazarow e De Duve, 1976). Os peroxissomas  $\beta$ -oxidam uma série de substratos: ácidos gordos de cadeia média, longa e muito longa, ácidos dicarboxílicos de cadeia média e longa, ácidos gordos com ramificação 2-metil derivados do isoprenóide (exemplo: ácido pristânico), prostanóides (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos), as cadeias laterais carboxílicas de certos xenobióticos e dos intermediários dos ácidos biliares, ácidos di- e trihidroxiprostanóicos (em peroxissomas hepáticos), outros substratos são o ácido dolicóico e as cadeias carboxílicas laterais de vitaminas lipossolúveis (Cerdan *et al*, 1988; Diczfalusy e Alexon, 1990; Jedlitschky *et al*, 1991; Kølvråa e Gregersen, 1986; Mortensen, 1992; Singh *et al*, 1993; Vamecq e Drayer, 1989; Mannaerts e van Veldhoven, 1993a).

### 2.2.1.1 Activação e $\beta$ -oxidação

Os ácidos gordos uma vez no interior das células são activados, por tioesterificação, pela enzima acil-CoA sintetase, a esteres de Coenzima A. Os peroxissomas contêm acil-CoA sintetases de ácidos gordos de cadeia longa e muito longa (Hashmi *et al*, 1986, Lazo *et al*, 1990a). Recentemente foi identificado e caracterizado no homem, o gene que codifica para uma destas enzimas, responsável pela activação dos AGCML (hSAGCML) (Steinberg *et al*, 1999).

Esta proteína é expressa principalmente no fígado e os estudos para determinar a sua localização subcelular revelam dupla marcação no retículo endoplasmático e no peroxissoma. No peroxissoma, a sintetase parece estar voltada para o seu interior (Smith *et al*, 2000). Foram caracterizados 2 homologos da SAGCML em humanos (H1 e H2), mas as suas funções bioquímicas ainda estão por esclarecer (Watkins *et al*, 1999). Estes autores sugerem que os homologos SAGCML H1 e H2 só funcionem como sintetases na presença de outras proteínas (por exemplo a proteína da adrenoleucodistrofia-ALDP) ou actuem facilitando o transporte dos ácidos gordos através das membranas dos organelos.

Após a activação, os ácidos gordos são degradados. A  $\beta$ -oxidação peroxissomal de substratos não ramificados consiste em quatro reacções consecutivas (Hashimoto, 1999): (i) oxidação com desaturação de acil-CoA a 2-*trans*-enoil-CoA; (ii) hidratação que converte o enoil-CoA a L-3-hidroxiacil-CoA; (iii) uma segunda oxidação com passagem de hidroxiacil-CoA a 3-cetoacil-CoA; (iv) corte tiolítico que resulta na formação de um acil-CoA encurtado em dois átomos de carbono e acetil-CoA ou propionil-CoA no caso dos compostos com ramificações 2-metil (figura 1). Os segundo e terceiro passos da  $\beta$ -oxidação peroxissomal são catalisados por uma única proteína multifuncional (proteína L-bifuncional) (Hoefler *et al*, 1994), uma enzima monomérica, com actividade 2-enoil-CoA hidratase, 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase e  $\Delta^3, \Delta^2$ -enoil CoA isomerase (van Grunsven *et al*, 1999). A multiplicidade de oxidases, hidratases e desidrogenases faz prever também a existência de várias tiolases no peroxissoma (Kamijo *et al*, 1993; Antonenkov *et al*, 1999).



**Figura 1** - Representação esquemática das vias metabólicas e enzimas do sistema de activação e de  $\beta$ -oxidação peroxissomal dos ácidos gordos de cadeia muito longa (Hashimoto, 1999).

### 2.2.2 Patologia da X-ALD

As inclusões lipídicas trilamelares visíveis em microscopia electrónica, no cérebro e glândula supra-renal dos doentes com X-ALD, são o resultado da acumulação de ácidos gordos de cadeia muito longa saturados (AGCML) (Powers e Schaumburg, 1974). À medida que a doença avança, todo o córtex da glândula supra-renal atrofia. Em fetos com X-ALD são visíveis alterações na zona da glândula supra-renal fetal (Powers *et al*, 1982). Indivíduos do sexo masculino em idade pós-pubertária desenvolvem estruturas lipídicas lamelares no citoplasma das células de Leydig, semelhantes às encontradas nas células adrenocorticotróficas (Powers e Schaumburg, 1981). Várias hipóteses surgiram para explicar os mecanismos através dos quais a acumulação de AGCML originam alterações no sistema nervoso central (SNC) em doentes com X-ALD: (i) a acumulação das longas cadeias de AGCML nas membranas das células do SNC provoca alterações estruturais perturbando a função dos receptores membranares (Ho *et al*, 1995); (ii) a acumulação de AGCML induz uma resposta inflamatória e as citocinas, por sua vez, aumentam os efeitos causados pela acumulação de AGCML, originando morte dos oligodendrócitos e desmielinização; (iii) a acumulação de AGCML causa instabilidade na mielina e morte dos oligodendrócitos (Dubois-Dalcq *et al*, 1999).

### 2.2.3 Defeito enzimático

Estudos efectuados por Hashmi *et al*, em 1986 levaram à identificação do defeito enzimático da X-ALD. Uma das observações que mais contribuíram para tal foi a verificação de que a oxidação do ácido lignocérico (C24:0), mas não do seu derivado-CoA, estava reduzida nos fibroblastos de doentes com X-ALD (Wanders *et al*, 1987 a, Rizzo *et al*, 1984). As restantes enzimas da  $\beta$ -oxidação estão activas e funcionalmente normais na X-ALD (Lazo *et al*, 1990b, Wanders *et al*, 1988a).

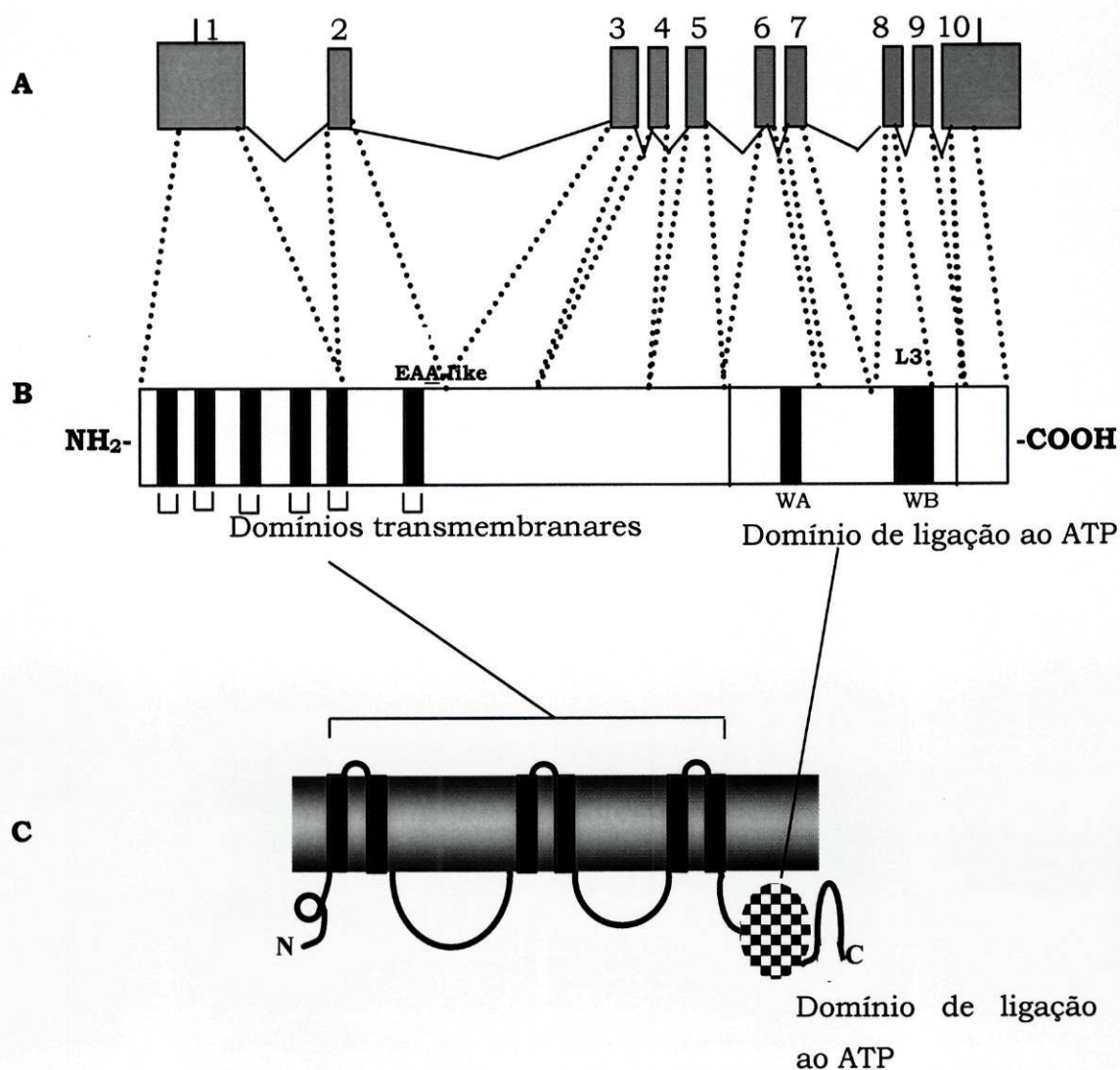
## 2.3 GENÉTICA

### 2.3.1 O gene

O gene da X-ALD, recentemente denominado ABCD1, foi identificado por técnicas de clonagem posicional (Mosser *et al*, 1993), após o estudo de um doente de X-ALD que, na região vizinha dos genes R/GCP (*Red/Green colour pigment genes*) (Sack e Morrel, 1993) apresentava um complexo rearranjo que incluía duas deleções separadas por uma inversão de 140 kb (Feil *et al*, 1991, Aubourg *et al*, 1990b). Este gene de 21kb, compreende 10 exões e junções intrão-exão com sequências consenso para os dadores/aceitadores de *splicing*. O gene da X-ALD codifica para um mRNA com um quadro de leitura (*open reading frame*) de 2,235 bases codificando uma proteína (ALDP) de 745 aminoácidos (Sarde *et al*, 1994a)(apêndice 3). O exão 1 de 1286 bp, contém 386 bp de sequência não-traduzida- 5'UTR. O exão 10 contém 246bp de região codificadora e aproximadamente 1570 bp de sequência não-traduzida até ao sinal putativo de poliadenilação (figura 2).

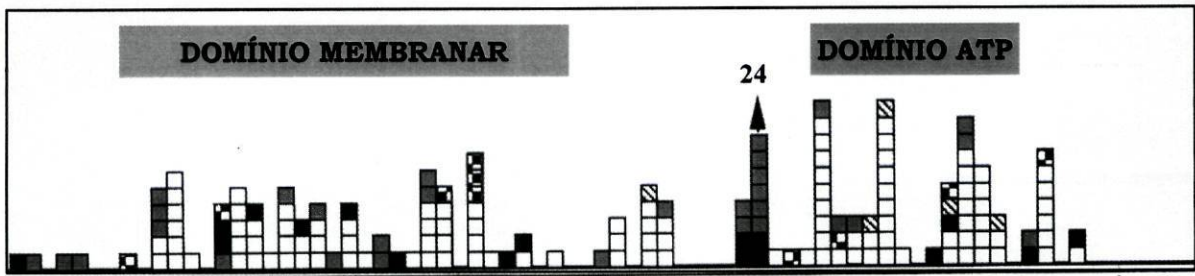
Foram já descritos vários pseudogenes do gene da X-ALD, presentes em diferentes autossomas. Os pseudogenes contêm cerca de 9.7 Kb do gene da X-ALD que correspondem aos exões 7 a 10 (Eichler *et al*, 1997). Estudos de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) identificaram vários pseudogenes em diferentes autossomas: 2p11, 10p11, 16p11, 20ptel e 22q11 (Smith *et al*, 1999). A existência destes pseudogenes, embora não sendo transcritos, complicam a análise das mutações presentes no gene da X-ALD (Eichler *et al*, 1996 e 1997). Para testar as mutações no gene da ALD em DNA genómico sem a presença destas sequências autossómicas devem ser utilizados primers de PCR específicos para o gene da ALD (Boehm *et al*, 1999).

Encontram-se descritas mais de 250 alterações no gene da X-ALD identificadas em famílias com adrenoleucodistrofia de origens diversas (Smith *et al*, 1999; Lachtermacher *et al*, 2000; Gomez-Lira *et al*, 1999). Cerca de 5% das mutações são deleções parciais do gene, 15-25% são deleções de 1 a 3 pares de bases, 40-50% são mutações *missense*, 20-25% são mutações *frameshift*, 6% são mutações *nonsense* e 5% são mutações de *splicing* (figura 3).



**Figura 2** – Esquemas do gene da X-ALD e da proteína ALDP. A - estrutura do gene com 10 exões ; B - polipeptídeo (ALDP) com domínios putativos: domínio de ligação ao ATP com os dois motivos Walker A e B (WA e WB); L3-representa o loop 3 (região possivelmente envolvida na hidrólise do ATP e processo de transporte); C - modelo da ALDP com domínio hidrofóbico (transmembranar) e domínio hidrofílico (com local de ligação ao ATP) (adaptado de Shani *et al*, 1996).

Cada família com X-ALD representa uma mutação única, exceptuando-se uma mutação descrita no exão 5 (Kemp *et al*, 1994). Dos doentes com X-ALD cuja mutação presente no gene da X-ALD já foi identificada e descrita, em 24 (o que equivale a uma frequência de 12%) foi caracterizada uma deleção AG, del 1801-1802, no exão 5 tratando-se de um possível local frequente (*hot-spot*) de mutações (Smith *et al*, 1999).



**Figura 3** – Representação esquemática da ALDP (indicando-se os domínios membranares e de ligação ao ATP) e das mutações presentes no gene da X-ALD (exceptuando grandes deleções) segundo Smith *et al*, 1999. □- mutação do tipo *missense*; ■ - mutação do tipo *nonsense*; ▨ - mutação *frameshift*; ▩ -deleção/inserção de aminoácido; ▤ - alteração de *splicing*.

### 2.3.2 A proteína ALDP

O gene da X-ALD codifica para uma proteína de 75kDa pertencente à família de transportadores transmembranares que ligam ATP, família ABC, e que se localiza na membrana do peroxissoma (Mosser *et al*, 1994a). A análise do perfil de hidrofobicidade da ALDP, que permite caracterizar diferentes domínios na proteína, revelou uma região amino-terminal hidrofóbica que contém seis segmentos transmembranares e uma região carboxi-terminal hidrofílica.

O alinhamento das sequências da ALDP e de outra proteína integral da membrana do peroxissoma, a PMP70, demonstra que a identidade entre ambas é de 38.5%, com similaridade de 75.6%, sendo a homologia maior na zona carboxi-terminal (local de ligação ao ATP)(apêndice 4). Esta região de 210 amino-ácidos apresenta uma identidade de 56% com a região correspondente na PMP70. As duas sequências consenso NBF (*nucleotide binding fold*) características do local de ligação ao ATP são idênticas na ALDP e PMP70 (Mosser *et al*, 1993).

#### 2.3.2.1 As proteínas ABC

Os transportadores ABC (*ATP binding cassette*) são ATPases com um papel importante no transporte de diversos substratos, como proteínas, peptídeos, moléculas e iões inorgânicos (Kuchler e Thorner, 1992).

A superfamília de transportadores em eucariotas compreende a proteína P, uma glicoproteína, produto de gene “*multidrug-resistant-MDR*” (ABCB1) que bombeia drogas quimioterapêuticas para o exterior da célula e que possui ainda actividade de canal de cloro (Kane *et al*, 1990); o regulador transmembranar de condutância da fibrose quística, CFTR (ABCC1) (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) que transporta iões cloreto (Riordan *et al*, 1989); os peptidos transportadores, TAP 1 e TAP2 (ABCB 2 e 3 respectivamente) que controlam o processo de “apresentação” dos antigénios da classe I (Trowsdale *et al*, 1990) e ainda as proteínas peroxissomais identificadas recentemente: ALDP, PMP70, ALDRP e P70R (Mosser *et al*, 1993, Holzinger *et al*, 1997b e c, Kamijo *et al*, 1990). Estas proteínas pertencem a um subgrupo das proteínas ABC (subgrupo D) que engloba um total de 15 proteínas presentes em diferentes organismos: as proteínas PXA1 e PXA2 em leveduras, cinco proteínas em *C. elegans*, 4 em rato e os 4 membros da família ABC identificados em humanos e localizados na membrana peroxissomal: ALDP, ALDRP, PMP 70 e P70R.

A ALDP é a proteína, codificada pelo gene ABCD1, responsável pela adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X. A ALDRP, codificada pelo gene ABCD2, apresenta 62.8% de resíduos amino-acídicos idênticos aos da ALDP, e um padrão de expressão distinto, sendo detectada predominantemente no cérebro e coração (Lombard-Platet *et al*, 1996 e Holzinger *et al*, 1997b). Este grupo de 4 proteínas inclui ainda a proteína da membrana do peroxissoma de 70 kDa (PMP 70), codificada pelo gene ABCD3 (Gartner *et al*, 1992) e a P70R ou PMP69, que apresenta 27% de identidade com a ALDP e cujo gene, denominado ABCD4, se localiza no cromossoma 14q24.3 (Holzinger *et al*, 1997a; Shani *et al*, 1997).

A família de transportadores dependentes do ATP compreende mais de trinta proteínas identificadas, até à data, em procariontes e eucariotas (Higgins, 1992, Savary *et al*, 1997). As moléculas desta família apresentam, caracteristicamente, dois domínios na região amino-terminal extremamente hidrofóbicos, cada um deles contendo seis sequências transmembranares, com estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice, cuja composição em aminoácidos determina a especificidade das moléculas transportadas (Higgins, 1992).

Estas proteínas contêm ainda uma sequência hidrofílica com dois domínios conservados, envolvidos na ligação à molécula de ATP e durante o processo de transporte em que estão envolvidos hidrolisam ATP (Dean *et al*, 1994). Cada um dos conjuntos de domínios dos transportadores ABC (que incluem 6 domínios transmembranares e 1 de ligação ao ATP) é expresso como um polipeptídeo separado, considerando-se os membros desta família, MDR e CFTR, como transportadores completos, enquanto que TAP 1, TAP 2 são considerados apenas “meios-transportadores”, por só possuírem um desses conjuntos de domínios.

As moléculas TAP1 e TAP2 dimerizam formando complexos heterodiméricos responsáveis pelo transporte de antigénios do citoplasma para o interior do retículo endoplasmático (Arnold *et al*, 1992; Beck *et al*, 1992; Spies *et al*, 1992). Nos organismos eucariotas os domínios de ligação ao ATP dividem-se em dois: (i) o domínio A (*WA-Walker A*), de sequência  $GX_4GK(T)X_6(I/V)$ , que contém um resíduo de lisina e que poderá influenciar a conformação do domínio em causa ao interactuar directamente com os grupos fosfato,  $\beta$  e  $\gamma$ , da molécula de ATP; (ii) o domínio B (*WB-Walker B*) que obedece à sequência  $(R/K)X_2GX_3L\phi_4(D/E)$  (Saraste *et al*, 1990).

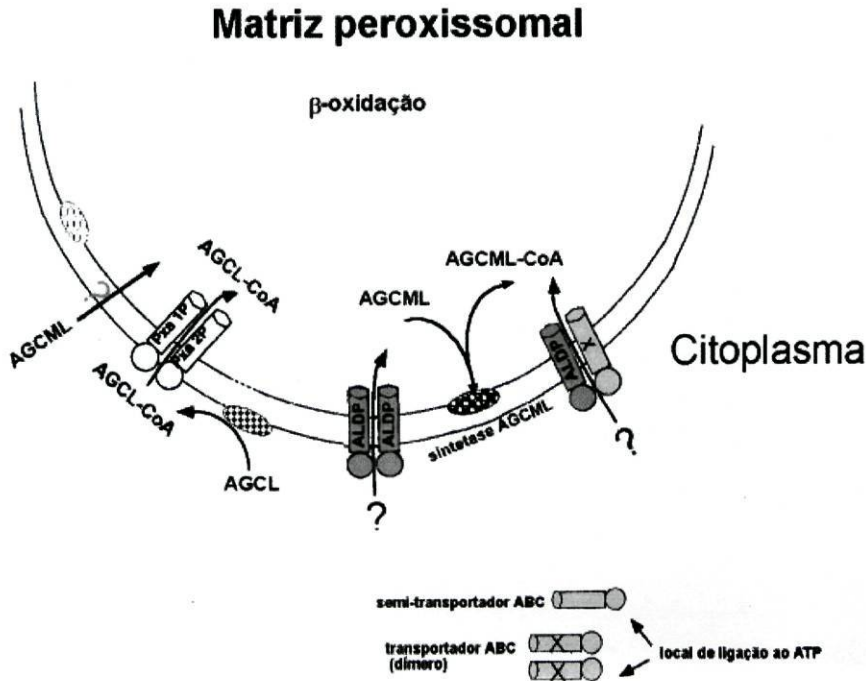
### 2.3.2.1.1 Funções das proteínas ABC peroxissomais

As proteínas peroxissomais pertencentes a este grupo são quatro. A função de qualquer uma destas 4 proteínas ainda está por esclarecer, no entanto todas parecem representar metade de um transportador funcional. Por analogia ao canal de cloro, CFTR, serão necessários dois semi-transportadores para funcionarem como um transportador (com dois domínios transmembranares e dois domínios de ligação ao ATP) (Valle e Gartner, 1993). Também as proteínas de leveduras PXA 1 e 2 formam heterodímeros para completar um transportador funcional (Shani e Valle, 1998). A existência destes “semi-transportadores” permite propor a ocorrência de uma interacção entre proteínas estruturalmente relacionadas, com a formação de complexos homo- ou heterodiméricos envolvidos na constituição de moléculas proteicas funcionais. A existência de quatro “semi-transportadores” na membrana peroxissomal dos mamíferos permite sugerir que diferentes tipos de dímeros se podem formar originando um polipéptido transportador funcional na membrana do peroxissoma.

Estudos recentes (Smith *et al*, 1999), com experiências de co-imunoprecipitação revelaram a possibilidade de formação de homodímeros ALDP-ALDP e heterodímeros ALDP-PMP70 e ALDP-ALDRP. A função da ALDP e dos restantes semi-transportadores peroxissomais não foi ainda determinada, conhecendo-se o seu envolvimento na via de  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos de cadeia muito longa (AGCML).

Atendendo a que a alteração bioquímica que ocorre na X-ALD é a acumulação de AGCML, Mosser e colaboradores (Mosser *et al*, 1993) propõem que esta se fica a dever a uma alteração funcional da proteína ALDP envolvida na estabilização da actividade da enzima acil-CoA sintetase dos AGCML. A localização intraperoxissomal da SGACML sugere que a ALDP possa estar envolvida, no transporte de substâncias necessárias ao funcionamento da SAGCML (figura 4) (Smith *et al*, 2000). Qualquer que seja o substrato transportado pela proteína ALDP, a presença do NBF (domínio de ligação ao ATP) que inclui cinco regiões hidrofóbicas ( $\beta$ -sheets) e o loop enriquecido em glicina (*Walker A*), também presentes noutras proteínas transportadoras da família ABC, sugere que a ALDP use a energia resultante da hidrólise do ATP para efectuar esse transporte (Shani *et al*, 1996).

Parece existir uma relação próxima entre os 4 transportadores peroxissomais pertencentes à família ABC, existindo a evidência laboratorial da formação de homodímeros da ALDP e heterodímeros ALDP/ALDRP e ALDP/PMP70 (Smith *et al*, 1999). A sobreexpressão das proteínas ALDP, PMP70 e ALDRP é capaz de restabelecer a  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos de cadeia muito longa em fibroblastos de doentes com X-ALD, o que faz prever uma função semelhante para estas proteínas (Cartier *et al*, 1995 e Flavigny *et al*, 1999). O facto de as proteínas de levedura pertencentes à família ABC (PXA 1 e 2), estarem envolvidas na  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos de cadeia longa e não na biogénese do peroxissoma faz prever que também a ALDP não esteja envolvida na biogénese dos peroxissomas (Hetteema *et al*, 1996 e Verleur *et al*, 1997).



**Figura 4** - Modelo proposto para o transporte, através da membrana peroxissomal, envolvendo a ALDP, em homo- e/ou heterodímeros (adaptado de Dubois-Dalcq *et al*, 1999);  
 ● - sintetase dos ácidos gordos de cadeia muito longa; ● - sintetase dos ácidos gordos de cadeia longa (*Sc. cerevisiae*); ● - sintetase dos ácidos gordos de cadeia média. ?-desconhecido; X-semi-transportador ABC.

## 2.4 TERAPIA

O tratamento da insuficiência da glândula supra-renal é essencial. A terapia de substituição de esteróides não modifica a evolução neurológica da X-ALD, mas é efectiva e muito importante no tratamento da insuficiência supra-renal, presente na maioria dos doentes com X-ALD, uma vez que, se a insuficiência supra-renal não for tratada, pode ser fatal (Bezman e Moser, 1998).

### 2.4.1 Restrição de AGCML da dieta e ingestão óleo de Lorenzo

Esta terapia tem por base um regime dietético que consiste, por um lado, na restrição alimentar dos AGCML, essencialmente do ácido cerótico (C26:0), e por outro na ingestão de determinados óleos: ácido oleico (C18:1  $\omega$  9-trioleato de glicerol-GTO) e ácido erucico (C22:1  $\omega$  9 - trierucicato de glicerol-GTE), capazes de bloquear a síntese endógena desses mesmos ácidos gordos.

Este tratamento é vulgarmente conhecido como terapia com óleo de Lorenzo. A combinação destes dois substratos no tratamento da X-ALD leva a que estes ácidos gordos mono-insaturados entrem em competição com o sistema enzimático que catalisa a elongação dos AGCML saturados (tóxicos), uma vez que a mesma enzima realiza a elongação de AGCML saturados e insaturados (Rizzo *et al*, 1987). Este tratamento permite normalizar a concentração de AGCML do plasma em 6 a 8 semanas. Este efeito produzido na diminuição dos níveis de AGCML no plasma levou à utilização desta terapia em doentes com X-ALD de vários países incluindo Portugal (Nogueira *et al*, 1993). No entanto, e apesar do efeito na normalização da concentração dos AGCML em plasma e vários tecidos, o óleo de Lorenzo é incapaz de impedir a progressão neurológica quando esta está presente (Uziel *et al*, 1991; Aubourg *et al*, 1993b; Korenke *et al*, 1995) ou de melhorar a função endócrina (van Geel *et al*, 1997). A análise *postmortem* de tecidos pertencentes a doentes com X-ALD sujeitos ao tratamento com óleo de Lorenzo, revelou quantidades substanciais de ácido erucico (C22:1) no fígado e tecido adiposo sem no entanto haver um aumento deste ácido gordo no cérebro (Rasmussen *et al*, 1994 e Poulos *et al*, 1994).

Um estudo colaborativo a nível internacional foi iniciado no sentido de se avaliar se esta terapia tem algum efeito na estabilização ou prevenção das alterações neurológicas (Moser *et al*, 1999).

#### **2.4.2 Transplante de medula óssea**

O transplante de medula óssea (TMO) em doentes com X-ALD, permite restaurar, pelo menos em parte, os locais desmielinizados se as células do dador atravessarem a barreira hematoencefálica do receptor. A experiência com este tratamento é de certa forma positiva, sendo que os transplantados apresentam uma regressão das lesões desmielinizantes com melhoramento de algumas funções cerebrais nomeadamente as cognitivas (Aubourg *et al*, 1990a). Esta aproximação terapêutica não é no entanto eficaz em doentes em que já ocorreu o aparecimento de sinais neurológicos, sendo especialmente aplicada em doentes cujos sinais de envolvimento neurológico são detectados no estado ainda precoce ou em doentes assintomáticos, com sinais de progressão da patologia (Moser *et al*, 1984c).

Este tipo de tratamento comporta uma taxa de mortalidade e morbidade significativa, revestindo-se de uma grande dificuldade, que é encontrar um dador histocompatível (Krivit *et al*, 1995). Até à data cerca de 100 TMO foram efectuados em doentes com X-ALD. A maioria dos casos em que os doentes foram transplantados ao primeiro sinal de desmielinização, revelaram estabilização e até mesmo melhoria da função neurológica (Krivit *et al*, 1999).

### 2.4.3 Imunosupressão

Uma das hipóteses propostas para a patogenicidade da X-ALD nas formas cerebrais, é a formação de uma reacção inflamatória da substância branca, desencadeada por mecanismos imunes (Griffin *et al*, 1985). Várias tentativas de suprimir ou modificar esta reacção inflamatória falharam, nomeadamente com  $\beta$ -interferão (Korenke *et al*, 1996a e 1997), com ciclofosfamida (Naidu *et al*, 1988), com ciclosporina (Moser *et al*, 1992a), com pentoxifilina, uma metilxantina que se sabe inibir a acção do factor de necrose tumoral- $\alpha$  ( $\alpha$ -TNF) (McGuinness *et al*, 1995 e 1997), com imunoglobulinas (Oka *et al*, 1996) ou com  $\beta$ -talidomida (Moser *et al*, 1992).

### 2.4.4 Terapia génica

Foi demonstrado recentemente a correcção do defeito metabólico em células em cultura, de doentes com X-ALD, após a adição do cDNA da ALDP por intermédio de sistemas retrovirais, verificando-se que permite normalizar a actividade de  $\beta$ -oxidação peroxissomal dos AGCML *in vitro* em fibroblastos de pele (Cartier *et al*, 1995) e em células hematopoiéticas (CD34+) (Doerflinger *et al*, 1998). O recurso a este tipo de vectores poderá ser útil se aplicado ao transplante autólogo de medula no tratamento da X-ALD (Cartier *et al*, 1996).

### 2.4.5 Uso de fármacos

Em 1998 Singh e colaboradores demonstraram que o tratamento de fibroblastos, de doentes com X-ALD, com lovastatina ou fenilacetato de sódio (NaPa), substâncias proliferadoras de peroxissomas, leva à diminuição da acumulação de AGCML e aumento da  $\beta$ -oxidação destes substratos naquela linha celular (Singh *et al*, 1998 e Pahan *et al*, 1998).

Foi iniciado recentemente o tratamento de cinco doentes com X-ALD, demonstrando a eficácia *in vivo* do uso da lovastatina que resultou na normalização dos níveis de AGCML em plasma, nesses doentes (Singh *et al*, 1998). Os mecanismos de acção destes fármacos ao nível dos diferentes tecidos, especialmente do cérebro, são ainda desconhecidos. No entanto, um outro fármaco, o 4-fenilbutirato (4PBA) foi introduzido para uso potencial no tratamento da X-ALD (Kemp *et al*, 1998). O NaPa e o 4PBA estão relacionados uma vez que o NaPa é o primeiro produto de degradação do 4PBA. O uso de 4PBA em diferentes linhas celulares provenientes de doentes com X-ALD e no rato *knockout* de X-ALD levaram à correcção dos níveis de C24:0 e C26:0, como resultado do aumento da  $\beta$ -oxidação (Kemp *et al*, 1998). O mecanismo de acção do 4PBA envolve a indução da proliferação de peroxissomas e o aumento da expressão do gene que codifica para a ALDRP, uma proteína com função semelhante à ALDP uma vez que a sobre-expressão da ALDRP é capaz de restaurar o metabolismo dos AGCML em fibroblastos de doentes com X-ALD (Kemp *et al*, 1998).

## **CAPÍTULO III**

---

### ***OBJECTIVOS***

O trabalho descrito nesta tese engloba estudos bioquímicos e moleculares da adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X (X-ALD) em 20 doentes portugueses pertencentes a 10 famílias distintas e seus familiares.

Os principais objectivos do trabalho aqui descrito foram:

- ↪ Avaliar a possibilidade da identificação bioquímica dos doentes (hetero- e hemizigotias para a X-ALD) em diferentes linhas celulares. Nomeadamente, testar o uso de linhas celulares linfoblásticas em substituição dos fibroblastos cujo método de obtenção é invasivo.
- ↪ Determinar a percentagem de doentes com doença de Addison de etiologia desconhecida, que apresenta o defeito bioquímico da adrenoleucodistrofia (X-ALD). Nos casos identificados, testar se o risco da X-ALD ser a causa da doença de Addison está dependente da idade de início dos primeiros sintomas da insuficiência das glândulas supra-renais.
- ↪ Identificar as mutações presentes no gene da adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X, em alguns doentes, e analisar a co-segregação das mutações descritas com a X-ALD, através do estudo dos familiares afectados.
- ↪ Estudar a expressão da proteína codificada pelo gene da X-ALD (ALDP) em linhas celulares de hetero- e hemizigotos para a X-ALD. Verificar se existe relação entre a alteração bioquímica da X-ALD, o defeito genético e a expressão da ALDP, nos casos identificados no ponto anterior.
- ↪ Avaliar a importância dos resultados do estudo da expressão e estabilidade da ALDP, na detecção de portadoras e no diagnóstico pré-natal da adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X.

## **CAPÍTULO IV**

---

### ***RESULTADOS***

**ÍNDICE DOS TRABALHOS***página*

1. Characterization of X-linked Adrenoleukodystrophy in Different Biological Specimens from Ten Portuguese Families 40
2. X-linked adrenoleukodystrophy in patients with idiopathic Addison disease 52
3. Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X. Detecção de Mutações e análise da proteína (ALDP) 63
4. Estudos da ALDP por *immunoblotting* e imunofluorescência 81

## TRABALHO 1

---

### CHARACTERIZATION OF X-LINKED ADRENOLEUKODYSTROPHY IN DIFFERENT BIOLOGICAL SPECIMENS FROM TEN PORTUGUESE FAMILIES

Artigo publicado na revista *Journal Inherited Metabolic Disease*, 1993; 16(1): 55-62,  
por Paula Jorge, Dulce Quelhas e António Nogueira

# 1. CHARACTERIZATION OF X-LINKED ADRENOLEUKODYSTROPHY IN DIFFERENT BIOLOGICAL SPECIMENS FROM TEN PORTUGUESE FAMILIES

## 1.1 SUMMARY

X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) is a severe neurodegenerative disease characterised by progressive demyelination, adrenocortical insufficiency and accumulation in tissues and body fluids of unbranched, saturated very long-chain fatty acids (VLCFA). The diagnosis of ALD is usually based on clinical history, neurologic examination and the determination of levels of VLCFA in plasma and cultured skin fibroblasts.

In the present paper we report the biochemical findings in plasma, cultured skin fibroblasts and lymphoblastoid cell lines from ALD patients. The results obtained indicate that the increment of the ratios C24:0 to C22:0 and C26:0 to C22:0 and of the concentration C26:0 ( $\mu\text{g/ml}$ ) in plasma was parallel with that of fibroblasts, but not with that of Epstein-Barr Virus (EBV)-transformed lymphocytes, suggesting that this cell line is not reliable for diagnosis of ALD.

Subsequent studies carried out on family members revealed heterozygotes other than obligate carriers and hemizygotes who were pre-symptomatic or had a misdiagnosis of multiple sclerosis or psychosis.

## 1.2 INTRODUCTION

Adrenoleukodystrophy (ALD; McKusick 300100) is a severe neurodegenerative peroxisomal disease generally affecting young boys; it is characterised by progressive central and peripheral demyelination and adrenocortical insufficiency (1).

Affected males accumulate saturated very long-chain fatty acids (VLCFA), of carbon length greater than C22 in brain white matter, adrenal cortex, peripheral nerve, blood plasma, erythrocytes and cultured muscle tissue. Cultured skin fibroblasts show increased hexacosanoate (C26:0) content, revealing the characteristic biochemical abnormality (2,3).

The ALD phenotype is highly variable. It includes childhood ALD with serious neurological impairment that can lead to death a few months after the first symptoms, usually between the 4<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> years of age, and a milder variant of ALD called adrenomyeloneuropathy (AMN) with an average age of onset of 28±7 years (4). In AMN patients the spinal cord and peripheral nerves are mainly involved and its course may extend over decades (5,6). Only 15-20% of women heterozygous for ALD show neurological impairment which resembles AMN, but it is normally of later onset and not so severe (7).

Although it has been established that the primary gene defect is the same in all these phenotypes it is still not easy to explain why the different phenotypes can occur frequently in members of the same kindred (8).

The exact defect in ALD is not known. There are studies suggesting that the deficient activity of the peroxisomal enzyme lignoceroyl-CoA ligase is responsible for ALD, resulting in a defective capacity to oxidise the VLCFA. This enzyme is known to be responsible for the formation of the CoA derivative of these substrates in peroxisomes (9,10).

Measurement of plasma C26:0 levels and plasma C24:0/C22:0 and C26:0/C22:0 ratios provides a relatively simple method to identify ALD patients (11); however, identification of female carriers is not possible with the same degree of certainty as in the diagnosis of affected males (4).

We report the diagnosis of ALD in 12 patients out of 10 families by both clinical criteria and/or measurement of VLCFA levels in plasma, cultured skin fibroblasts, and Epstein-Barr Virus (EBV)-transformed lymphocytes. VLCFA levels were also determined in the family members at risk for heterozygous or pre-symptomatic status.

### 1.3 PATIENTS E METHODS

The clinical and biochemical studies were conducted in 12 males of different families as well as in some of their relatives including obligate heterozygotes and other females at risk.

The biological samples used for this study were blood plasma, cultured skin fibroblasts (12) and EBV-transformed lymphocytes (13).

Total lipids were extracted according to a modification of the method of Folch (14). Methylation of plasma lipids was carried out in methanol/HCl (3mol/l) at 75 °C for 16 hours and that of fibroblasts and lymphoblastoid cells in boron trichloride methanol 12% (w/v) at 80 °C for 1 hour. After application in to a thin-layer chromatography plate the VLCFA methyl esters were extracted with n-hexane. The purified fatty acid methyl esters were dissolved in n-hexane and an aliquot was injected into a gas chromatograph equipped with a splitless injection system, a flame ionisation detector and a fused Silica Gel capillary column (15).

The C24:0 to C22:0 and C26:0 to C22:0 ratios were calculated from the corresponding area of each fatty acid; the absolute amount of VLCFA was determined by comparison of the peak areas of a particular fatty acid, relative to heptacosanoic (C27:0) fatty acid methyl ester, used as internal standard.

The VLCFA ratios as well as C26:0 concentration were used to discriminate heterozygotes and hemizygotas from normal.

### 1.4 RESULTS

The clinical presentation of the 15 ALD patients is summarized in table 1, in which an asterisk indicates the patients which have been previously diagnosed as Addison cases of unknown aethiology, but were found to be hemizygotas for ALD upon very long-chain fatty acid (VLCFA) analysis (16). Patient JF had abnormal colour vision which may be due to changes in the red/green pigment cluster or to neuronal involvement.

Re-exploration of the family histories of the patients LM, NP, MT and RB revealed additional hemizygous and heterozygous family members. In the case of NP's family we diagnosed two additional hemizygotes, XM and AS with 3 and 5 years of age respectively, who are still asymptomatic. Among the four family members who died, two had been given a diagnosis of multiple sclerosis. JS is LM's first cousin and was detected by family studies. Interestingly this patient was diagnosed as suffering from psychosis! JB and RB are siblings and the latter one was detected after family studies following his brother's diagnosis. Although no neurological alteration was found at the time of his diagnosis, RB deteriorated rapidly and died in August 1991. The diagnosis of the two brothers BT and MT and patient AP were based upon clinical findings.

The ratio C24:0/C22:0 and the C26:0 concentration in patient's plasma and cultured skin fibroblasts were higher than those of normal controls (table 2). No overlap was observed between control and patient ranges for: C24:0/C22:0 ratio and C26:0 concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in plasma; C26:0/C22:0 ratio (data not shown) and C26:0 concentration ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein) in cultured skin fibroblasts, although the sample size,  $n=6$ , is too small for accurate estimates of ranges and distribution.

The assignment to ALD is most secure when the results are internally consistent, namely, when there are significant abnormalities of all three parameters in plasma: C26:0 level  $\mu\text{g}/\text{ml}$  as well as the C26:0/C22:0 and C24:0/C22:0 ratios. Increases in C26:0 levels ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  prot.) and C26:0/C22:0 ratio are also present in cultured skin fibroblasts. The principal difference between plasma and fibroblasts is that the value of C24:0/C22:0 ratio in fibroblasts is not relevant for the diagnosis as it is in plasma, although in some patients like for instance JS and LM (table 2) a significant increase in C24:0/C22:0 ratio in cultured skin fibroblasts, was found.

**Table 1** – Clinical data in patients with adrenoleukodystrophy

ALD PATIENTS	AGE (Y)		DIAGNOSIS OF ALD	CLINICAL FEATURES	ENDOCRINE FUNCTION
	ONSET	PRESENT OR DEATH (a)			
JS	25	32	30	Personality changes; timidity; weakness	Normal
JO	5	9 <sup>a</sup>	7	At age 5y, adrenal insufficiency. Learning and behaviour disturbance at 7y, then rapid deterioration, blindness, auditory and visual problems quadriparesis and death	Adrenal insufficiency
*NP	15	30	29	Progressive intellectual deterioration and dementia	At age 16y. 8PM plasma cortisol 10µg/dl; started on hydrocortisone replacement therapy
*JF	11	13	12	At age 11y showed hyperpigmentation and dehydration; neurological examination and intellect normal	Adrenal ACTH response diminished
*MV	11	12 <sup>a</sup>	11	Neurological deterioration; incoordination, rapid progression to quadriparesis and death	Adrenal ACTH response greatly diminished
JB	5	12	9	Learning and behaviour disturbance at 5y. Progressive neurological deterioration	Adrenal insufficiency
RB	8	11 <sup>a</sup>	8	Poor school performance. Behaviour disturbances, difficulty walking and inability to speak. Then rapid deterioration leading to death	Adrenal insufficiency
*LM	10	12	11	Vomiting, dark skin, and weakness. At 10y of age, adrenal insufficiency was diagnosed	8 AM plasma cortisol 19µg/dl; started on hydrocortisone replacement therapy
LS	12	21 <sup>a</sup>	21	Paraparesis, seizures and dementia, then rapid deterioration	Adrenal insufficiency since age of 12y
MT	NA	27 <sup>a</sup>	26	Paraparesis, distal sensory loss ataxia	Severe adrenal insufficiency
BT	NA	11 <sup>a</sup>	11	Progressive hearing loss, blindness and quadriplegia	Severe adrenal insufficiency
AP	7	11 <sup>a</sup>	7	At age of 7y, inattention in school and intellectual deterioration, then rapid deterioration	Adrenal insufficiency since age of 7y
XM		5	5	No alteration has been observed so far; no neurological examinations were performed	Not tested
AS		3	3	No alteration has been observed so far; no neurological examinations were performed	Not tested
JA	5	5	5	NA	Adrenal ACTH response greatly diminished

(a) age (years) when deceased; NA - not available; \* See Text.

In lymphoblastoid cell lines, no difference was found in C24:0/C22:0 ratio between patients and controls. The levels of C26:0 concentration ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  prot.) in ALD patients can be increased (cases AS and JB Table 2) or in the control range, as in the majority of the cases. Large ranges were observed for the second parameter. In this cell line we also found a great discrepancy between the C24:0/C22:0 ratio and the level of C26:0, suggesting that occasionally there is an increase of C24:0 but not of C26:0 and vice-versa.

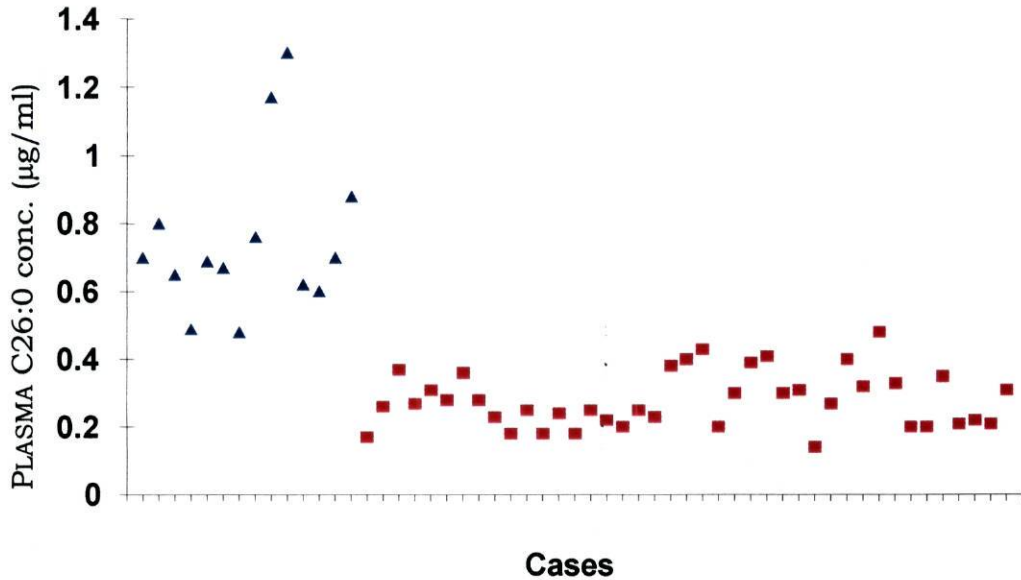
Most women heterozygous for ALD can be detected by determining the VLCFA, 85% using plasma and 93% using both plasma and fibroblasts (7). In this study we determined three parameters in plasma: C24:0/C22:0 ratio; C26:0/C22:0 ratio and C26:0 concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). The following ranges were obtained for heterozygotes and female controls (n=41), respectively: C24:0/C22:0 ratio 1.49-0.99, 0.86-0.58; C26:0/C22:0 ratio 0.06-0.03, 0.02-0.006; C26:0 concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 1.3-0.48, 0.50-0.14; (figure 1). These values show that the mean levels are significantly higher in heterozygotes than in normal, however individual samples may be in the normal range (figure 1).

The heterozygotes classification should be based on three parameters- C26:0 level, C26:0/C22:0 ratio, and C24:0/C22:0 ratio in plasma- and when results are ambiguous the analysis of VLCFA in cultured skin fibroblasts should be performed, as in the case of ALD hemizygotes.

**Table 2 - Laboratory findings in ALD patients using EBV transformed lymphocytes, fibroblasts and plasma**

ALD PATIENTS	LYMPHOBLASTOID CELLS		FIBROBLASTS		PLASMA	
	C24:0/C22:0	C26:0 (µg/mg protein)	C24:0/C22:0	C26:0 (µg/mg protein)	C24:0/C22:0	C26:0 (µg/ml plasma)
JS	1.24	0.38	2.28	0.59	1.59	1.50
JO	NA	NA	1.90	0.50	1.56	1.42
NP	1.45	0.26	2.10	0.65	1.53	1.61
JF	1.45	0.17	1.70	0.77	1.73	1.51
MV	NA	NA	NA	NA	1.41	1.21
JB	1.49	0.42	1.88	0.60	1.94	1.44
RB	0.94	0.22	NA	NA	1.93	1.51
LM	1.18	0.34	2.25	0.48	1.75	1.40
LS	NA	NA	NA	NA	1.51	1.42
XM	1.37	0.18	NA	NA	1.47	1.23
AS	1.39	0.98	NA	NA	1.80	1.61
JA	NA	NA	NA	NA	1.60	1.32
Mean±S.D.	1.31±0.19	0.37±0.26	2.02±0.23	0.60±0.11	1.65±0.18	1.43±0.13
<b>CONTROL</b>						
<b>Range</b>	<b>1.69-0.70</b>	<b>0.48-0.13</b>	<b>2.10-0.94</b>	<b>0.20-0.03</b>	<b>0.95-0.60</b>	<b>0.64-0.15</b>
<b>Mean±S.D.</b>	<b>1.37±0.20</b>	<b>0.26±0.12</b>	<b>1.53±0.28</b>	<b>0.09±0.04</b>	<b>0.70±0.19</b>	<b>0.48±0.31</b>
<b>n=</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>40</b>	<b>40</b>

NA - not available; n - number of controls used.



**Figure 1** - Values of C26:0 concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) in plasma from ALD heterozygotes ( $\blacktriangle$ ) and female controls ( $\blacksquare$ ) ( $n=41$ ). C26:0 concentration (mean heterozygotes  $\pm$  S.D.= $0.75\pm 0.23$ ; mean normal controls  $\pm$  S.D.= $0.29\pm 0.08$ ).

## 1.5 DISCUSSION

Among the 15 patients studied in this paper we found a large variety of phenotypes including pre-symptomatic cases (XP and AP), AMN (JS) and several other forms. There was no apparent correlation between the clinical status of the patients investigated and the extent of the biochemical abnormality. This means that until now we cannot predict whether and when a pre-symptomatic case will develop the first symptoms, which makes the therapeutic evaluation very difficult.

We found some unusual results in the family histories. Among them there was not only a large number of previously unsuspected cases and some misdiagnosis, like patient JS who was being treated in the psychiatric department, but also a large number of heterozygotes whose offspring are potential candidates for the disease.

In patient NP's family we found two young hemizygous, a large number of heterozygotes and two other cases already deceased with a diagnosis of multiple sclerosis but who according to medical evaluation could be hemizygotes for ALD.

Blood plasma was used for the diagnosis of ALD and usually a confirmation of the results is done in cultured skin fibroblasts. In the present study, we found that the VLCFA profile in lymphoblastoid cell lines was not reliable for the diagnosis of ALD. Patient XP for instance, showed no abnormalities in VLCFA assay using lymphoblastoid cells but had a clearly abnormal profile in plasma; the patients JS, NP and LM also showed a normal pattern in lymphoblastoid cells but abnormal concentrations in plasma and fibroblasts (table 2).

Antoku *et al* (17) showed that lymphocytes and blood plasma are more reliable for the diagnosis of ALD patients than erythrocyte analysis, and it was suggested that the lymphocytes may be less influenced by exogenous factors, such as diet, than erythrocytes. We tested whether lymphoblastoid cell lines might be useful for the diagnosis of ALD. As stated before, the results obtained indicate that the use of this cell line is not reliable for the diagnosis of ALD. One possible explanation is that lymphoblasts are immature cells (lymphocytes transformed by Epstein-Barr Virus). The different state of differentiation could explain the variation obtained in VLCFA levels. On the other hand, the use of this cell line is very useful not only as a source of DNA for genetic analysis but also because of the easier accessibility of this cell line in comparison with fibroblasts.

Because of the prognostic implications, the need for genetic counseling, and the potential benefit of therapeutic intervention, it is particularly important to study family members of all patients diagnosed as ALD.

## 1.6 REFERENCES

- 1 - Moser H.W., Moser A.B., Singh I., O'Neill B.P. (1984). Adrenoleukodystrophy: Survey of 303 Cases: Biochemistry, Diagnosis, and Therapy. *Ann Neurol* 16: 628-641.
- 2 - Moser H.W., Moser A.B., Kawamura N. *et al.* (1980). Adrenoleukodystrophy: Elevated C26 Fatty Acid in Cultured Skin Fibroblasts. *Ann Neurol* 7: 542-549.
- 3 - Singh I., Moser H.W., Moser A.B., Kishimoto Y. (1981). Adrenoleukodystrophy: Impaired Oxidation of Long Chain Fatty Acids in Cultured Skin Fibroblasts and Adrenal Cortex. *Biochem Biophys Res Commun* 102: 1223-1229.
- 4 - Moser H.W., Moser A.B., Naidu S., Bergin A. (1991). Clinical Aspects of Adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. *Dev Neurosci* 13: 254-261.
- 5 - Watkins P.A., Naidu S., Moser H.W. (1987). Adrenoleukodystrophy: Biochemical Procedures in Diagnosis, Prevention and Treatment. *J Inher Metab Dis* 10: 46-53.
- 6 - Moser H.M. X-linked Adrenoleukodystrophy. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, ed 6. New York, McGraw-Hill, 1989, Chapt. 58: 1511-1532.
- 7 - Moser H.W., Moser A.B., Trojak J.E., Supplee S.W. (1983). Identification of female carriers of adrenoleukodystrophy. *J Pediatr* 103: 54-59.
- 8 - Moser H.W., Moser A.B., Smith K.D., *et al.* (1992). Adrenoleukodystrophy: Phenotypic Variability and Implications for Therapy. *J Inher Metab Dis* 15: 645-664.
- 9 - Wanders R.J.A., Roermund C.W.T., Schutgens R.B.H., Barth P.G., Heymans H.S.A., van den Bosch H., Tager J.M. (1990). The Inborn Errors of Peroxisomal  $\beta$ -Oxidation: A Review. *J Inher Metab Dis* 13: 4-36.
- 10 - Jakobs B.S., Wanders R.J.A. (1991). Conclusive Evidence That Very-Long-Chain Fatty Acids are Oxidized Exclusively in Peroxisomes in Human Skin Fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 21: 240-249.

- 11 - Harkness R.A., Lynes G.W., Johnson A.W. (1992). The efficacy of very long-chain fatty acid analysis in the diagnosis of peroxisomal disorders: an audit report. *J Inher Metab Dis* 15: 287-288.
- 12 - Harden D.G. (1960). A Human Skin Culture Technique Used For Cytological Examinations. *Br J Exp Pathol* 41: 31-35.
- 13 - Neitzel H. (1986). A Routine Method For The Establishment of Permanent Growing Lymphoblastoid Cell Lines. *Hum Genet* 73: 320-326.
- 14 - Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. (1957). A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues. *J Biol Chem* 266: 497-509.
- 15 - Moser H.W., Moser A.B., Frayer K.K., et al. (1981). Adrenoleukodystrophy: Increased Plasma Content of Saturated Very Long Chain Fatty Acids. *Neurology* 31:1241-1246.
- 16 - Jorge P.M., Quelhas M.D., Soares P., Nogueira A.M., Miranda M.C. (1992). Adrenoleucodistrofia: Estudo em doentes que Apresentam Apenas Insuficiência da Glândula Suprarrenal. In press in *Arquivos de Medicina* May, 1992.
- 17 - Antoku Y., Ohtsuka Y., Nagara H. et al. (1989). A Comparison of Erythrocytes, Lymphocytes and Plasma as Samples in Fatty Acid Analysis for the Diagnosis of Adrenoleukodystrophy. *J Neurol Sci* 94: 193-200.

Acknowledgement: The authors thank Lurdes Lopes for the excellent technical assistance in culture and management of all cell lines.

## TRABALHO 2

---

### **X-LINKED ADRENOLEUKODYSTROPHY IN PATIENTS WITH IDIOPATHIC ADDISON DISEASE**

Artigo publicado na revista *European Journal of Pediatrics*, 1994; 153: 594-597, por  
Paula Jorge, Dulce Quelhas, Pedro Oliveira, Rui Pinto e António Nogueira

## 2. X-LINKED ADRENOLEUKODYSTROPHY IN PATIENTS WITH IDIOPATHIC ADDISON DISEASE

### 2.1 ABSTRACT

The two main causes of primary adrenal disease are tuberculosis and auto-immune adrenal destruction. The latter is responsible for about 70% of the cases of primary adrenal insufficiency (Addison disease). Commonly referred to as a rare cause of adrenal failure is X-linked adrenoleukodystrophy (ALD), a demyelinating peroxisomal disorder affecting 1:20000 Caucasian males. Albeit primary adrenal insufficiency is a rare entity per se, we decided to study patients with idiopathic Addison disease and establish the frequency of ALD as a cause of adrenal insufficiency. The biochemical defect of ALD was found in 5 out of 24 patients. The small number of cases in our series led us to include in our analysis the published results of two other groups of investigators. This analysis indicates that the proportion of cases in which Addison is attributable to ALD is age dependent. It is highest when the adrenal insufficiency manifests before 15 years. This study clearly demonstrates that the proportion of ALD in patients presenting primary adrenal insufficiency has been underestimated.

Conclusion: Addison disease manifesting during the first decade of life has a high likelihood of being the first sign of X-linked adrenoleukodystrophy.

Key words: Addison disease, Adrenomyeloneuropathy, Phenotypic variability, very long chain fatty acids, X-linked Adrenoleukodystrophy.

Abbreviations: AD Addison disease, ALD X-linked Adrenoleukodystrophy, VLCFA very long chain fatty acids.

## 2.2 INTRODUCTION

X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) is a demyelinating peroxisomal disorder, presenting with marked clinical variability even within the same kindred. It includes childhood ALD, the most frequent phenotype, with serious neurological impairment that can lead to death a few months after appearance of the first symptoms, usually between the 4 and 8 years of age, and a milder variant called adrenomyeloneuropathy involving mainly the spinal cord and peripheral nerves, with an average age of onset of  $28 \pm 7$  years, and a course that may extend over decades (9,12).

ALD leads to a pathognomonic accumulation of very long chain fatty acids (VLCFA) in brain white matter, adrenal gland, fibroblasts and plasma, caused by the impaired  $\beta$ -oxidation of these fatty acids in peroxisomes (6). The metabolic defect is expressed most severely in the brain, adrenal cortex and testis. The reason why these tissues are particularly susceptible to the accumulation of VLCFA remains unclear (11).

Primary adrenal insufficiency is characterised by easy fatiguability, weakness, anorexia, nausea and vomiting, abdominal pain, weight loss, drowsiness, and occasionally coma. When chronic hyperkalaemia is present this may occasionally bring on an attack of acute areflexic paralysis, which may include respiratory, facial, or bulbar weakness (3).

There are two main causes of primary adrenal disease: tuberculosis and auto-immune adrenal destruction. The latter is a component of the polyendocrine deficiency syndrome (8). As tuberculosis is becoming less frequent in the industrialised nations, the polyendocrine deficiency syndrome is associated with the majority of cases of Addison disease (AD) (18). ALD, where the primary adrenal insufficiency may precede, co-exist or develop after neurological dysfunction, is frequently referred to as a rare cause of AD. The adrenocortical insufficiency in ALD appears to be directly attributable to the accumulation of VLCFA whereas the pathogenesis of the nervous system lesions appears to be more complex and possibly includes immunological mechanisms (16).

Since ALD occurs more often than was previously realised and because it may be the causal mechanism in a significant proportion of male patients with primary adrenal insufficiency, we screened for ALD in 24 male patients with primary adrenal disease of unknown cause.

Previous results (5,14) led us to investigate if the age at onset of primary adrenal insufficiency in patients with idiopathic AD is related to the existence or absence of the biochemical defect of ALD.

## **2.3 PATIENTS AND METHODS**

### **2.3.1 Patients**

Biochemical studies were conducted in 24 males of different families with idiopathic AD. All patients were being treated for primary adrenocortical insufficiency. Patients with multiple endocrine gland deficiencies were excluded, since it has been shown previously that such patients have normal levels of VLCFA (15).

### **2.3.2 Family members**

Family studies by VLCFA analysis were also performed in obligate heterozygous and other females and males at risk.

### **2.3.3 Biochemical analysis**

The biological samples used for this study were blood plasma and cultured skin fibroblasts (4).

Plasma samples were sent to us from the endocrinology departments of different Hospitals in Portugal, and were kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  before processing. A skin biopsy for fibroblast culture was performed when abnormal VLCFA profile was found in plasma.

### **2.3.4 Procedure**

Total lipids were extracted according to a modification of the method of Folch *et al* (2). Methylation of plasma lipids was carried out in methanol/HCl (3 mol/l) at  $75^{\circ}\text{C}$  for 16 hours and that of fibroblasts in boron trichloride/methanol 12% (w/v) at  $80^{\circ}\text{C}$  for 1 hour.

After thin-layer chromatographic separation of the VLCFA, methyl esters were extracted with n-hexane. The purified fatty acid methyl esters were then dissolved in 80  $\mu$ l of n-hexane and an aliquot of 1  $\mu$ l was injected into a gas-chromatograph, equipped with a splitless injection system, a flame ionization detector and a fused Silica Gel capillary column (10).

The C24:0/C22:0 and C26:0/C22:0 ratios were calculated by determining the ratio of the corresponding area of each fatty acid. The absolute amount of a particular VLCFA was determined by comparison of the corresponding peak area, relative to C27:0 fatty acid methyl ester, used as internal standard.

The VLCFA ratios as well as C26:0 concentration ( $\mu$ g/ml plasma or  $\mu$ g/mg protein in the case of fibroblasts) were used to discriminate ALD hemizygotas and heterozygotas from normal controls (7).

### 2.3.5 Statistical methods

To test for the possibility that the existence (ALD+) or absence (ALD-) of the biochemical defect of ALD in idiopathic Addison patients is related to the age of onset of primary adrenal insufficiency, literature data were analysed (5,4).

Onset of AD was defined as the age when the first clinical symptoms of adrenal decompensation occurred. Some of the patients might have had an impaired adrenal reserve before this age but this could not be determined in the absence of ACTH levels and ACTH stimulation.

The relation of the two variables (age of onset of AD and existence or absence of the biochemical defect of ALD), was studied in a contingency table (Chi-square test) (17).

## 2.4 RESULTS

The clinical and biochemical data of the 24 male patients with idiopathic AD are summarized in table 1. All patients had markedly increased plasma ACTH concentration and low levels of cortisol after ACTH stimulation (data not shown) and are now under replacement therapy. At the time of the study none showed neurological involvement.

Elevated plasma C24:0/C22:0 and C26:0/C22:0 (data not shown) ratios and C26:0 concentrations were found in 5 of the 24 patients confirming the ALD status. Increases in the C26:0 level ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein) and C26:0/C22:0 (data not shown) ratio were also present in cultured skin fibroblasts (Table 1).

Patients classified as “Addison only” (table 1) continue to present normal neurological findings, including MRI. Patient 22 with the juvenile form, showed a rapid deterioration including paraparesis, seizures and vision loss leading to a vegetative state and death, a few months after the diagnosis of ALD.

Family studies by VLCFA analysis revealed 12 heterozygotes and 5 additional hemizygotes some with distinct phenotypes including a patient with the adult form of ALD and pre-symptomatic status, demonstrating the heterogeneity of the disease.

Ages at manifestations of AD in patients with or without ALD are presented in figure 1.

To test the hypothesis of different manifestation ages, a contingency table was used revealing that the two samples (ALD+ and ALD-) seem to be different (Chi-square test value of 20.11,  $p < 0.05$ , for a 2X2 table, age of onset below and above 15 years *vs* existence or absence of ALD; Fisher’s exact test with a negligible *P*-value) (table 2). This means that the frequency of ALD in AD patients is related to the age of presentation of the first symptoms of primary adrenal failure.

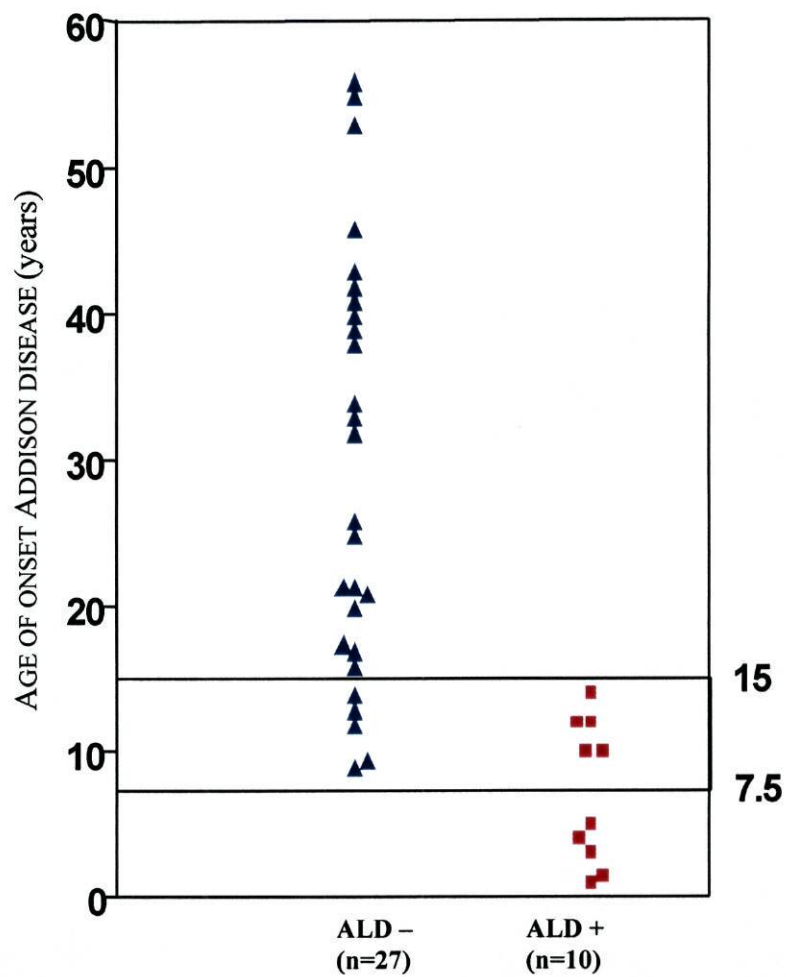
**Table 1** - Summary of biochemical and clinical data on the AD patients

PATIENT NUMBER	AGE (years)		PLASMA		FIBROBLASTS		DIAGNOSIS
	PRESENT OR DEATH (*)	ONSET OF AD	C26:0 (µg/ml plasma)	C24:0/C22:0	C26:0 (µg/mg protein)	C26:0	
1	17	(-)	0.41	0.77	N.A.	N.A.	Normal
2	36	34	0.21	0.97	N.A.	N.A.	Normal
3	64	32	0.28	0.80	N.A.	N.A.	Normal
4	32	17	0.32	1.05	N.A.	N.A.	Normal
5	58	46	0.29	0.79	N.A.	N.A.	Normal
6	14	12	0.22	0.79	N.A.	N.A.	Normal
7	27	21	0.31	0.85	N.A.	N.A.	Normal
8	74	(-)	0.30	0.81	N.A.	N.A.	Normal
9	61	(-)	0.72	0.78	N.A.	N.A.	Normal
10	50	16	0.66	0.92	N.A.	N.A.	Normal
11	49	33	0.33	0.97	N.A.	N.A.	Normal
12	11	(-)	0.40	0.91	N.A.	N.A.	Normal
13	60	53	0.18	0.88	N.A.	N.A.	Normal
14	31	25	0.14	0.97	N.A.	N.A.	Normal
15	49	41	0.36	0.91	N.A.	N.A.	Normal
16	9	(-)	0.24	0.88	N.A.	N.A.	Normal
17	60	56	0.54	0.89	N.A.	N.A.	Normal
18	(-)	(-)	0.11	0.81	N.A.	N.A.	Normal
19	36	9	0.15	0.91	N.A.	N.A.	Normal
20	15	12	3.27	1.70	0.77	0.77	Addison only
21	14	10	1.73	1.65	0.48	0.48	Addison only
22	16 (*)	10	1.20	1.41	N.A.	N.A.	Juvenile form
23	34	14	1.58	1.55	0.65	0.65	AMN
24	7	4	1.36	1.63	0.50	0.50	Infantile form
<b>N</b>							
<b>Control</b>			<b>0.74 - 0.10</b>	<b>1.10 - 0.60</b>	<b>0.20 - 0.03</b>	<b>6</b>	
<b>Range</b>			<b>40</b>	<b>40</b>			
<b>n</b>							

NA - not available, N - number of patients used in figure1 and table 2; n - number of controls used, (-) not known; Normal- normal VLCFA profile, AMN adrenomyeloneuropathy form).

**Table 2-** Contingency table for the two variables studied: age of onset of AD and existence (ALD+) or absence (ALD-) of the biochemical defect of ALD

	AGE OF ONSET OF ADDISON DISEASE (years)			TOTAL
	< 7.5	7.5 - 15	> 15	
ALD +	5	5	0	10
ALD -	0	5	22	27
TOTAL	5	11	22	37



**Figure 1** - Distribution of aetiological AD patients according to the age of onset, including results from Table 1 (n=18), Holmberg *et al* (5) (n=11) and Nejad and Senior (4) (n=8). See text for comments.

## 2.5 DISCUSSION

Among the five patients with ALD reported in this paper, we found a large variety of phenotypes including severe infantile and juvenile forms, adrenomyeloneuropathic form and patients with no neurological involvement so far.

The family studies were relevant because of the large number of heterozygotes and hemizygotes found, including two in a pre-symptomatic state.

The results confirm that ALD is a significant cause of AD (14). Screening for AD has important implications for prognosis and genetic counselling. It may also be of significance for therapy since there is suggestive evidence that early dietary therapy with “Lorenzo Oil” and restriction of VLCFA intake can prevent or reduce the severity of later neurological disability (1, 12).

From our study it becomes clear that there is a relationship between the age of onset of AD and the proportion of AD that is attributable to ALD. Statistical analysis indicates that when the age of onset of AD is above 15 years, there is a negligible likelihood that ALD is the cause. Conversely, the probability is very high if the age of onset is less than 7.5 years. Between 7.5 and 15 years the probability is the same.

We conclude that all patients presenting with AD below 15 years, and especially below 7.5 years, should be investigated for the biochemical defect of ALD.

## 2.6 REFERENCES

- 1 - Aubourg P., Adamsbaum C., Lavallard-Rosseau M.C. *et al* (1993) A two-year trial of oleic and erucic acids ("Lorenzo's Oil") as treatment for adrenomyeloneuropathy. *N Engl J Med* 329 (11):745-752.
- 2 - Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. (1957) A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues. *J Biol Chem* 266: 497-509.
- 3 - Forest M.G. (1989) Adrenal steroid deficiency states. In: Brook CGD (ed) *Clinical paediatric endocrinology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 368-406.
- 4 - Harden D.G. (1960) A Human Skin Culture Technique Used For Cytological Examinations. *Br J Exp Pathol* 41: 31-35.
- 5 - Holmberg B.H., Hagg E., Duchek M., Hagenfeldt L. (1992) Screening of patients with hereditary spastic paraoaresis and Addison's disease for adrenoleukodystrophy/adrenomyeloneuropathy. *Acta Neurol Scand* 85:147-149.
- 6 - Jakobs B.S., Wanders R.J.A. (1991) Conclusive Evidence That Very-Long-Chain Fatty Acids are Oxidized Exclusively in Peroxisomes in Human Skin Fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 21: 240-249.
- 7 - Jorge P., Quelhas D., Nogueira A. (1993) Characterization of X-linked adrenoleukodystrophy in different biological specimens from ten Portuguese families. *J Inherited Metab Dis* 16: 55-62.
- 8 - Loriaux D.L. (1990) Adrenocortical insufficiency. In: Becker KL (ed) *Principles and practice of endocrinology and metabolism*, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 600-604.
- 9 - Moser H.W. (1989) X-linked Adrenoleukodystrophy; In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, ed 6. New York, McGraw-Hill, Chapt. 58: 1511-1532.
- 10 - Moser H.W., Moser A.B. (1991) Measurement of saturated very long chain fatty acids in plasma. In: Frits A. Hommes ed. *Techniques in Diagnostic human Biochemical Genetics: A Laboratory Manual*, A John Wiley & Sons, Inc, Chapt.12:177-191.

- 11 - Moser H.W., Bergin A., Naidu S., Ladenson P. (1991) Adrenoleukodystrophy. *Endocrinol and Metab Clinics of North America* 20:297-318.
- 12 - Moser H.W., Moser A.B., Smith K.D., *et al* (1992) Adrenoleukodystrophy: Phenotypic Variability and Implications for Therapy. *J Inher Metab Dis* 15: 645-664.
- 13 - Mosser J. *et al* (1993) Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 361:726-730.
- 14 - Nejad A.S., Senior B. (1990) Adrenomyeloneuropathy presenting as Addison's disease in childhood. *N Engl J Med* 322:13-16.
- 15 - O'Neill B.P., Moser H.W., Saxena K.M. (1982) Familial X-linked Addison disease as an expression of adrenoleukodystrophy (ALD): Elevated C26 fatty acid in cultured skin fibroblasts. *Neurology* 32:543-547.
- 16 - Powers J.M. (1985) Adreno-leukodystrophy (adreno- testiculo- leuko- myelo- neuropathic- complex): A review. *Clin Neuropathol* 4:181-199.
- 17 - Berry D.A., Lindgren D.W. (eds) (1990) Statistics theory and methods. Brooks/Cole publishing company, California.
- 18 - Watson A.C., Rosenfield R.L. (1990) Adrenocortical disorders in infancy and childhood. In: Becker KL (ed) *Principles and practice of endocrinology and metabolism*, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 660-668.

Acknowledgements: The authors thank Dr. Holmberg and Dr. Senior for giving permission to use their results in this paper and Lurdes Lopes for the excellent technical assistance. The authors are very grateful to Prof. Hugo Moser for reviewing this manuscript. This work was supported by Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (JNICT), Ph.D.grant N° BD/2290/92-ID.

## **TRABALHO 3**

---

### **ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AO CROMOSSOMA X. DETECÇÃO DE MUTAÇÕES E ANÁLISE DA PROTEÍNA (ALDP)**

Artigo publicado na revista *Arquivos de Medicina*, 1997; 11(5): 300-304, por  
Paula Jorge, Jorge E. Azevedo e M. Clara Sá Miranda

### 3. ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AO CROMOSSOMA X: DETECÇÃO DE MUTAÇÕES E ANÁLISE DA PROTEÍNA (ALDP)

#### 3.1 RESUMO

A adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X (ALD) é uma doença peroxissomal caracterizada essencialmente por desmielinização, insuficiência das glândulas supra-renais e acumulação de ácidos gordos de cadeia muito longa (AGCML) em quase todos os tecidos e fluidos corporais. Esta acumulação é devida a uma deficiente  $\beta$ -oxidação dos AGCML, um processo que ocorre no peroxissoma (1). A ALD apresenta uma grande diversidade fenotípica, que inclui formas cerebrais graves e formas sem qualquer envolvimento neurológico. O gene envolvido na ALD foi clonado recentemente (2). Este gene codifica para uma proteína integral transmembranar peroxissomal, a ALDP, de 75 kDa. Esta proteína, cuja função está ainda por estabelecer, faz parte da família de proteínas transportadoras ABC, que ligam ATP (4).

Este trabalho apresenta os resultados obtidos no estudo de nove doentes com ALD pertencentes a famílias portuguesas distintas. Para a detecção de mutações presentes no gene da ALD, efectuou-se a amplificação por PCR dos exões 2 a 9, seguida de análise por SSCP, e posterior sequenciação dos exões que apresentam um padrão de migração diferente do controlo. Esta estratégia permitiu identificar mutações no gene da ALD de três dos doentes e um polimorfismo em outros dois.

A análise da proteína ALDP em fibroblastos de pele dos doentes com ALD, por técnicas de *western-blot* utilizando um anticorpo monoclonal, revelou a ausência de proteína, em cinco dos nove doentes em estudo. Os estudos aqui apresentados permitiram caracterizar a nível molecular famílias de doentes com ALD de origem portuguesa, permitindo oferecer-lhes um aconselhamento genético mais objectivo.

Palavras-chave: Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X, ALDP, análise de mutações.

## 3.2 SUMMARY

X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) is a peroxisomal disorder characterized by demyelination, adrenal insufficiency and accumulation of saturated very-long chain fatty acids in cerebral white matter, adrenal cortex and in almost all body cells and fluids. This accumulation is due to a deficient  $\beta$ -oxidation of this substrates, a process that takes place in peroxisomes. ALD presents a wide range of phenotypic expression. The most common phenotype, the cerebral form, occurs in young boys presenting brain demyelination and a rapid deterioration that leads to death, usually within three years. Adrenomyeloneuropathy, a milder form, involves the spinal cord and peripheral nerves. Other patients present only adrenal insufficiency without neurological involvement (1). The ALD gene was recently isolated by positional cloning (2). It codes for a peroxisomal transmembrane integral protein of 75kDa, ALDP. This protein, whose function remains unknown, is a member of the ABC family of transporters (3,4).

In this study we report data on the molecular studies performed on 9 ALD patients belonging to unrelated families. For the detection of mutations in the ALD gene of these patients the following strategy was used: PCR amplification of exons 2 to 9, followed by SSCP analysis of the amplified fragments. Fragments displaying an alteration in the migration pattern were sequenced. Using this strategy it was possible to identify the mutations present in the ALD gene in three patients (1296delG; 2236G>A; 2281C>T) and a silent alteration (1934G>A) in other two cases.

ALDP analysis by *western-blotting* using a monoclonal antibody, revealed that this protein is completely absent in fibroblasts and lymphoblasts of five patients out of nine analyzed in this study. The cell lines of the remaining four patients present detectable ALDP although the level of the protein in three of them is apparently reduced (the ALD gene of one patient of these last group has the amino acid substitution - T632I, in a region that codes for the carboxy terminus of the protein).

The genetic characterization of ALD portuguese families described in this study showed that molecular genetics may play a relevant role in the diagnosis and prevention of ALD allowing a more effective genetic counseling.

Key-Words: Peroxisomal disorder X-linked Adrenoleukodystrophy, ALDP, mutation detection.

### 3.3 INTRODUÇÃO

A adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X (ALD) é a mais frequente das doenças peroxissomais, afectando 1/15 000 indivíduos do sexo masculino (1). A sua expressão clínica é muito variada mesmo em indivíduos de uma mesma família e até em gémeos monozigóticos (5). Os doentes com a forma mais grave (40% dos casos de ALD) (6) desenvolvem os primeiros sintomas neurológicos, normalmente entre os 5 e os 12 anos de idade. Uma outra forma da patologia é a adrenomieloneuropatia (AMN; 35% dos casos de ALD) (6) na qual se verifica um envolvimento dos nervos periféricos e da medula espinal. A AMN, que afecta normalmente adultos jovens, tem uma progressão muito lenta, podendo na sua fase terminal apresentar envolvimento do sistema nervoso central. Qualquer uma das formas de ALD descritas pode ter associada uma insuficiência primária da glândula supra-renal (ou doença de Addison). A doença de Addison (DA; 10% dos casos de ALD) (6) pode manifestar-se sem que tenha ocorrido qualquer alteração neurológica e manter-se como único sintoma durante vários anos. A ALD pode apresentar outros fenótipos tais como formas cerebrais juvenis e adultas. Formas assintomáticas têm também sido descritas, muitas das quais vêm posteriormente a desenvolver sintomas (1,6).

Bioquimicamente a ALD caracteriza-se por uma acumulação de ácidos gordos de cadeia muito longa (AGCML) essencialmente do ácido hexacosanoico (C26:0) (7). Esta alteração, que ocorre na substância branca cerebral, glândulas supra-renais, plasma e fibroblastos, é originada por um defeito da  $\beta$ -oxidação desses ácidos gordos, um processo que ocorre no peroxissoma (8). Os níveis de AGCML são um óptimo marcador desta patologia, permitindo o diagnóstico bioquímico com elevada certeza (9-12).

As heterozigotas para a ALD que desenvolvem sintomas (40% das portadoras) apresentam geralmente uma forma clínica de AMN, normalmente com uma progressão mais lenta (13). A determinação da concentração de AGCML no plasma é o método correntemente utilizado na detecção de portadoras.

No entanto, Moser e colaboradores (13) demonstraram que 20% das portadoras obrigatórias apresentam em plasma níveis de AGCML normais. A utilização de fibroblastos de pele permite diminuir este número para 5%. Os fibroblastos de pele após cultura parecem assim ser o material biológico mais conveniente para a detecção bioquímica de portadoras (14).

O gene responsável pela adrenoleucodistrofia que codifica uma proteína de 75 kDa, a ALDP, foi recentemente isolado por técnicas de clonagem posicional (2). A ALDP, cuja função não está ainda estabelecida, é uma proteína integral da membrana do peroxissoma. A análise da estrutura primária da ALDP revelou que esta possui 6 segmentos transmembranares e uma sequência característica das proteínas pertencentes ao grupo das *ATP-binding cassette* (família de proteínas ABC) (3,4).

A análise do genótipo de doentes com ALD de origens diversas levou à identificação de mais de cem mutações diferentes no gene da ALDP. Estas mutações dividem-se em mutações *missense* cerca de 55%, mutações *frameshift* 30%, mutações *nonsense* 6%, defeitos de *splicing* 5% e aproximadamente 1% de deleções de um aminoácido (11). Exceptuando duas mutações, 1801-1802delAG e a P560L, as quais foram identificadas em mais do que uma família com ALD, a grande maioria das mutações descritas são únicas, demonstrando a grande heterogeneidade genética associada a esta patologia (15-22).

## 3.4 MÉTODOS

### 3.4.1 Análise por RFLP e *Southern-blot*

A detecção de alterações no gene da ALDP iniciou-se pela análise de RFLP (*restriction fragments length polymorphisms*), utilizando as enzimas de restrição *Kpn*, *Eco RI* e *Taq I* (da *Boehringer Mannheim*) e posterior *Southern-blot* segundo método corrente (23).

### 3.4.2 Identificação das mutações no gene da ALDP

A metodologia seguida para a detecção de mutações no gene da ALDP consistiu na amplificação dos exões 2 a 9 por PCR (*polymerase chain reaction*), segundo técnicas correntes (24,25). A amplificação dos exões 8 e 9 só foi possível após amplificação de um fragmento de 2001 bp usando primers específicos do cromossoma X que cobrem os exões 8 a 10 do gene da ALDP. Da mesma forma para a amplificação do exão 7 realizou-se uma prévia amplificação de um fragmento de 531 bp que incluiu os exões 6 e 7. A tabela 1 descreve as condições utilizadas na amplificação dos diferentes exões e os *primers* específicos para cada exão.

Os fragmentos dos diferentes exões obtidos após amplificação por PCR, foram posteriormente analisados por SSCP (*single stranded conformational polymorphisms*), utilizando a técnica descrita por Glavac et al (26) e coloração com nitrato de prata (27). Seguiu-se a sequenciação directa dos produtos de PCR que em SSCP apresentaram um padrão de migração distinto do obtido no controlo. A sequência resultante foi comparada com a obtida a partir de DNA de um indivíduo normal e com a sequência do cDNA previamente publicada (2). Todas as mutações encontradas foram confirmadas por sequenciação de produtos de PCR independentes para evitar possíveis artefactos. Sempre que a mutação identificada altera um local de restrição, a respectiva análise de RFLP, foi efectuada. Foram utilizadas as enzimas *NsiI* e *Fnu 4HI* (da *Biolabs*) e o marcador de pesos moleculares de 100 pares de bases (bp) (da *Pharmacia*).

### 3.4.3 Análise da ALDP por *western-blot*

As amostras utilizadas neste estudo foram fibroblastos de pele em cultura (28). O protocolo de *immunoblotting*, incluiu um SDS/PAGE em gel de acrilamida a 12% usando o sistema de Laemmli (29), a transferência electroforética para uma membrana de nitrocelulose (30) e a incubação com um anticorpo monoclonal contra a ALDP (clone 2AL-1D6 da *EUROMEDEX*). Os complexos antigénico-anticorpo foram detectados por incubação com um segundo anticorpo ligado à fosfatase alcalina, GAM-AP, *goat anti-mousse alkaline phosphatase*, seguida por uma reacção cromogénica realizada segundo as instruções do fabricante (Kit da *Biorad*).

**Tabela 1** - Condições de PCR e SSCP utilizadas para detecção de mutações no gene da ALDP

EXÃO	PRIMERS (INTRÔNICOS)	TEMPERATURA DE LIGAÇÃO PCR	TAMANHO DO PRODUTO AMPLIFICADO	CONDIÇÕES DE SSCP (***)
2	F: 5' ggccaggaagcctctctg 3' R: 5' gctcagcaaccagcggtgta 3'	60 °C	283 bp	{ 10 h30 300 V + 4 h 550 V
3	F: 5' tccgtgtctctgcocctgcc 3' R: 5' ggatggcaagggtgggctg 3'	57 °C	233 bp	19 h 250 V
4	F: 5' ttgcaatgcttctctccctg 3' R: 5' ctgagtgaggagcggsaat 3'	55 °C	325 bp	19 h 350 V
5	F: 5' ccgctgtctctctctgc 3' R: 5'tatgtcgtggctggcgc 3'	61 °C	151 bp	16 h 250 V
6	F: 5' aagggcctgcctctct 3' R: 5' caggaagaggtaggagag 3'	55 °C	228 bp	16 h 250 V
7 (*)	F: 5' ggcagagccgcccctccct 3' R: 5' ggaggccaaggagagccca 3'	69 °C	251 bp	16 h 250 V
8 (**)	F: 5' cgggtctgggtctgtgg 3' R: 5' gcctccccacagctgtact 3'	64 °C	201 bp	{ 16 h 200 V + 3 h 400 V
9	F: 5' ctctctctcggcccggacc 3' R: 5' caggcaggcactcccaccg 3'	59 °C	199 bp	16 h 300 V

Designação dada aos primers: F - forward; R - reverse;

(\*) após a realização de um PCR prévio que inclui o exão 6 e 7, com os primers 6F e 7R, a uma temperatura de ligação de 55°C, obtendo-se um fragmento de 531 bp.

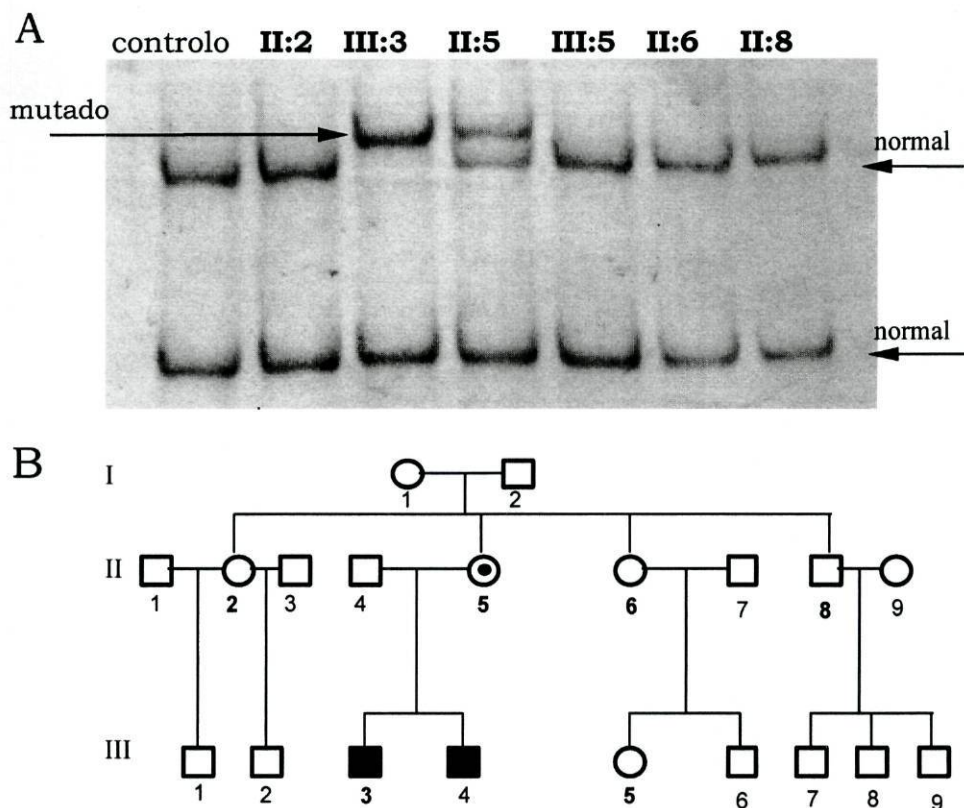
(\*\*) após a realização de um PCR prévio que inclui o exão 8 a 10, com os primers : F: 5' agctctgccaaggaactg 3' e R: 5' ctggcacggtagtcacattg 3', a uma temperatura de ligação de 60°C, obtendo-se um fragmento de 2001 bp.

(\*\*\*) realizado à temperatura ambiente.

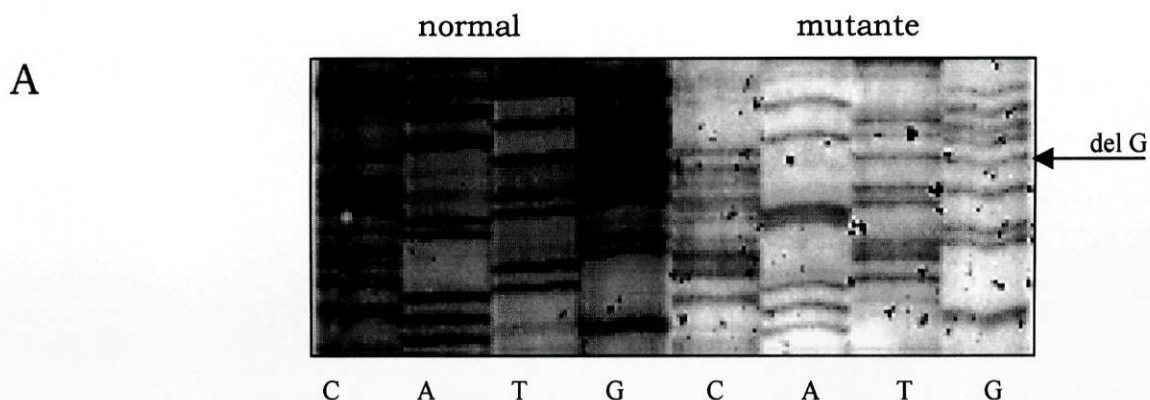
### 3.5 RESULTADOS

O estudo molecular das mutações no gene da ALDP foi efectuado em nove famílias (I-IX) portuguesas não relacionadas de doentes com ALD. Este estudo incluiu numa primeira abordagem a análise por RFLP e posterior *Southern-blot*. Nenhuma alteração no tamanho dos fragmentos de restrição foi encontrada, quando comparada com DNA de testemunhos. Seguiu-se a análise das mutações presentes no gene da ALD por SSCP de cada um dos produtos de PCR obtidos após amplificação dos exões 2 a 9, e posterior sequenciação. Para os exões 3, 4, 5 e 7 não se verificou nenhuma alteração de migração dos confórmeros em nenhum dos 9 doentes estudados, quando comparados com os obtidos a partir de DNA de indivíduos normais. Foram detectadas alterações nos exões 2 (figura 1), 6, 8 e 9. A sequenciação dos exões 2, 8 e 9 permitiu a identificação de três mutações pontuais, respectivamente 1296delG dando origem a uma mutação *frameshift* no exão 2 do gene da ALDP do caso índice da família IX (figura 2), 2236G>A no exão 8 do gene da ALDP do caso índice da família VIII, e 2281C>T no exão 9 do gene da ALDP do caso índice da família I, originando ambas mutações do tipo *missense* (resultados não mostrados). A sequenciação dos fragmentos correspondentes ao exão 6 do gene da ALD de dois dos nove doentes, os quais apresentavam um padrão de migração alterado por SSCP, permitiu identificar a presença de um mesmo polimorfismo nestes doentes (resultados não mostrados). A alteração 1934G>A, identificada no exão 6 do gene da ALD, não origina substituição do aminoácido L516 da ALDP.

A técnica de RFLP foi utilizada para confirmação das mutações identificadas. A enzima *Fnu 4HI* permite identificar a deleção da guanina na posição 1296 (figura 3) e a enzima *Nsi I* permite a confirmação da mutação 2236G>A presente no exão 9 (resultados não mostrados).



**Figura 1** - Análise por SSCP de fragmentos de PCR obtidos após amplificação do exão 2 do gene da ALDP de alguns indivíduos da família IX. A - gel de SSCP dos fragmentos de PCR do exão 2. Como se pode observar o confórmero correspondente ao exão 2 do gene da ALDP do indivíduo afectado (III:3) apresenta um atraso na migração (confórmero mutado), a presença simultânea do confórmero normal e do mutado foi observada no caso da heterozigotia (II:5). No mesmo gel foram também analisados os confórmeros correspondentes ao exão 2 do gene da ALDP de um controlo e dos indivíduos II:2, II:6, II:8, III:5 de acordo com pedigree em B; B - árvore genealógica da família IX.



B

**Sequência normal:** 3'GAGGTGGAGCTGGCCCTGCTACAGCGTCCTACCAGGA5'

**Sequência mutante:** 3'GAGGTGGAGCTGCCCTGCTACAGCGTCCTACCAGGA5'

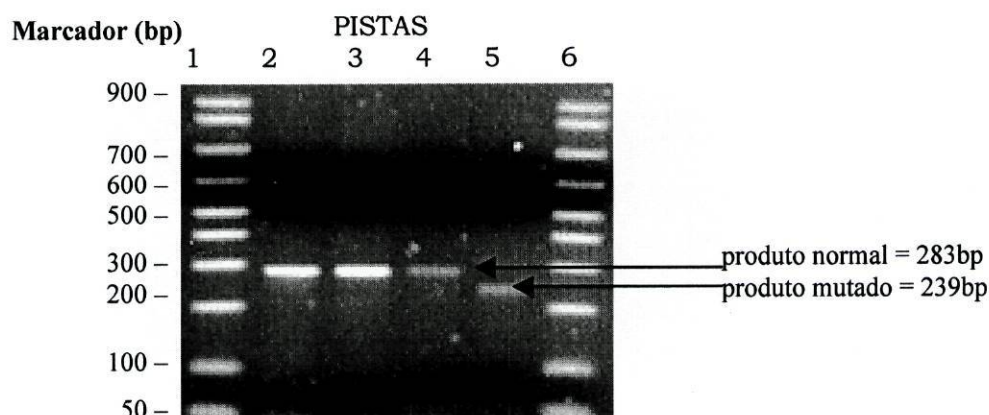
**Figura 2** - Caracterização por sequenciação da mutação *frameshift* 1296delG, no exão 2 do gene da ALDP. A figura A representa a sequência parcial do gene da ALDP obtida após amplificação assimétrica do respectivo exão 2, do caso índice da família IX (III:3-figura 1B) e de um controlo. Em B estão representadas as sequências obtidas após leitura do painel superior e de acordo com a sequência de cDNA publicada (2). O nucleotídeo sublinhado representa a guanina delectada na sequência mutante.

A tabela 2 resume os resultados obtidos nas três famílias em que foi possível identificar o defeito molecular presente no gene da ALDP. A análise familiar incluída neste trabalho englobou o despiste de ALD em 35 indivíduos pertencentes às três famílias: destes, confirmou-se o estatuto de heterozigotia em 15 e o de hemizigotia em 10 doentes, previamente diagnosticados bioquimicamente. Dos restantes 10 casos foi possível excluir o estatuto de portadora em 6 indivíduos pertencentes às famílias VIII e IX e o estatuto de hemizigotia em 4 indivíduos em risco.

**Tabela 2** - Resumo dos resultados obtidos

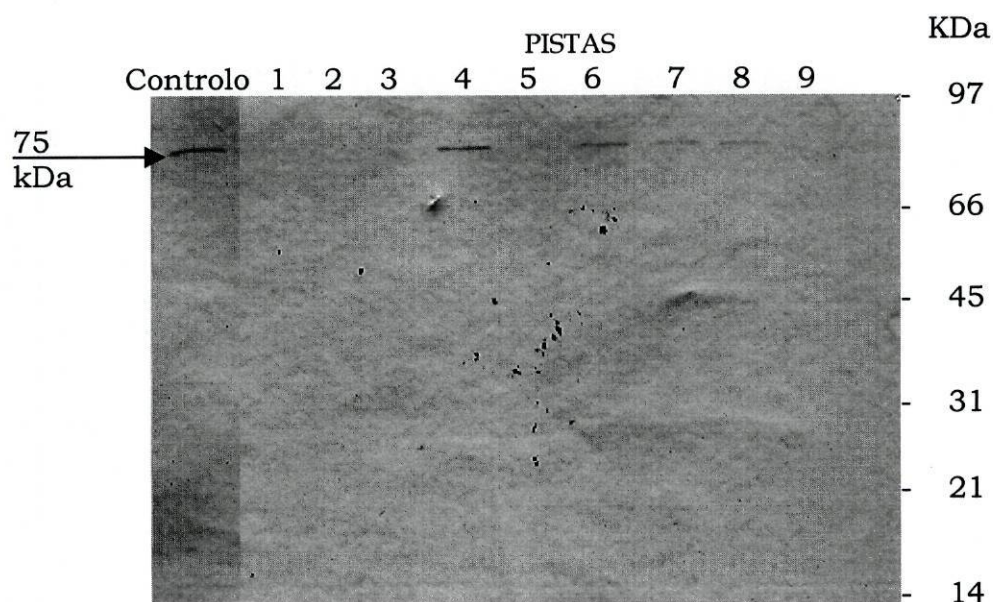
FAMÍLIA	DOENTES COM ALD			NÚMERO DE PORTADORAS	MUTAÇÃO	CONSEQUÊNCIA	
	FENÓTIPO	IDADE DE INÍCIO	IDADE ACTUAL			PREVISTA	ALDP
<b>I</b>	jALD (*)	8	18	3	2236G>A	R617H	-
	cALD	8	11 (#)				
<b>VIII</b>	AMN (*)	39	53	11	2281C>T	T632I	+
	AMN	40	65				
	AMN	30	49				
	DA	8	12				
	DA	13	18				
	jALD	6	11				
<b>IX</b>	DA (*)	13	15	1	1296delG	335STOP	-
	AMN	14	32				

Idades apresentadas em anos (#) - idade de falecimento; (\*) - caso índice; + e - significam ALDP, respectivamente detectável e ausente, em *western-blot*; Fenótipos: AMN - adrenomielloneuropatia; DA - doença de Addison ; jALD - forma juvenil de ALD; cALD - forma cerebral de ALD.



**Figura 3** - Análise de restrição do exão 2, com enzima *Fnu 4HI*. A digestão foi realizada com 10 unidades da enzima *Fnu 4HI* num volume final de 20 µl. Na primeira e última pistas encontram-se os padrões de peso molecular. Nas pistas 2 e 3 foram aplicados os produtos de PCR não submetidos à enzima de restrição respectivamente do doente III:3 da família IX (Figura 1B) e de um testemunho, apresentando o tamanho normal do fragmento de 283 bp. As pistas 4 e 5 mostram os fragmentos obtidos após a acção da enzima sobre os produtos de PCR do controlo e do doente III:3 da família IX, respectivamente. A presença da mutação 1296delG no exão 2 do gene da ALDP é detectada após corte do exão, por acção da enzima *Fnu 4HI*, em dois fragmentos de 239bp e 44bp não sendo este último visível no gel (pista 5).

Para detecção da ALDP, a proteína codificada pelo gene da responsável pela adrenoleucodistrofia, recorreu-se à análise por *western-blot* das proteínas totais de fibroblastos de pele após cultura. Este estudo permitiu verificar a presença da ALDP em fibroblastos de quatro doentes não relacionados (figura 4, pistas 4, 6-8) , e a sua ausência em fibroblastos de cinco doentes com ALD (figura 4, pistas 1-3, 5 e 9). Apesar de este método não permitir uma análise quantitativa, apenas nos fibroblastos do caso índice da família IV, se observa uma quantidade de ALDP semelhante à do controlo (figura 4, pista 4). Nos fibroblastos de três outros doentes (pistas 6-8) o sinal detectado correspondente à ALDP, parece ser significativamente inferior ao observado nos fibroblastos controlo. O *western-blot* efectuado com as proteínas totais de linfoblastos destes doentes confirmou estes resultados (não mostrados).



**Figura 4** - Análise de *immunoblot* (100 µg proteína por pista) utilizando um anticorpo monoclonal contra a ALDP. As posições dos marcadores de peso molecular estão indicadas à direita. A ALDP está representada pela seta (à esquerda). Pistas 1-9 correspondem aos extractos de fibroblastos dos casos índice das família de I a IX, respectivamente.

### 3.6 DISCUSSÃO

A análise de RFLP efectuada, utilizando DNA genómico dos doentes com ALD não permitiu verificar qualquer alteração (como por exemplo inserções, deleções e alterações no local de corte reconhecido pelas enzimas de restrição utilizadas) no gene envolvido na ALD, nos nove doentes em estudo. A análise de SSCP seguida por sequenciação permitiu identificar 3 mutações no gene da ALDP (1296delG; 2236G>A; 2281C>T) em 3 famílias distintas e um polimorfismo (1934G>A) em outras duas famílias. O estudo familiar efectuado (resultados tabela 2) permitiu confirmar o diagnóstico de ALD em indivíduos em risco, três dos quais com um fenótipo de doença de Addison sem qualquer envolvimento neurológico, dois da família VIII e um da família IX. Este estudo permitiu ainda identificar 15 portadoras e excluir o estatuto de heterozigotia em 6 casos. Como se pode verificar pela análise da tabela 2, em todas estas famílias se observa uma grande heterogeneidade clínica, facto que revela uma ausência de correlação genótipo/fenótipo e sugere a existência de factores modificadores implicados na apresentação fenotípica. Observações semelhantes foram efectuadas por outros autores (20,21,36).

O polimorfismo 1934G>A, encontrado nos doentes portugueses foi identificado em 6 outros doentes (34-39), sendo-lhe atribuída uma frequência de 15% (35). A mutação 2236C>T presente no exão 8 do gene da ALD identificada numa família portuguesa foi também descrita por outros autores em três doentes cuja origem não está indicada (31-33). Esta mutação encontra-se na região que codifica para o local de ligação ao ATP, um dos domínios que parece ser importante para a função da ALDP (31). À semelhança do que tem sido descrito por outros autores as duas outras mutações identificadas neste estudo, não estão localizadas em nenhuma zona particular do gene. O facto de as mutações identificadas em doentes com ALD se distribuírem por todo o gene torna difícil estabelecer correlações entre o defeito molecular e a funcionalidade da ALDP.

Uma das mutações descritas, uma 1296delG (doente 9), introduz um códon STOP prematuro no gene da ALD, podendo codificar uma proteína de tamanho significativamente menor que o normal (335 em vez de 745 aminoácidos) facto que poderá explicar a não detecção de ALDP nos fibroblastos deste doente.

O estudo de *western-blot* revelou ausência de ALDP em fibroblastos de cinco doentes com ALD, 56% da amostra estudada. Esta percentagem é semelhante à referida por outros autores em estudos de caracterização da ALDP (32,40). Níveis de ALDP inferiores aos normais foram observados em fibroblastos e linfoblastos dos casos índice das famílias VI, VII e VIII. A aparente diminuição observada poderá corresponder a uma diminuição efectiva na concentração da ALDP ou dever-se a uma alteração do epítoto reconhecido pelo anticorpo.

A multiplicidade de mutações no gene da ALD, descritas na literatura e o facto de nenhuma delas ser prevalente, o que se verifica também nos doentes portugueses, dificulta o diagnóstico molecular desta doença obrigando a um estudo exaustivo para cada família. Apesar desta dificuldade, a análise do genótipo de todos os casos índice deve ser efectuada dada a sua importância para a identificação de portadoras nas famílias em risco e consequente aplicação num aconselhamento genético correcto, e eventual diagnóstico pré-natal.

### 3.7 BIBLIOGRAFIA

- 1 - Moser H.W., Moser A.B., Smith K.D., *et al*:(1992). Adrenoleukodystrophy: Phenotypic Variability and Implications for Therapy. *J Inher Metab Dis*; 15: 645-664.
- 2 - Mosser J.M., Douar A., Sarde C., *et al*:(1993). Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares homology with ABC transporters. *Nature*; 361:726-730.
- 3 - Aubourg P., Mosser J., Douar A.M., *et al*:(1993). Adrenoleukodystrophy gene: Unexpected homology to a protein involved in peroxisome biogenesis. *Biochimie*; 75: 293-302.
- 4 - Mosser J.Y., Lutz M., Stoeckel, *et al*:(1994). The gene responsible for adrenoleukodystrophy encodes a peroxisomal membrane protein. *Hum Mol Genet*; 3:265-271.
- 5 - Korenke G.C., Fuchs S., Krasemann, *et al*:(1996). Cerebral adrenoleukodystrophy (ALD) in only one of monozygotic twins with as identical ALD genotype. *Ann. Neurol*; 40(2):254-257.
- 6 - Schutgens R.B., Barth P.G., van Geel B.M., *et al*:(1995). Peroxisomal disorders: classification, diagnosis and treatment. In: *Metabolic Encephalopathies*: S.Di donato, R.Parini and G. Uziel (eds.) John Libbey & Company Ltd; 129-140.
- 7 - Moser H.W., Moser A.B., Frayer K.K., *et al*:(1981). Adrenoleukodystrophy: Increased Plasma Content of Saturated Very Long Chain Fatty Acids. *Neurology*; 31:1241-1246.
- 8 - Jakobs B.S., Wanders R.J.A. (1991). Conclusive Evidence That Very-Long-Chain Fatty Acids are Oxidised Exclusively in Peroxisomes in Human Skin Fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*; 21: 240-249.
- 9 - Harkness R.A., Lynes G.W., Johnson A.W. (1992). The efficacy of very long-chain fatty acid analysis in the diagnosis of peroxisomal disorders: an audit report. *J Inher Metab Dis*; 15: 287-288.
- 10 - Moser H.W., Smith K.D., Moser A.B. (1995). X-linked Adrenoleukodystrophy. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*: Scriver, Beaudet, Sly, Valle (eds.); Mc Graw Hill, International Edition, 2325-2349.

- 11 - Moser H.W., Powers J.M., Smith K.D. (1995). Adrenoleukodystrophy: Molecular Genetics, Pathology, and Lorenzo's oil. *Brain Pathology*; 5:259-266.
- 12 - Ho J.K., Moser H.W., Kishimoto Y., *et al*:(1995). Interactions of a very long chain fatty acid model membranes and serum albumin: implications for the pathogenesis of adrenoleukodystrophy. *J Clin Invest*; 96:1455-1463.
- 13 - Moser H.W., Moser A.B., Trojak J.E., *et al*(1983). Identification of female carriers of adrenoleukodystrophy. *J Pediatr*, 103:54-59.
- 14 - Inoue K., Suzuki Y., Yajima Y., *et al*:(1996). Carrier identification of X-linked adrenoleukodystrophy by measurement of very long chain fatty acids and lignoceric acid oxidation. *Clin Genet*; 50:348-352.
- 15 - Cartier N., Sarde C.-O., Douar A.M., *et al*(1993). Abnormal messenger RNA expression and a missense mutation in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Molec Genet*; 2:1949-1951.
- 16 - Sarde C.-O., Mosser J., Kioschis P., *et al*:(1994). Genomic organisation of the adrenoleukodystrophy gene. *Genomics*; 22:13-20.
- 17 - Berger J., Molzer B., Fae I., *et al*:(1994). 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: 1638-1643.
- 18 - Barcelo A., Giros M., Sarde C.-O., *et al*:(1994). Identification of a new frameshift mutation (1801 delAG) in the ALD gene. *Hum Molec Genet*; 3:1889-1890.
- 19 - Kemp S., Ligtenberg M.J.L., van Geel B.M., *et al*:(1995). Two intronic mutations in the adrenoleukodystrophy gene. *Hum Mutat*; 6: 272-273.
- 20 - Ligtenberg M.J.L., Kemp S., Sarde C.-O., *et al*:(1995). Spectrum of mutations in the gene encoding the adrenoleukodystrophy protein. *Am J Hum Genet*; 56:44-50.
- 21 - Seneca S., Lissens W. (1995). DNA diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy. *J Inherit Metab Dis*; 18 (suppl 1):34-44.
- 22 - Vorged M., Fuchs S., Tegenthoff M., *et al*:(1995). A missense point mutation (Ser515Phe) in the adrenoleukodystrophy gene in a family with adrenomyeloneuropathy: A clinical, biochemical, and genetic study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 58:229-231.

- 23 - Southern E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-517,
- 24 - McCabe P.C. (1990). Production of Single Stranded DNA by asymmetric PCR. In: PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, Academic Press, San Diego, California, 76-83.
- 25 - Arnheim N. (1992). Polymerase chain reaction strategy. *Ann Rev Biochem* 61:131-156.
- 26 - Glavac D., Dean M. (1993). Optimisation of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Human Mutation* 2:404-414.
- 27 - Budowle B., Chakraborty R., Giusti A.M., et al:(1991). Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by High-Resolution PAGE. *Am J Hum Genet*; 48, 137-144, 1991.
- 28 - Harden D.G. (1960). A human skin culture technique used for cytological examinations. *Br J Exp Pathol*; 41: 31-35.
- 29 - Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227: 680-685.
- 30 - Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1980). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitro-cellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*; 76:4350-4354.
- 31 - Fanen N.P., Guidoux S., Sarde, C.-O., et al:(1994). Identification of mutations in the putative ATP-binding domain of ALD gene. *J Clin Invest*; 94: 516-520.
- 32 - Watkins P.A., Gould S.J., Smith M.A., et al:(1995). Altered expression of ALDP in X-linked adrenoleukodystrophy. *Am J Hum Genet*; 57:292-301.
- 33 - Masumoto T., Kondoh T., Masuzaki H., et al:(1994). A point mutation at ATP-binding region of the ALD gene in a family with X-linked adrenoleukodystrophy. *Jpn J Hum Genet*; 39:345-351.
- 34 - Kemp S., Ligtenberg M., Geel B., et al:(1994). Identification of a two base pair deletion in five unrelated families with adrenoleukodystrophy: a possible hot spot or mutations. *Biochem Biophys Res Commun*; 202(2):647-653.

- 35 - Fuchs S., Sarde C.-O., Wedemann H., *et al.*(1994). Missense mutations are frequent in the gene for X-chromosomal adrenoleukodystrophy (ALD). *Human Molecular Genetics*; 3(10): 1903-1905.
- 36 - Braun A., Ambach H., Kammerer S., *et al.*(1995). Mutations in the gene for X-linked adrenoleukodystrophy in patients with different clinical phenotypes. *American Journal of Human Genetics*; 56:854-61.
- 37 - Krasemann E.W., Meier V., Korenke G.C., *et al.*(1996). Identification of mutations in the ALD gene of 20 families with adrenoleukodystrophy / adrenomyeloneuropathy. *Hum Genet*; 97: 194-197.
- 38 - Uchiyama A., Suzuki Y., Song X.-Q., *et al.*(1994). Identification of a nonsense mutation in ALD protein cDNA from a patient with adrenoleukodystrophy. *Biochem Biophys Res Commun*; 198(2):632-636.
- 39 - Kok F., Neumann S., Sarde C.-O., *et al.*(1995). Mutational analysis of patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Human Mutation*; 6:104-115.
- 40 - Kemp S., Mooyer P.A.W., Bolhuis P.A., *et al.*(1996). ALDP expression in fibroblasts of patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *J Inherited Metab Dis*; 19(5):667-674.

Agradecimentos: Este estudo foi parcialmente financiado pela JNICT, Junta Nacional de Investigação Científica Tecnológica, Lisboa (projecto PBIC/C/BIA/2089/95). A aluna de doutoramento Paula Jorge é bolsreira do PRAXIS XXI (BD/5289/95).

## **TRABALHO 4**

---

### **ESTUDOS DA ALDP POR IMMUNOBLOTTING E IMUNOFLUORESCÊNCIA**

## 4. ESTUDOS DA ALDP POR *IMMUNOBLOTTING* E *IMUNOCITOFLOURESCÊNCIA*

### 4.1 INTRODUÇÃO

A adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X (X-ALD) é uma doença hereditária na qual a oxidação peroxissomal dos ácidos gordos de cadeia muito longa está deficiente, resultando na acumulação destes ácidos gordos (1-3). A sua expressão clínica é muito variada mesmo em indivíduos com a mesma mutação no gene da X-ALD (4). Os fenótipos mais frequentes são a forma cerebral infantil (40% dos casos de X-ALD) e a adrenomielloneuropatia na qual se verifica um envolvimento dos nervos periféricos e da medula espinal (AMN; 35% dos casos de X-ALD). Com uma frequência menor surgem doentes que manifestam apenas insuficiência da glândula supra-renal ou doença de Addison (DA; 10% dos casos de X-ALD) (5). A X-ALD pode apresentar outros fenótipos tais como formas cerebrais juvenis e adultas. Formas assintomáticas têm também sido descritas, muitas das quais vêm posteriormente a desenvolver sintomas (5). As heterozigótias para a X-ALD que desenvolvem sintomas (40% das portadoras) apresentam geralmente uma forma clínica de AMN, normalmente com uma progressão mais lenta (5).

O gene responsável pela X-ALD codifica uma proteína peroxissomal de 75 kDa, a ALDP (6,7). A ALDP, cuja função não está ainda estabelecida, é uma proteína integral da membrana do peroxissoma. A análise da estrutura primária da ALDP revelou que esta possui 6 segmentos transmembranares e uma sequência característica das proteínas pertencentes ao grupo da família de proteínas ABC (*ATP-binding cassette*), apresentando ainda uma elevada homologia com a proteína da membrana do peroxissoma de 70 kDa envolvida na biogénese do peroxissoma (PMP70) (8).

Este trabalho engloba o estudo da expressão da ALDP em fibroblastos de doentes de X-ALD utilizando o anticorpo monoclonal que reconhece a ALDP (1D6). Nos doentes cujos fibroblastos revelaram ALDP imunoreactiva fez-se o estudo após a extração com carbonato e a localização subcelular da ALDP por imunofluorescência.

Em doentes com síndrome de Zellweger (SZ) muitas proteínas integrais de membrana do peroxissoma (PMPs) estão associadas a vesículas com forma e tamanho anormais, conhecidas por “*peroxissomal ghosts*”. Com o objectivo de testar se a ALDP é correctamente enviada para os peroxissomas existentes em fibroblastos destes doentes, fez-se a comparação dos resultados obtidos por imunofluorescência em linhas celulares de doentes com X-ALD e SZ.

Estudou-se a possibilidade da aplicação da imunofluorescência com anticorpo monoclonal anti-ALDP, no diagnóstico de portadoras e diagnóstico pré-natal, em familiares dos doentes cujos fibroblastos revelaram ALDP não imunoreactiva.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Doentes

Este estudo foi realizado em fibroblastos de um indivíduo controlo, e dos casos índice de 9 famílias com adrenoleucodistrofia: IV:1-A, IV:1-B, IV:1-E, IV:13-F, III:27-H, IV:3-I, III:11-J, II:10-K e III:8-M. Em todos estes doentes tinham sido detectados níveis plasmáticos de C26:0 e da razão C26:0/C22:0 elevados. Os fenótipos à data deste estudo eram variados e incluíam 3 “Addison only”, 3 formas cerebrais, 2 adrenomielloneuropatia (AMN) e 1 forma AMN cerebral. O defeito molecular, presente no gene da X-ALD, é conhecido em 3 das 9 famílias em estudo: uma mutação pontual, já descrita por outros autores em mais famílias com X-ALD, R617H (família A) e duas mutações descritas de novo, 1296delG (família M) e T632I (família K). Estudaram-se ainda fibroblastos de possíveis portadoras, casos III:7-F, III:2-H e II:15-M, e de um indivíduo controlo do sexo feminino e amniócitos em cultura de 4 fetos: IV:4-C, IV:5-C, III:5-D e III:4-D.

Foram também utilizados fibroblastos pertencentes a 4 doentes com síndrome de Zellweger já falecidos. Os doentes de Zellweger estudados apresentavam níveis elevados de ácidos gordos de cadeia muito longa (AGCML) em plasma e fibroblastos, diminuição da actividade da enzima dihidroxiacetonafosfato-acil transferase (DHAP-AT) e diminuição do conteúdo em plasmalógenos.

## 4.2.2 Métodos

As células utilizadas neste estudo foram cultivadas segundo técnicas padrão (9). Para a extracção das proteínas membranares utilizou-se carbonato de sódio a 100 mM pH 11.8, e uma ultra-centrifugação a 50 000 rpm durante 1 hora, obtendo-se no sobrenadante as proteínas solúveis e no sedimento as proteínas membranares (10).

### 4.2.2.1 Immunoblotting

O protocolo de *immunoblotting*, incluiu um SDS/PAGE em gel de acrilamida a 12% usando o sistema de Laemmli (11), a transferência electroforética para uma membrana de nitrocelulose (12) e a incubação com um anticorpo monoclonal contra a ALDP (clone 2AL-1D6 da *EUROMEDEX*). Os complexos antigéneo-anticorpo foram detectados por incubação com um segundo anticorpo ligado à fosfatase alcalina, GAM-AP, *goat anti-mouse alkaline phosphatase*, seguida por uma reacção cromogénica realizada segundo as instruções do fabricante (Kit da *Biorad*). No caso das incubações com anticorpo policlonal anti-catalase (cedido pelo Prof. Ronald Wanders, AMC, Holanda), o anticorpo secundário utilizado foi GAR-AP, *goat anti-rabbit alkaline phosphatase*, mantendo-se as restantes condições.

### 4.2.2.2 Imunocitofluorescência

As células (fibroblastos/amniócitos) foram processadas para a imunofluorescência indirecta com marcação simples ou dupla (co-localização), na presença dos diferentes anticorpos. O protocolo seguido foi o descrito por Mosser e colaboradores (13). A marcação específica foi revelada com Cy3 ligado à estreptavidina, após incubação com anticorpo secundário ligado à biotina GAM-B, *goat anti-mouse biotine* (para anticorpo primário monoclonal) ou GAR-B, *goat anti-rabbit biotine* (para anticorpo primário policlonal). Na marcação dupla da ALDP e catalase a distinção foi feita visualizando a catalase com FITC e a ALDP com Cy3. As incubações foram efectuadas à temperatura de 37°C durante 45' em PBS contendo 10 mg/ml de BSA (para reduzir as ligações não específicas). Após cada incubação as amostras foram lavadas em PBS (seis vezes 5'). As células foram observadas no microscópio de fluorescência, *Nikon optiphot-2*, com o filtro B2-A, absorvância 490 nm e emissão 520 nm, para a detecção do sinal de excitação da fluoresceína e filtro G1-B, absorvância 553 nm e emissão 568 a 574 nm, para a detecção do sinal de excitação do Cy3.

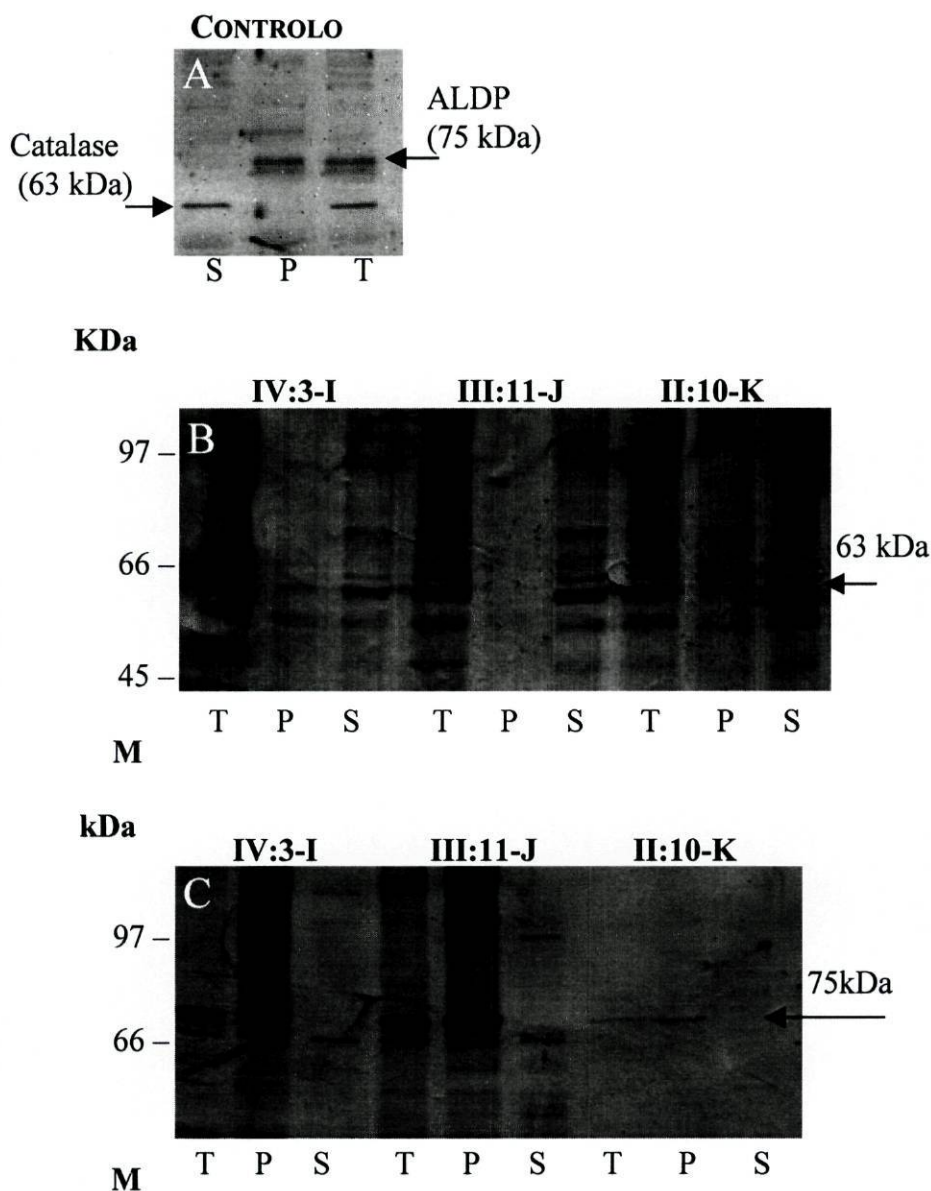
## 4.3 RESULTADOS

### 4.3.1 Estudo da ALDP após extracção com carbonato

A análise por *immunoblotting* de fibroblastos dos doentes com X-ALD, revelou ALDP em quantidades iguais ao controlo, no doente IV:13-F e em quantidades inferiores nos doentes IV:3-I, III:11-J e II:10-K (resultados no estudo anterior - trabalho 3). Em fibroblastos desses doentes IV:13-F, IV:3-I, III:11-J e II:10-K e de um testemunho, efectuou-se a extracção das proteínas membranares na presença de carbonato de sódio, obtendo-se no sobrenadante as proteínas solúveis e no sedimento as proteínas membranares. A análise após *immunoblotting* com anticorpo policlonal anti-catalase revelou a presença de catalase na fracção solúvel em todas as amostras em estudo. Pelo contrário a incubação com anticorpo monoclonal anti-ALDP, revelou esta proteína no sedimento, indicando que a ALDP se encontra associada/integrada em estruturas membranares, possivelmente na membrana do peroxissoma (figura 1).

### 4.3.2 Estudo da localização subcelular da ALDP por imunofluorescência

A localização da ALDP em estruturas membranares, em fibroblastos de doentes com X-ALD, (4.3.1) não exclui a possibilidade desta proteína ser incorrectamente enviada para outro organelo, que não o peroxissoma. Fibroblastos pertencentes aos doentes IV:1-A, IV:1-B, IV:1-E, IV:13-F, III:27-H, IV:3-I, III:11-J, II:10-K e III:8-M foram analisados por imunocitofluorescência. Cinco das nove amostras estudadas: IV:1-A, IV:1-B, IV:1-E, III:27-H e III:8-M, (56%) não apresentavam material imunoreactivo característico da ALDP, indicando que a ALDP não é expressa de forma estável naquelas células. Os doentes de X-ALD que não demonstravam sinal para a ALDP continham peroxissomas abundantes quando analisados com anticorpo anti-catalase. Das restantes amostras, uma correspondente ao doente IV:13-F, apresentava um padrão com pontos fluorescentes (marcação característica da ALDP); as restantes três amostras: IV:3-I, III:11-J e II:10-K apresentavam em certas experiências um sinal muito fraco.

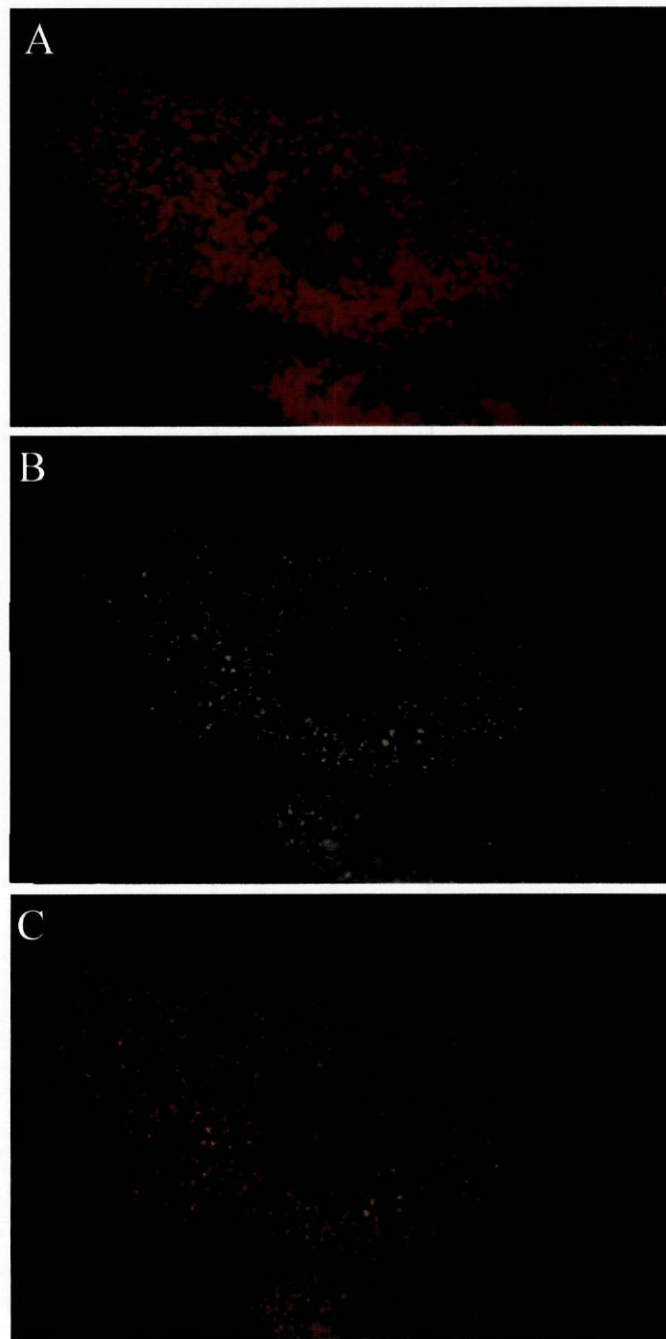


**Figura 1** - Análise por *immunoblot* (75 µg de proteína por pista) utilizando em simultâneo um anticorpo monoclonal anti-ALDP e um anticorpo policlonal anti-catalase. **M**-marcador de peso molecular; **T**-extracto total de fibroblastos; **S**-sobrenadante-extracto solúvel; **P**-sedimento-extracto não solúvel. A-análise de fibroblastos de um indivíduo controlo após incubação com anticorpos anti-catalase e anti-ALDP. B-análise de fibroblastos dos doentes: IV:3-I, III:11-J e II:10-K após incubação com anticorpo anti-catalase; C-análise de fibroblastos dos doentes: IV:3-I, III:11-J e II:10-K após incubação com anticorpo anti-ALDP.

Para confirmar a localização peroxissomal da ALDP nos fibroblastos de doentes com ALDP imunoreactiva foram efectuados ensaios de imunofluorescência indirecta utilizando simultaneamente um anticorpo anti-ALDP e outro anti-catalase. Os fibroblastos dos doentes: IV:13-F, IV:3-I, III11-J e II:10-K foram incubados com anticorpo anti-ALDP marcado com Cy3 e posteriormente com anticorpo anti-catalase marcado com fluoresceína (FITC). Foi observado um sinal específico (pontos fluorescentes) com cada um dos anticorpos (verde para a catalase e vermelho para a ALDP), nos fibroblastos dos quatro doentes com X-ALD. Um sinal idêntico, mas de cor intermédia (amarelo-alaranjado) foi observado em fibroblastos destes doentes, quando foram sujeitos à dupla imunocitofluorescência (na figura 2 estão representados os fibroblastos do doente IV:13-F). Este resultado indica que as duas proteínas analisadas se co-localizam, e portanto a ALDP está correctamente associada à membrana do peroxissoma nos quatro doentes onde a sua presença foi detectada por *immunoblot*: IV:13-F, IV:3-I, III11-J e II:10-K.

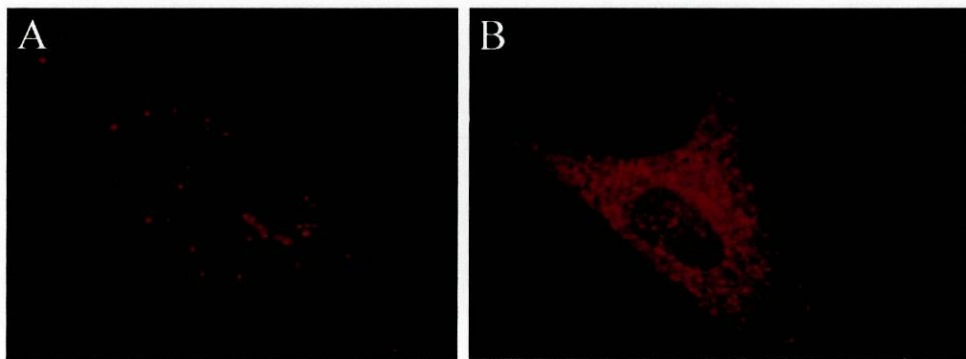
#### **4.3.2.1 Imunofluorescência em fibroblastos de doentes com síndrome de Zellweger**

Foram estudados fibroblastos pertencentes a quatro doentes com síndrome de Zellweger já falecidos. O síndrome de Zellweger é uma doença genética rara de hereditariedade autossómica recessiva, com uma clínica heterogénea, caracterizada por um importe deficiente de proteínas para o peroxissoma. Esta alteração provoca múltiplas perturbações metabólicas incluindo alterações na  $\beta$ -oxidação peroxissomal e síntese dos plasmalogenos (14-16). Os fibroblastos de doentes com X-ALD e de indivíduos controlo quando submetidos a experiências de imunofluorescência com anticorpo anti-catalase apresentam uma distribuição normal, indicando a presença de peroxissomas em número e tamanho normal (17) (figura 2B). Pelo contrário, a marcação por imunofluorescência de fibroblastos de doentes com SZ utilizando anticorpo monoclonal anti-ALDP (figura 3A), revela um padrão característico com pontos fluorescentes, mas as partículas contendo ALDP são maiores e em menor quantidade que as dos fibroblastos controlo ou as observadas em fibroblastos de doentes com X-ALD (figura 2A).



**Figura 2** - Experiências de co-localização da ALDP e da catalase. Fibroblastos do doente IV:13-F foram sujeitos a experiências de imunofluorescência com anticorpo anti-ALDP, 1D6 (A) ou com anticorpo anti-catalase (B) e dupla marcação com os dois anticorpos (C).

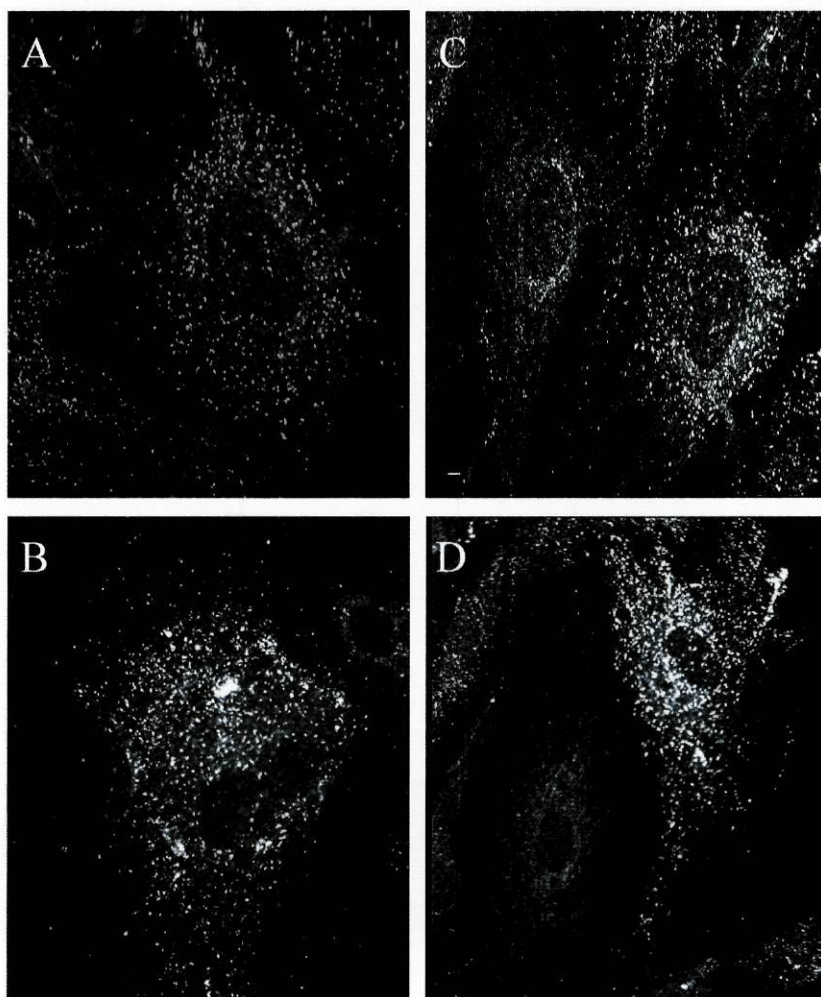
O padrão de marcação observado em fibroblastos de doentes com SZ, utilizando um anticorpo anti-catalase, apresenta um aspecto completamente difuso (figura 3B) ao contrário do observado em fibroblastos de indivíduos testemunho ou com X-ALD (figura 2B). Estes resultados indicam que em fibroblastos pertencentes a doentes com síndrome de Zellweger a catalase se encontra distribuída por todo o citoplasma e não no interior do peroxissoma e que a ALDP está associada à membrana dos “*peroxissomal ghosts*”, sugerindo que esta proteína não necessita do sistema de transporte que está deficiente nestas linhas celulares.



**Figura 3** - Localização da ALDP (A) e da catalase (B) em fibroblastos de doentes com síndrome de Zellweger (SZ), por experiências de imunofluorescência. No painel A o número de pontos é menor (indicando peroxissomas menos abundantes) e os pontos são maiores (indicando peroxissomas estruturalmente diferentes dos observados em controlos), quando comparado com o padrão obtido após incubação com ALDP de fibroblastos de indivíduos controlo (figura 2A). Em B não se observam pontos mas uma marcação difusa característica de uma proteína distribuída pelo citosol e não em organelos.

### 4.3.3 Imunofluorescência em portadoras

Fez-se o estudo da aplicabilidade da técnica de imunofluorescência com anticorpo monoclonal contra a ALDP, no despiste de portadoras de X-ALD, efectuando-se imunofluorescência em fibroblastos após cultura de vários indivíduos do sexo feminino.



**Figura 4** - Padrão de imunofluorescência observado após marcação de fibroblastos com anticorpo monoclonal anti-ALDP. A-fibroblastos de indivíduo controlo do sexo feminino; B-fibroblastos de uma portadora pertencente a uma família com ALDP imunoreactiva, III:7-F; C-fibroblastos de uma portadora obrigatória, II:15-M com mutação em heterozigotia do tipo *frameshift* 1296delG no exão 2 do gene da ALDP; D-fibroblastos do caso III:2-H, que revelou tratar-se de uma portadora para a X-ALD, pertencente a uma família sem ALDP imunoreactiva. As experiências de imunocitofluorescência foram realizadas segundo o método descrito em Mosser *et al*, 1994; as fotografias foram realizadas num microcópico co-focal, *BIORAD*, pelo Prof. Cláudio Sunkel, IBMC.

Foram testadas amostras de possíveis portadoras para a X-ALD. Apresentam-se os resultados dos casos III:2-H, II:15-M e III:7-F, onde se observam populações distintas de células umas sem ALDP imunoreactiva e outras com marcação fluorescente normal, nos dois primeiros (figura 4C e D) e pontos fluorescentes semelhantes aos observados no controlo (figura 4A) em todas as células analisadas do caso III:7-F. Estes resultados permitem o diagnóstico de heterozigotia para a X-ALD nos casos III:2-H e II:15-M. No caso III:7-F o estatuto de portadora foi confirmado bioquimicamente uma vez que este caso pertence a uma família com ALDP imunoreactiva (figura 4B).

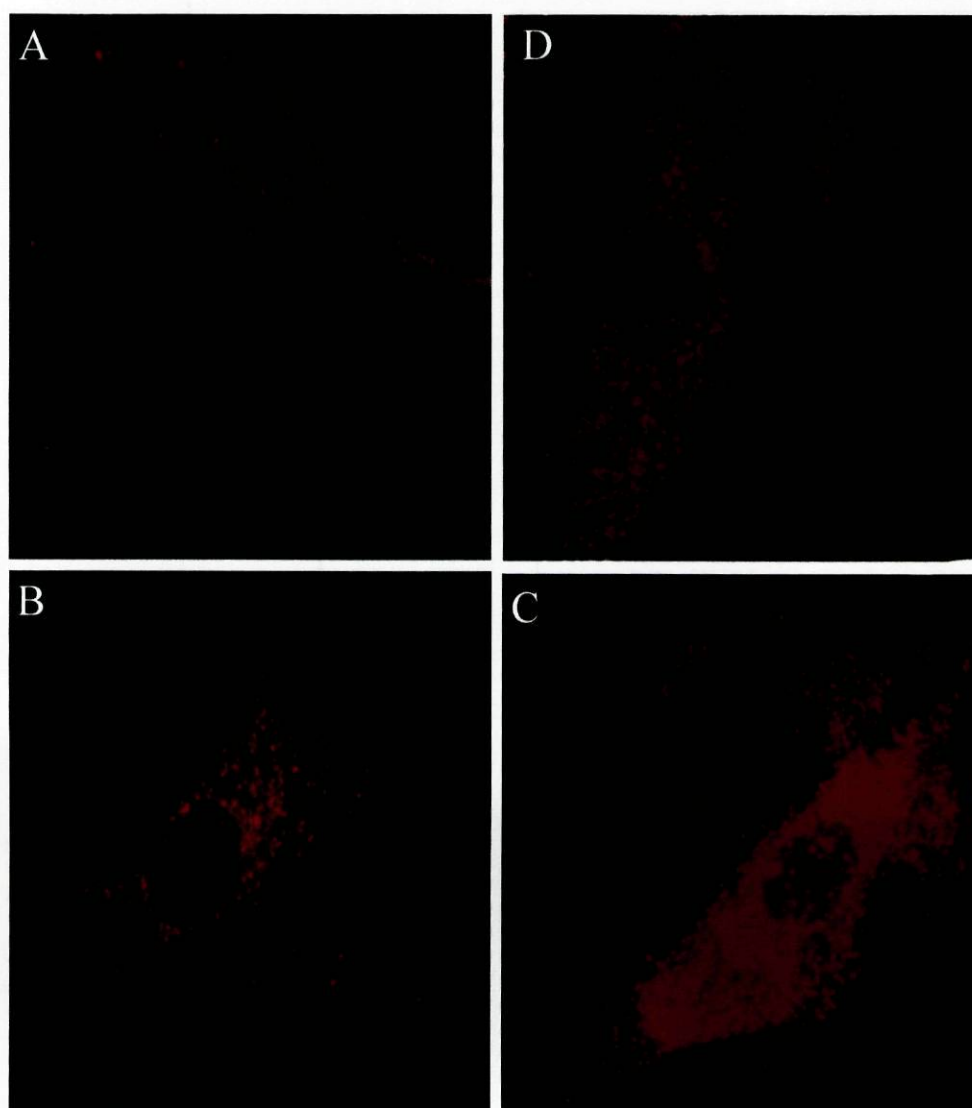
#### 4.3.4 Imunofluorescência em amniócitos-aplicação ao DPN

Testou-se também a aplicabilidade da imunofluorescência no diagnóstico pré-natal (DPN) da adrenoleucodistrofia. Para tal estudaram-se amniócitos em cultura de quatro fetos: IV:4-C, IV:5-C, III:5-D e III:4-D. As células pertencentes aos fetos IV:4-C e IV:5-C, apresentam distribuição normal da ALDP em amniócitos (figura 5B e D, respectivamente), as células pertencentes ao feto III:5-D não continham ALDP imunoreactiva (figura 5A), enquanto amniócitos do feto III:4-D revelaram uma dupla população de células sugerindo que estas células pertenciam a uma heterozigotia para a X-ALD (figura 5C). Todos os resultados confirmaram os obtidos após determinação dos níveis de AGCML (tabela 1).

**Tabela 1** - Determinação do nível de AGCML em amniócitos em risco de X-ALD.

FETO	DATA DE COLHEITA (semanas)	SEXO	AGCML EM AMNIÓCITOS			ALDP <sup>(i)</sup>	RESULTADO
			C24:0/C22:0	C26:0/C22:0	C26:0 (µg/mg proteína)		
IV:4-C	13.5	F	2.22	0.18	0.12	+	Normal
IV:5-C	13	M	1.95	0.073	0.089	+	Normal
III:5-D	13 (*)	M	3.06	1.02	1.6	-	Afectado
III:4-D	14	F	2.86	0.98	1.45	+/-	Portadora
<b>INTERVALO</b>	<b>CONTROLO</b>		<b>1.6-2.5</b>	<b>0.06-0.23</b>	<b>0.12-0.29</b>		

(\*) aborto espontâneo às 16 semanas; M-sexo masculino; F-sexo feminino; (i)-os doentes foram testados, por imunofluorescência, para presença (+) ou ausência (-) de ALDP.



**Figura 5** - Análise por imunofluorescência de amniócitos pertencentes a fetos controlo e com X-ALD. A-células de um feto afectado pertencente a uma família com ausência de ALDP (III:5-D); B-amniócitos de um feto do sexo feminino, normal (IV:4-C); C-amniócitos de um feto do sexo feminino, portadora, pertencente a uma família com ausência de ALDP (III:4-D); D-amniócitos de um feto do sexo masculino, normal (IV:5-C).

#### 4.4 DISCUSSÃO

Em fibroblastos de 4 doentes com X-ALD não relacionados (4/9) o que corresponde a 44% dos doentes estudados observou-se material imunoreactivo correspondente à ALDP quando analisados com anticorpo monoclonal anti-ALDP por técnicas de *immunoblot* e imunocitofluorescência. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por outros grupos (18,19). Apesar de este método não permitir uma análise quantitativa, apenas nos fibroblastos do doente IV:13-F, se observa uma quantidade de ALDP semelhante à obtida em indivíduos controlo; nos restantes três doentes IV:3-I, III11-J e II:10-K o sinal detectado correspondente à ALDP parece ser inferior ao observado nos fibroblastos de indivíduos controlo. Os estudos efectuados após extracção das proteínas com carbonato e co-localização com a catalase indicam que a ALDP se encontra associada ao peroxissoma em todos os doentes onde é detectada mesmo quando em quantidades inferiores aos controlos. A ALDP foi também detectada em fibroblastos de doentes com Zellweger, associada à membrana de peroxissomas distintos dos normais em número e estrutura (*peroxisomal ghosts*).

A mutação 1296delG, identificada no exão 2 do gene da ALDP em indivíduos da família M; introduz um códon STOP prematuro, podendo codificar uma proteína de tamanho significativamente menor que o normal (335 em vez de 745 aminoácidos) facto que poderá explicar a não detecção de ALDP nos fibroblastos do doente III:8-M. À semelhança do que tem sido descrito por outros autores, o facto de as mutações identificadas em doentes com X-ALD se encontrarem em todo o gene torna difícil estabelecer correlações entre o defeito molecular e a funcionalidade da ALDP (20,21).

O procedimento descrito neste trabalho que incluiu imunofluorodeteccção da ALDP utilizando um anticorpo monoclonal que reconhece a ALDP é rápido e pode ser aplicado ao *screening* e identificação de portadoras na maioria das famílias de X-ALD (5/9-56%), especialmente naquelas onde a mutação não foi ainda identificada. Esta é uma das técnicas a que é possível recorrer quando a determinação bioquímica dos níveis de ácidos gordos de cadeia muito longa não permite o diagnóstico de heterozigotia (5-10% dos casos) (22) podendo ser também aplicada ao diagnóstico pré-natal de X-ALD (23, 24).

## 4.5 REFERÊNCIAS

- 1 - Moser H.W., Moser A.B., Smith K.D., *et al.* (1992). Adrenoleukodystrophy: Phenotypic Variability and Implications for Therapy. *J Inher Metab Dis*; 15: 645-664.
- 2 - Moser H.W., Moser A.B., Frayer K.K., *et al.* (1981). Adrenoleukodystrophy: Increased Plasma Content of Saturated Very Long Chain Fatty Acids. *Neurology*; 31:1241-1246.
- 3 - Jakobs B.S., Wanders R.J.A. (1991). Conclusive Evidence That Very-Long-Chain Fatty Acids are Oxidised Exclusively in Peroxisomes in Human Skin Fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*; 21: 240-249.
- 4 - Korenke G.C., Fuchs S., Krasemann, *et al.* (1996). Cerebral adrenoleukodystrophy (X-ALD) in only one of monozygotic twins with as identical X-ALD genotype. *Ann. Neurol*; 40(2):254-257.
- 5 - Moser H.W., Smith K.D., Moser A.B. (1995). X-linked Adrenoleukodystrophy. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*: Scriver, Beaudet, Sly, Valle (eds.); Mc Graw Hill, International Edition, 2325-2349.
- 6 - Mosser J.M., Douar A., Sarde C., *et al.* (1993). Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares homology with ABC transporters. *Nature*; 361:726-730.
- 7 - Aubourg P., Mosser J., Douar A.M. *et al.* (1993). Adrenoleukodystrophy gene: Unexpected homology to a protein involved in peroxisome biogenesis. *Biochimie*; 75: 293-302, 1993.
- 8 - Gartner J., Obie C., Moser H., Valle D. (1992). A polymorphic synonymous mutation (K54K) in the human 70 kD peroxisomal membrane protein gene (PMP1). *Hum Mol Genet.* 1(8):654.
- 9 - Harden D.G.(1960). A human skin culture technique used for cytological examinations. *Br J Exp Pathol*; 41: 31-35.
- 10 - Fujiki Y., Hubbard A.L., Fowler S., Lazarow P.B. (1982). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 93(1):97-102.
- 11 - Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227: 680-685.

- 12 - Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1980). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitro-cellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*; 76:4350-4354.
- 13 - Mosser J.Y., Lutz M., Stoecke I., *et al.* (1994). The gene responsible for adrenoleukodystrophy encodes a peroxisomal membrane protein. *Hum Mol Genet*; 3:265-271.
- 14 - Lazarow P.B. (1995). Peroxisome structure, function, and biogenesis-human patients and yeast mutants show strikingly similar defects in peroxisome biogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 54(5):720-5. Review.
- 15 - Schutgens R.B., Barth P.G., van Geel B.M., *et al.* (1995). Peroxisomal disorders: classification, diagnosis and treatment. In: *Metabolic Encephalopathies*: S.Di donato, R.Parini and G. Uziel (eds.) John Libbey & Company Ltd; 129-140.
- 16 - Shimozawa N., Tsukamoto T., Suzuki Y., Orii T., Shirayoshi Y., Mori T., Fujiki Y. (1992). A human gene responsible for Zellweger syndrome that affects peroxisome assembly. *Science*. 28; 255(5048):1132-4.
- 17 - Vamecq J., Draye J.P., van Hoof F., Misson J.P., Evrard P., Verellen G., Eyssen H.J., van Eldere J., Schutgens R.B., Wanders R.J., *et al.* (1986). Multiple peroxisomal enzymatic deficiency disorders. A comparative biochemical and morphologic study of Zellweger cerebrohepatorenal syndrome and neonatal adrenoleukodystrophy. *Am J Pathol*. 125(3):524-35.
- 18 - Watkins P.A., Gould S.J., Smith M.A., *et al.* (1995). Altered expression of ALDP in X-linked adrenoleukodystrophy. *Am J Hum Genet*; 57:292-301.
- 19 - Kemp S., Mooyer P.A.W., Bolhuis P.A., *et al.* (1996). ALDP expression in fibroblasts of patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *J Inherited Metab Dis*; 19(5):667-674.
- 20 - Ligtenberg M.J.L., Kemp S., Sarde C.-O., *et al.* (1995). Spectrum of mutations in the gene encoding the adrenoleukodystrophy protein. *Am J Hum Genet*; 56:44-50.
- 21 - Smith K.D., Kemp S., Braiterman L.T., Lu J.F., Wei H.M., Geraghty M., Stetten G., Bergin J.S., Pevsner J., Watkins P.A. (1999). X-linked adrenoleukodystrophy: genes, mutations, and phenotypes. *Neurochem Res*. 24(4):521-35. Review.

- 22 - Inoue K., Suzuki Y., Yajima S., Shimozawa N., Tomatsu S., Orii T., Kondo N. (1996). Carrier identification of X-linked adrenoleukodystrophy by measurement of very long chain fatty acids and lignoceric acid oxidation. *Clin Genet.* 50(5):348-52.
- 23 - Maier E.M., Roscher A.A., Kammerer S., Mehnert K., Conzelmann E., Holzinger. (1999). Prenatal diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy combining biochemical, immunocytochemical and DNA analyses. *Prenat Diagn.* 19(4):364-8.
- 24 - Feigenbaum V., Lombard-Platet G., Guidoux S., Sarde C.-O., Mandel JL, Aubourg P. (1996). Mutational and protein analysis of patients and heterozygous women with X-linked adrenoleukodystrophy. *Am J Hum Genet* 58(6):1135-44.

## **CAPÍTULO V**

---

### ***DISCUSSÃO***

A pesquisa das alterações bioquímicas da adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X (X-ALD), foi efectuada em indivíduos do sexo masculino com suspeita clínica de X-ALD, recorrendo ao doseamento por cromatografia gasosa dos ácidos gordos de cadeia muito longa (AGCML) plasmáticos, sendo depois confirmado em fibroblastos de pele após cultura.

No decorrer deste trabalho foram caracterizadas bioquimicamente 20 hemizigotias e 26 heterozigotias para a X-ALD (apêndices 1 e 2). A relativa facilidade de colheita e cultivo de linfoblastos, linfócitos transformados pelo vírus EBV (*Epstein-Barr Virus*), levou à obtenção destas células, de todos os doentes com X-ALD, numa tentativa de substituir o estudo em fibroblastos para confirmação do diagnóstico de X-ALD (trabalho 1). Ao contrário do que se verifica em plasma e fibroblastos de doentes com X-ALD, os valores da razão C24:0/C22:0 em linfoblastos destes doentes não se relacionam com a presença do defeito bioquímico da X-ALD, sobrepondo-se aos valores obtidos em testemunhos. Os níveis de C26:0 estão aumentados em determinados doentes mas não em todos. Assim, a grande variabilidade nos níveis de AGCML observada em linfoblastos e que não se relacionam com a presença do defeito bioquímico da X-ALD, indica que esta linha celular não pode ser utilizada no diagnóstico bioquímico da X-ALD. Factores como os diferentes níveis de diferenciação dos linfócitos após infecção pelo EBV, podem justificar a variabilidade obtida nas concentrações dos AGCML. A acumulação de AGCML só se verifica em plasma e fibroblastos sendo estes os meios fiáveis de diagnóstico de X-ALD.

O estudo apresentado no trabalho 2, onde se pretendia determinar a frequência da X-ALD como causa da Doença de Addison (DA), revelou que em 24 doentes rastreados, 5 (21%) possuem o defeito bioquímico da X-ALD. Estes resultados indicam que se deve considerar a X-ALD como causa da DA na mesma proporção que qualquer uma das outras etiologias, por exemplo a tuberculose ou doença autoimune. Os resultados deste estudo são semelhantes aos obtidos por diversos grupos (Laureti *et al*, 1996 e 1997), como foi discutido no trabalho 2, onde se fez também uma análise estatística do conjunto desses resultados. Esse estudo revelou que a proporção de casos em que a DA é devida à X-ALD parece estar dependente da idade de início dos primeiros sintomas de insuficiência das glândulas supra-renais.

Quando a idade de manifestação da DA é inferior aos 7.5 anos a probabilidade de ser a X-ALD a causa da DA é extremamente elevada. Pelo contrário, esta probabilidade é relativamente baixa, se a idade de início dos sintomas for superior aos 15 anos. Entre os 7.5 e os 15 anos a probabilidade de ser ou não devida à X-ALD é semelhante. O diagnóstico preciso é particularmente importante porque a X-ALD tem um prognóstico completamente distinto do da insuficiência supra-renal de outras etiologias, podendo permitir a intervenção terapêutica precoce em doentes e familiares bem como o aconselhamento genético (Holmberg *et al*, 1992). Em conclusão a X-ALD deve ser rastreada em todos os doentes de Addison, em especial aqueles em que os sintomas surgem na primeira década de vida.

Para a identificação das mutações presentes no gene da X-ALD (trabalho 3), recorremos a técnicas de PCR-SSCP e sequenciação directa dos produtos amplificados por PCR, correspondentes aos exões 2 a 9 do gene da ALDP (Arnheim, 1992; Ausubel *et al*, 1997; Glavac e Dean, 1993). Detectaram-se alterações nos exões 2, 6, 8 e 9 em cinco dos doentes levando à caracterização do defeito molecular em 3 famílias. A sequenciação dos exões 8 e 9 permitiu a identificação de duas mutações pontuais, respectivamente 2236G>A (R617H) e 2281G>A (T632I) (descrita de novo). A sequenciação do exão 2 revelou a presença de uma mutação do tipo “*frameshift*”, 1296delG (descrita de novo). A mutação *missense* 2236G>A, identificada no exão 8, foi já referida anteriormente na literatura (Fanen *et al*, 1994). O polimorfismo 1934G>A (L516L) presente no exão 6, com uma frequência de 15%, foi identificado em duas famílias portuguesas, tendo sido já descrito em vários outros doentes (Fanen *et al*, 1994 e Fuchs *et al*, 1994). Uma revisão da literatura demonstra que as mutações descritas no gene da ALDP parecem distribuir-se ao longo de todo o gene, no entanto de forma desigual: 38% das mutações encontram-se nos domínios putativos transmembranares e 29% nos domínios putativos de ligação ao ATP (NBF) e 16% no exão 5 (1801-1802delAG); os restantes 17% estão distribuídos pela restante região codificadora (Smith *et al*, 1999). A demonstração que a maioria das mutações *missense* se encontra no domínio transmembranar e na região NBF revelam a importância destes domínios para a função da ALDP (Smith *et al*, 1999).

As duas mutações *missense* identificadas, 2236G>A (R617H) e 2281C>T (T632I) (trabalho 3), estão precisamente localizadas numa dessas regiões, o domínio putativo de ligação ao ATP.

A elevada frequência de mutações descritas no gene da ALDP, mais de 200 mutações diferentes, pode dever-se ao elevado conteúdo em C/G, que é cerca de 65% do total de nucleotídeos. Locais de CpG ou ilhotas CpG, são locais alvo de mutações porque o resíduo citosina através da acção da metilase origina 5-metilcitosina que por desaminação é facilmente convertida a timina (Barker *et al*, 1984). Cerca de 60 das 107 mutações *missense* identificadas no gene da ALDP ocorrem em locais CpG (Smith *et al*, 1999). As mutações identificadas neste estudo não são excepção (2281C>T e 2236G>A).

O trabalho 3 permitiu ainda confirmar o estatuto de hemizigotia em dez indivíduos, previamente diagnosticados bioquimicamente, excluir o estatuto de portadora em sete indivíduos da família K e confirmar este estatuto num indivíduo do sexo feminino da família M e dois da família K (ver apêndice 2). A família K dá-nos um exemplo da ausência de correlação fenótipo/genótipo uma vez que verificamos a presença de uma variedade de fenótipos que incluem uma forma de X-ALD juvenil com afectação cerebral, formas de AMN sem envolvimento do sistema nervoso central e ainda um doente assintomático em diferentes indivíduos com o mesmo genótipo: 2281C>T (ver apêndices 1 e 2). Este resultado é concordante com outros publicados, em que mutações que se traduzem na ausência completa de proteína, estão associadas a todos os fenótipos desde o mais grave ao mais ligeiro; a mutação mais comum, 1801-1802delAG, que leva á ausência de ALDP pode estar também associada a qualquer um dos fenótipos de X-ALD (Kemp *et al*, 1994); a mutação 2281C>T descrita neste estudo foi identificada em 6 membros de uma família com 3 fenótipos distintos.

No trabalho 3 fez-se também a análise da ALDP, por técnicas de *Western blot*, que revelou ausência de ALDP em cinco casos num total de nove doentes com X-ALD. A percentagem de doentes com ALDP não imunoreactiva (56%) não é muito diferente da descrita na literatura (67%) (Watkins *et al*, 1995).

Uma das mutações descritas 1296delG (doente III:8-M) introduz um códon STOP prematuro o que significa que poderá dar origem a uma ALDP de tamanho significativamente menor que o normal (335 em vez dos 745 aminoácidos). A análise de *western blot* efectuada não permitiu detectar esta proteína truncada. A revisão da literatura onde são descritas mutações *nonsense* ou *frameshift* que levam à terminação prematura da ALDP, revelou que em nenhum caso foi descrita a detecção de proteína truncada, o que sugere que a região carboxi-terminal da ALDP é importante para a estabilidade desta proteína. A mutação T632I causa uma alteração não “conservativa” e não parece alterar significativamente a estabilidade da proteína uma vez que esta é detectada em fibroblastos e linfoblastos de doentes com esta mutação, embora em quantidades reduzidas (ver apêndice 5). Este estudo revelou outras evidências para a ausência de correlação genótipo/expressão da ALDP/fenótipo, com a identificação de uma mutação do tipo *frameshift* 1296delG, sem ALDP detectável por imunofluorescência num doente com fenótipo ligeiro: *Addison only* (III:8-M); e a identificação de uma mutação *missense* 2281C>T com ALDP detectável por imunofluorescência num doente com a forma juvenil cerebral (IV:7-K).

Os estudos descritos no trabalho 4 indicam que a mutação 2281C>T, T632I na ALDP, não interfere com a ligação da ALDP a estruturas membranares, pois após extracção de proteínas totais com carbonato, a ALDP mantém-se no sedimento. Em estudos de co-localização com a catalase, uma proteína peroxissomal, verificou-se que a ALDP mutada (T632I) é correctamente enviada para o peroxissoma em fibroblastos destes doentes. Assim conclui-se que a região envolvendo a mutação T632I é uma das zonas potencialmente envolvidas na função da ALDP relacionada com o defeito bioquímico presente na X-ALD.

No trabalho 4 demonstra-se ainda que a imunocitofluorescência pode ser utilizada na detecção de portadoras para a X-ALD e diagnóstico pré-natal desta patologia, nas famílias onde a mutação presente no gene da X-ALD leva à ausência de ALDP. Nas heterozigotias pertencentes a estas famílias, detectam-se duas populações de células, com e sem imunoreactividade para a ALDP, devido à inactivação do cromossoma X, permitindo uma forma fácil e rápida de identificação e diagnóstico.

Com os estudos aqui descritos esperamos contribuir para a pesquisa eficiente e mais rápida de indivíduos potencialmente afectados com X-ALD, tendo ainda iniciado estudos genéticos em famílias com X-ALD portuguesas. Com a avaliação de uma nova aproximação na caracterização das portadoras e aplicação ao diagnóstico pré-natal desta patologia, esperamos no futuro, contribuir para a diminuição da incidência da adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X.

## **CAPÍTULO VI**

---

### ***PERSPECTIVAS FUTURAS***

A revisão da literatura relativa à adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X (X-ALD) revela que desde os anos 80 vários investigadores direccionaram os seus trabalhos para o estudo de genes/proteínas que afectam o metabolismo dos ácidos gordos de cadeia muito longa (AGCML); no entanto, estudos mais recentes revelaram que o gene responsável pela X-ALD (ABCD1), codifica uma proteína que não apresenta qualquer actividade de sintetase, tratando-se de uma proteína transportadora, da membrana do peroxissoma, a ALDP.

Na identificação da função da ALDP e sua forma de actuação, reside a chave de várias questões e desde a identificação do seu gene surgiram novas linhas de investigação da adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X:

↳ A identificação de novas mutações no gene da ALDP e estudos de expressão, poderão ajudar a localizar os domínios críticos para a função desta proteína, em especial as mutações que levam à síntese da ALDP mas em que esta está presumivelmente não funcional, pois nestes casos a mutação presente afecta resíduos aminoacídicos que estão provavelmente envolvidos na função da ALDP (Lachtermacher *et al*, 2000).

↳ A patogenicidade da X-ALD é ainda pouco conhecida. A intervenção de factores imunológicos está ainda por provar nomeadamente em relação à correlação que existe entre as lesões desmielinizantes e os locais de acumulação de AGCML e a reacção inflamatória associada (Ho *et al*, 1995). Será também importante estudar a expressão da ALDP nos órgãos que são mais afectados pela doença, principalmente o cérebro (Dubois-Dalcq *et al*, 1998).

↳ Será importante determinar a função e localização da ALDP e em especial a sua relação com a sintetase dos AGCML. Por analogia com outras proteínas do grupo ABC, há autores que especulam que a ALDP pode actuar de forma indirecta na função desta sintetase, facilitando a associação da sintetase com o peroxissoma, (Schwiebert *et al*, 1995 e Smith *et al*, 1999) ou ainda actuar transportando um substracto necessário para a  $\beta$ -oxidação dos AGCML (por exemplo CoA, ATP, ou outro metabolito necessário no peroxissoma) (Yamada *et al*, 1999 e Braiterman *et al*, 1999).

↪ Caracterizar as proteínas envolvidas na activação peroxissomal dos ácidos gordos (Gloeckner *et al*, 2000). A existência de várias sintetases dos AGCML parece evidente pois a proteína recentemente identificada (hSAGCML) não foi detectada em todas as células que degradam os ácidos gordos via  $\beta$ -oxidação (Berger *et al*, 1998; Watkins *et al*, 1999; Netik *et al*, 1999). Será ainda importante estabelecer a exacta localização peroxissomal da acil-CoA sintetase dos AGCML (Smith *et al*, 2000).

↪ O desenvolvimento e o estudo de modelos animais como o rato transgénico onde foi inactivado o gene da X-ALD (Forss-Petter *et al*, 1997, Lu *et al*, 1997 e Kobayashi *et al*, 1997) poderão num futuro próximo ajudar na análise da função celular da ALDP, no esclarecimento da patofisiologia da X-ALD e no desenvolvimento de novas aproximações terapêuticas.

## **CAPÍTULO VII**

---

### ***APÊNDICES***

<b>ÍNDICE</b>	<i>página</i>
1. Características clínicas dos doentes portugueses	108
2. Árvores familiares	109
3. Sequência nucleotídica (cDNA) e aminoacídica da ALDP humana	115
4. Alinhamento das sequências das proteínas ALDP, ALDRP, PMP70 e P70R	117
5. Modelo da ALDP	119
6. Lista de siglas e abreviaturas	120

## 1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS DOENTES PORTUGUESES

O despiste da adrenoleucodistrofia foi efectuado em indivíduos com suspeita clínica de X-ALD incluindo 26 com doença de Addison, do sexo masculino. Na tabela seguinte está resumida a informação clínica dos doentes diagnosticados. O material biológico dos doentes utilizados neste estudo foi enviado por diferentes unidades de vários hospitais do Norte, Centro e Sul País.

**Tabela 1** – Informação clínica dos 20 doentes com X-ALD portugueses.

DOENTE	SINTOMA INICIAL	IDADE DE INÍCIO	IDADE ACTUAL OU FALECIMENTO (f)	FENÓTIPO DESENVOLVIDO
IV:1-A	Demenciação	8 anos	18 anos	Forma juvenil
IV:2-A	Diminuição performance escolar	6 anos	f: 11 anos	Forma infantil
IV:1-B	Déficit visual e auditivo	7 anos	f: 11 anos	Forma infantil
IV:1-E	Hiperpigmentação	12 anos	18 anos	“Addison only”
IV:13-F	Insuficiência supra-renal	10 anos	17 anos	“Addison only”
IV:1-F	Problemas psicológicos	30 anos	40 anos	AMN
III:1-G	Insuficiência supra-renal	10 anos	f:16 anos	Forma juvenil
III:27-H	Insuficiência supra-renal	14 anos	f:36 anos	AMN cerebral
IV:1-H	Sem sintomas	-	7 anos	Assintomático
IV:4-H	Alterações neurológicas	4 anos	11 anos	Forma infantil
IV:3-I	Insuficiência supra-renal	4 anos	f:7 anos	Forma infantil
III:11-J	-	-	34 anos	AMN
II:10-K	Insuficiência supra-renal e Paraparesia espástica aos 39 anos	35 anos	53 anos	AMN
II:3-K	Neuropatia	30 anos	65 anos	AMN
II:7-K	Polineuropatia	30 anos	56 anos	AMN
IV:1-K	Sem sintomas	-	18 anos	Asintomático
IV:3-K	Insuficiência supra-renal	9 anos	11 anos	“Addison only”
IV:7-K	Demenciação com déficit supra-renal latente	6 anos	22 anos	Forma juvenil cerebral
III:8-M	Insuficiência supra-renal	5 anos	16 anos	“Addison only”
III:9-M	Perturbações da marcha desde 20 anos e Insuficiência supra-renal	14 anos	32 anos	AMN

A identificação dos doentes foi efectuada de acordo com a sua designação no texto e na árvore familiar respectiva (apêndice 2); (f) idade de falecimento; (-) desconhecida; FENÓTIPOS: Forma infantil ou juvenil – forma clássica de X-ALD com envolvimento cerebral; AMN- adrenomiélineuropatia; “Addison only”-apresenta apenas insuficiência das glândulas supra-renais; assintomático- sem qualquer alteração neurológica ou endocrinológica. As indicações clínicas de cada doente, como por exemplo a identificação das causas da doença das glândulas supra-renais, assim como a interpretação dos exames hospitalares, são da responsabilidade dos médicos assistentes de cada doente.

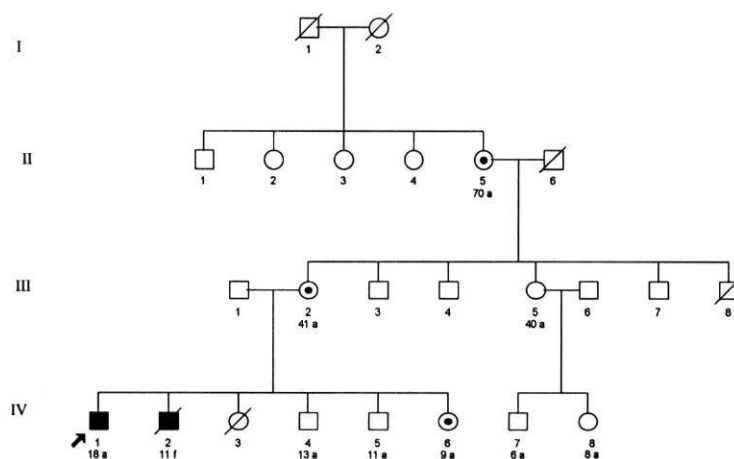
## 2. ÁRVORES FAMILIARES

As figuras seguintes contêm as informações relativas a cada uma das famílias de doentes com X-ALD incluídas neste estudo. O doseamento dos ácidos gordos de cadeia muito longa e posterior confirmação em fibroblastos de pele foi o critério utilizado para a classificação dos doentes e portadoras. A tabela 1 contém a legenda das figuras seguintes. Nos pedigrees de cada família incluiu-se os fenótipos apresentados pelos doentes à data do início deste estudo e a idade actual de cada um dos doentes e seus familiares. Os doentes são designados, por uma letra romana que indica a geração, um número que indica a posição na árvore e uma letra que indica a família a que pertencem. Os pedigrees das figuras seguintes foram desenhados segundo as regras da organização PSTF (*Pedigree Standardization Task Force*) e a publicação de Bennett *et al*, 1995.

**Tabela 1** - Legenda das figuras seguintes

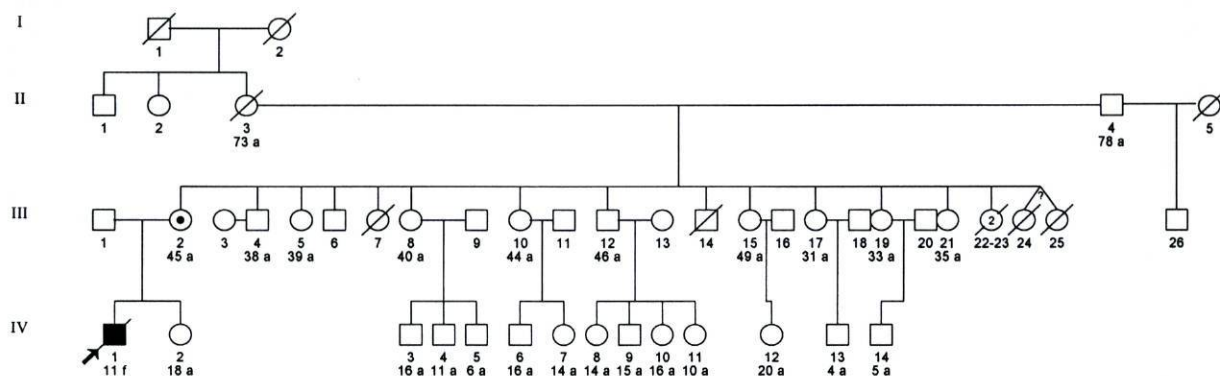
IDADES	FENÓTIPOS	
f (de falecimento)	□	Indivíduo normal
s (em semanas)	■	Indivíduo afectado
a (em anos)	○	Portadora

**FAMÍLIA A – Forma adolescente**



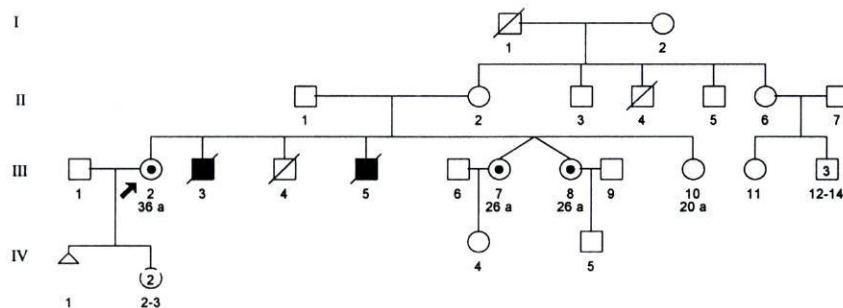
**Figura 1** - Árvore familiar do doente IV:1-A (trabalho 4); JB (trabalho 1); família I (trabalho 3).

**FAMÍLIA B – Forma infantil**



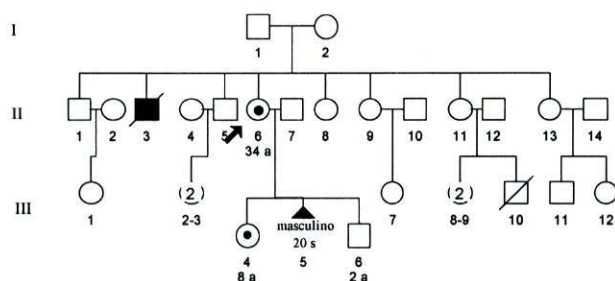
**Figura 2** - Árvore familiar do doente IV:1-B (trabalho 4); JA (trabalho 1); família II (trabalho 3).

**FAMÍLIA C - Heterozigotia**



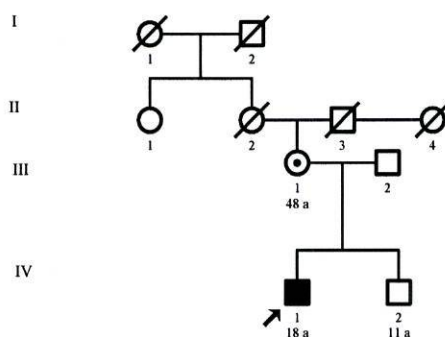
**Figura 3** - Árvore familiar do doente III:2-C (trabalho 4); MT (trabalho 1).

**FAMÍLIA D - Portadora**



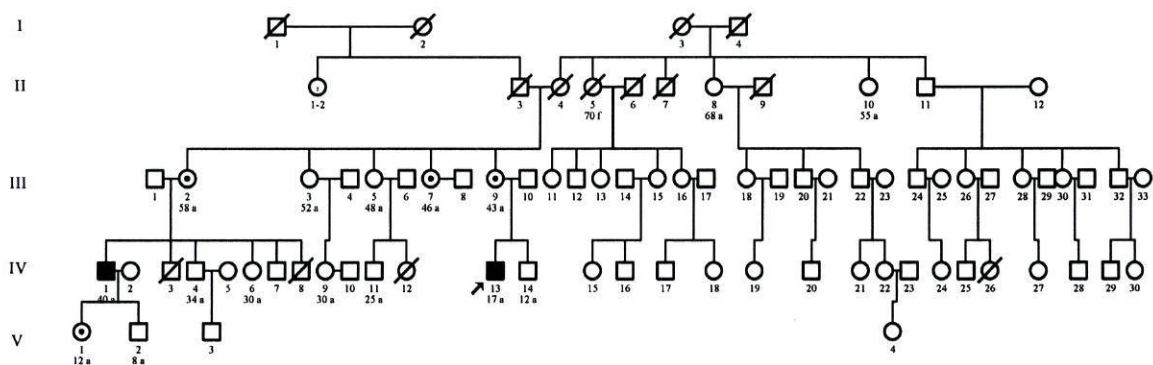
**Figura 4** - Árvore familiar do doente II:6-D (trabalho 4); AP (trabalho 1).

FAMÍLIA E – Addison only



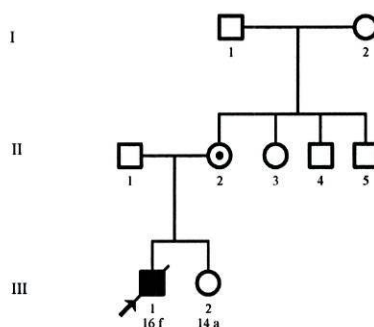
**Figura 5** - Árvore familiar do doente IV:1-E (trabalho 4); JF (trabalho 1); doente 20 (trabalho 2); família III (trabalho 3).

FAMÍLIA F – Addison only

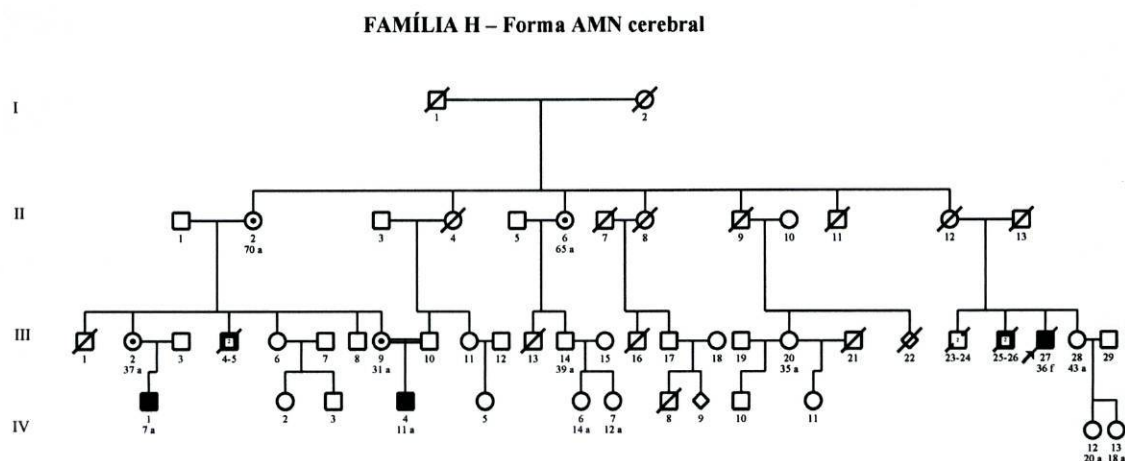


**Figura 6** - Árvore familiar do doente IV:13-F (trabalho 4); LM (trabalho 1); doente 21 (trabalho 2); família IV (trabalho 3).

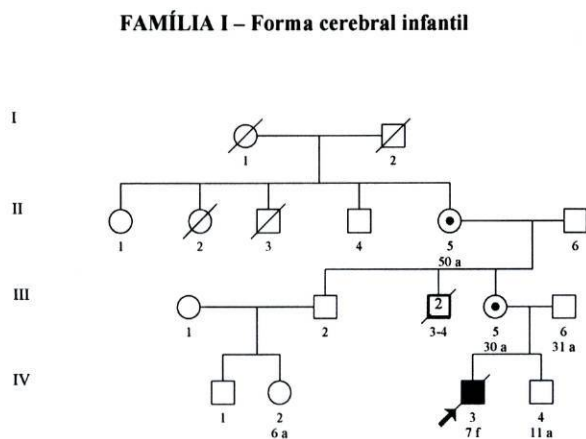
FAMÍLIA G – Forma cerebral juvenil



**Figura 7** - Árvore familiar do doente III:1-G (trabalho 4); MV (trabalho 1); doente 22 (trabalho 2).



**Figura 8** - Árvore familiar do doente III:27-H (trabalho 4); NP (trabalho 1); doente 23 (trabalho 2); família V (trabalho 3).



**Figura 9** - Árvore familiar do doente IV:3-I (trabalho 4); doente 24 (trabalho 2); família VI (trabalho 3).

FAMÍLIA J - Adrenomieloneuropatia

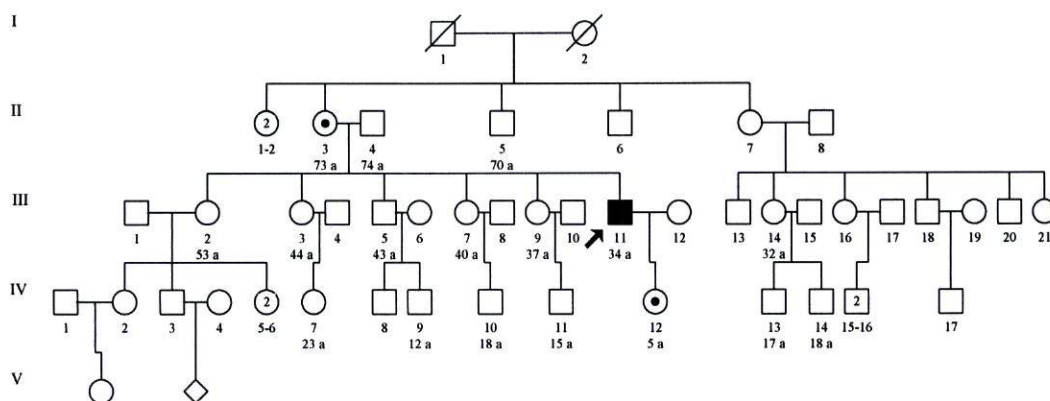


Figura 10 - Árvore familiar do doente III:11-J (trabalho 4); família VII (trabalho 3).

FAMÍLIA K - Adrenomieloneuropatia

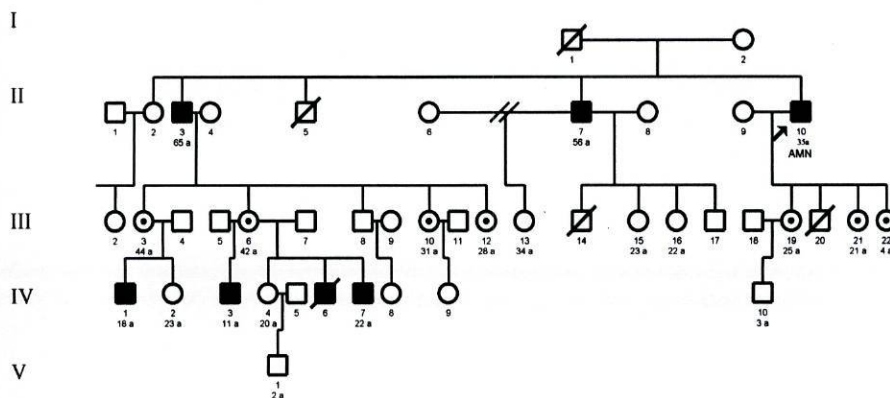
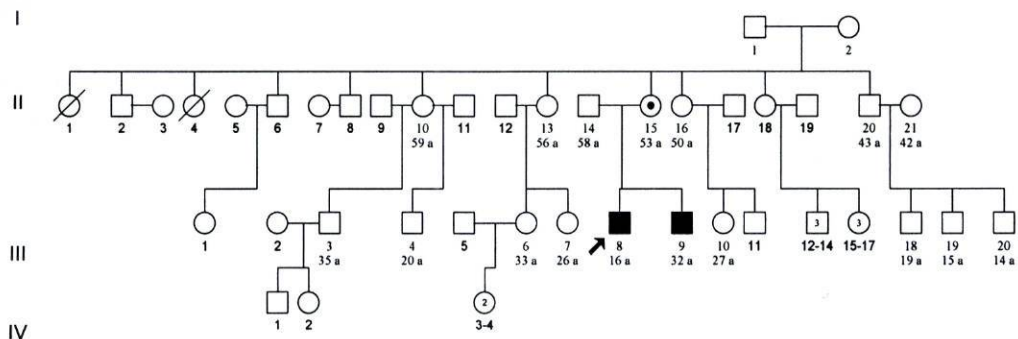


Figura 11 - Árvore familiar do doente II:10-K (trabalho 4); família VIII (trabalho 3).

FAMÍLIA M – Addison only

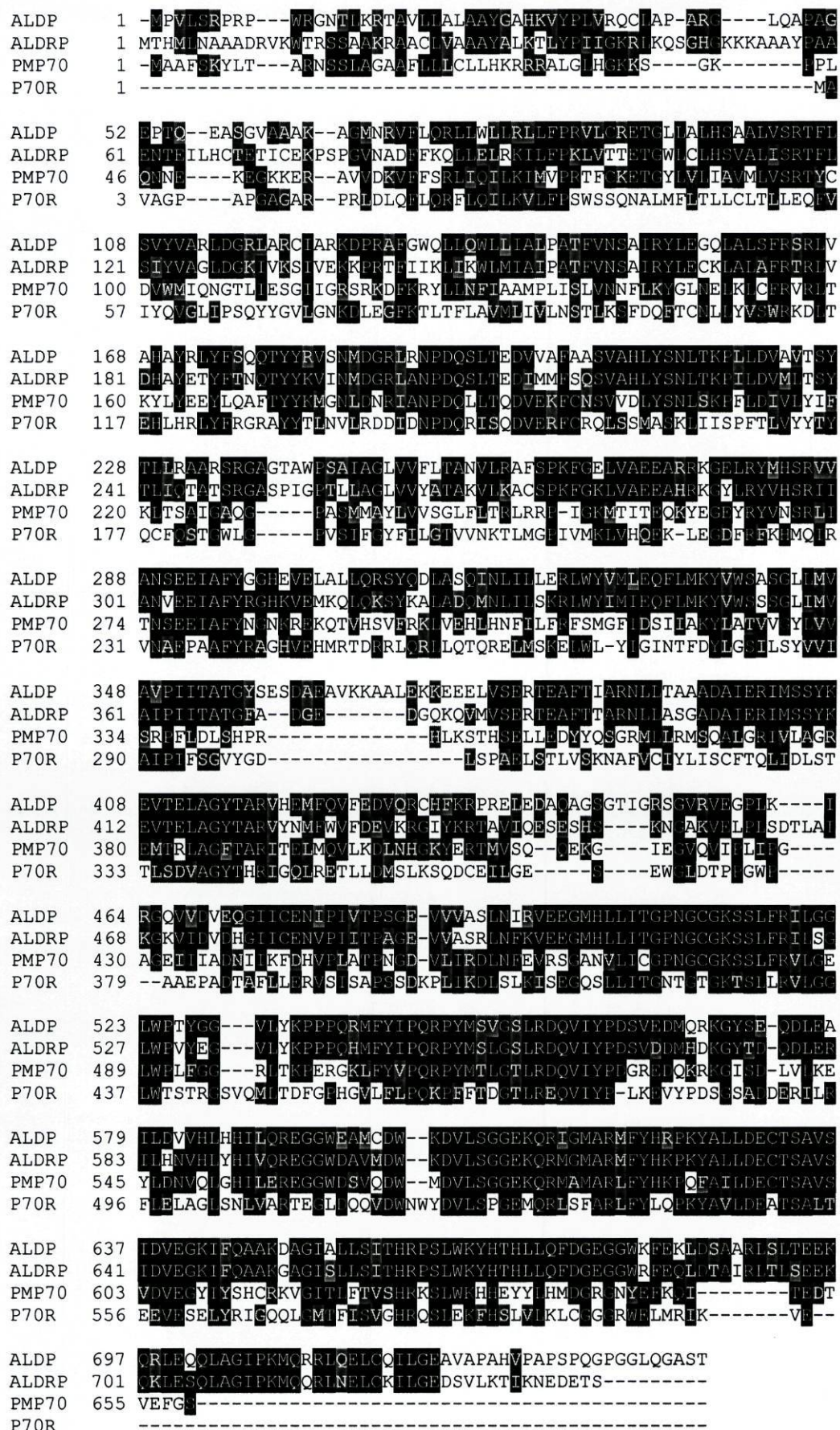


**Figura 12** - Árvore familiar do doente III:8-M (trabalho 4); família IX (trabalho 3).

### **3. SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA (CDNA) E AMINOACÍDICA DA ALDP HUMANA**

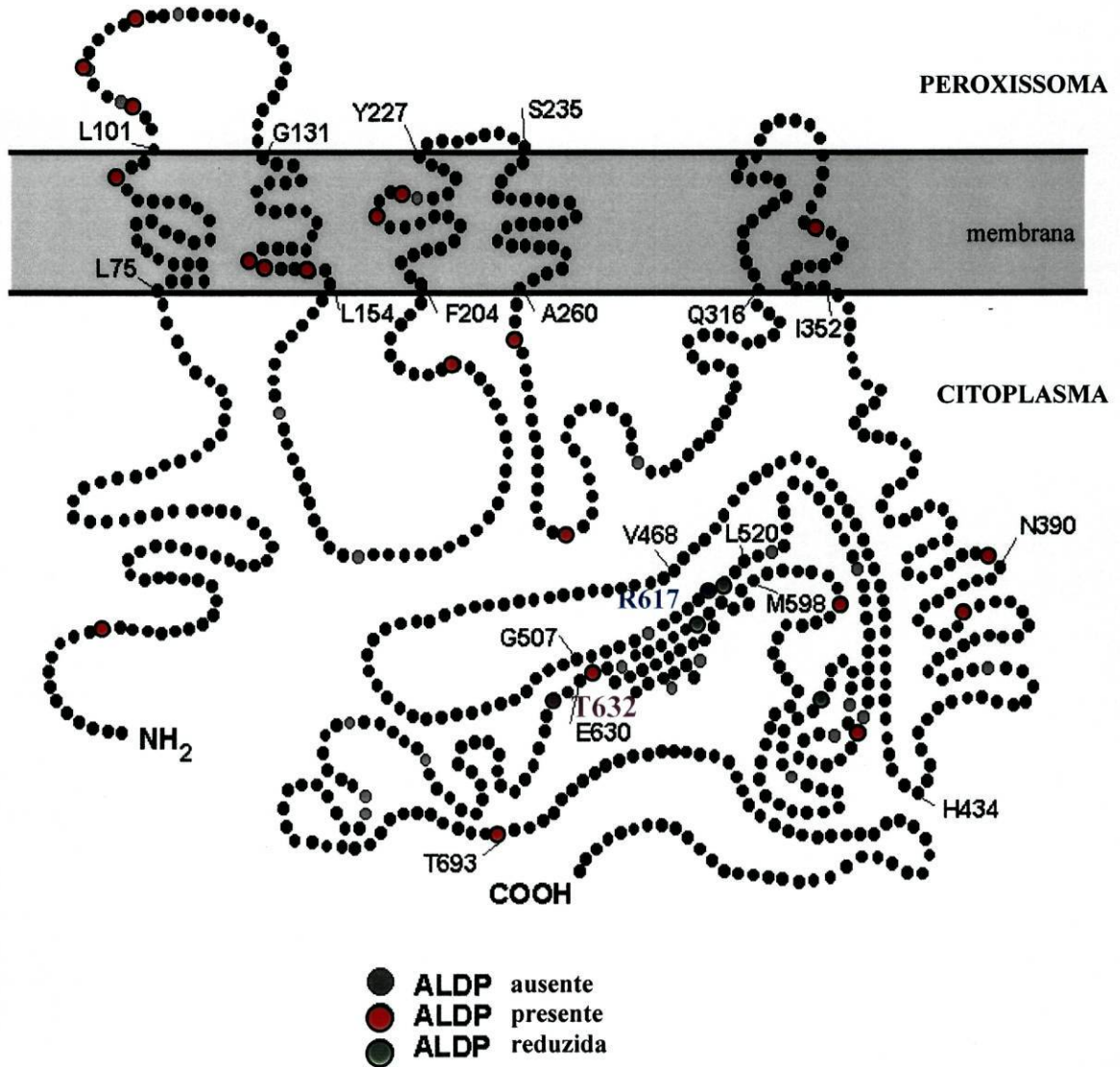
1 ATG CCG GTG CTC TCC AGG CCC CGG CCC TGG CGG GGG AAC ACG CTG AAG CGC ACG GCC GTG  
 1 M P V L S R P R P W R G N T L K R T A V  
 61 CTC CTG GCC CTC GCG GCC TAT GGA GCC CAC AAA GTC TAC CCC TTG GTG CGC CAG TGC CTG  
 21 L L A L A Y G A H K V Y P L V R Q C G L  
 121 GCC CCG GCC AGG GGT CTT CAG GCG CCC GCC GGG GAG CCC ACG CAG GAG GCC TCC GGG GTC  
 41 A P A R G L Q A P A G E P T Q E A S G G V  
 181 GCG GCG GCC AAA GCT GGC ATG AAC CGG GTA TTC CTG CAG CGG CTC CTG TGG CTC CTG CGG  
 61 A A A K A G M N R V F L Q R L L W L L R  
 241 CTG CTG TTC CCC CGG GTC CTG TGC CGG GAG ACG GGG CTG CTG GCC CTG CAC TCG GCC GCC  
 81 L L F P R V L C R E T G L A L H S A A  
 301 TTG GTG AGC CGC ACC TTC CTG TCG GTG TAT GTG GCC CGC CTG GAC GGA AGG CTG GCC CGC  
 101 L V S R T F L S V Y V A R L D G R L A R  
 361 TGC ATC GTC CGC AAG GAC CCG CGG GCT TTT GGC TGG CAG CTG CTG CAG TGG CTC CTC ATC  
 121 C I V R K D P R A F G W Q L L Q W L L I  
 421 GCC CTC CCT GCT ACC TTC GTC AAC AGT GCC ATC CGT TAC CTG GAG GGC CAA CTG GCC CTG  
 141 A L P A T F V N S A I R Y L E G Q L A L  
 481 TCG TTC CCG AGC CGT CTG GTG GCC CAC GCC TAC CGC CTC TAC TTC TCC CAG CAG ACC TAC  
 161 S F R S R L V A H A Y R L Y F S Q R T Y  
 541 TAC CGG GTC AGC AAC ATG GAC GGG CGG CTT CGC AAC CCT GAC CAG TCT CTG ACG GAG GAC  
 181 Y R V S N M D G R L R N P D Q S L T E D  
 601 GTG GTG GCC TTT GCG GCC TCT GTG GCC CAC CTC TAC TCC AAC CTG ACC AAG CCA CTC CTG  
 201 V V A F A A S V A H L Y S N L T K P L L  
 661 GAC GTG GCT GTG ACT TCC TAC ACC CTG CTT CGG GCG GCC CCG TCC CGT GGA GCC GGC ACA  
 221 D V A V T S Y T L L R A A R S R G A G T  
 721 GCC TGG CCC TCG GCC ATC GCC GGC CTC GTG GTG TTC CTC ACG GCC AAC GTG CTG CGG GCC  
 241 A W P S A I A G L V V F L T A N V L R A  
 781 TTC TCG CCC AAG TTC GGG GAG CTG GTG GCA GAG GAG GCG CGG CGG AAG GGG GAG CTG CGC  
 261 F S P K F G E L V A E E A R R K G E L R  
 841 TAC ATG CAC TCG CGT GTG GTG GCC AAC TCG GAG GAG ATC GCC TTC TAT GGG GGC CAT GAG  
 281 Y M H S R V V A N S E E I A F Y G G H E  
 901 GTG GAG CTG GCC CTG CTA CAG CGC TCC TAC CAG GAC CTG GCC TCG CAG ATC AAC CTC ATC  
 301 V E L A L L Q R S Y Q D L A S Q I N L I  
 961 CTT CTG GAA CGC CTG TGG TAT GTT ATG CTG GAG CAG TTC CTC ATG AAG TAT GTG TGG AGC  
 321 L L E R L W Y V M L E Q F L M K Y V W S  
 1021 GCC TCG GGC CTG CTC ATG GTG GCT GTC CCC ATC ATC ACT GCC ACT GGC TAC TCA GAG TCA  
 341 A S G L L M V A V P I I T A T G Y S E S  
 1081 GAT GCA GAG GCC GTG AAG AAG GCA GCC TTG GAA AAG AAG GAG GAG GAG CTG GTG AGC GAG  
 361 D A E A V K K A A L E K K E E L V S E  
 1141 CGC ACA GAA GCC TTC ACT ATT GCC CGC AAC CTG ACA CGC GCT GCA GAT GCC ATT GAG  
 381 R T E A F T I A R N L L T A A A D A I E  
 1201 CGG ATC ATG TCG TCG TAC AAG GAG GTG ACG GAG CTG GCT GGC TAC ACA GCC CGG GTG CAC  
 401 R I M S S Y K E V T E L A G Y T A R V H  
 1261 GAG ATG TTC CAG GTA TTT GAA GAT GTT CAG CGC TGT CAC TTC AAG AGG CCC AGG GAG CTA  
 421 E M F Q V F E D V Q R C H F K R P R E L  
 1321 GAG GAC GCT CAG GCG GGG TCT GGG ACC ATA GGC CGG TCT GGT GTG CGT GTG GAG GGC CCC  
 441 E D A Q A G S G T I G R S G V R V E G P  
 1381 CTG AAG ATC CGA GGC CAG GTG GTG GAT GTG GAA CAG GGG ATC ATC TGC GAG AAC ATC CCC  
 461 L K I R G Q V V D V E Q G I I C E N I P  
 1441 ATC GTC ACG CCC TCA GGA GAG GTG GTG GTG GCC AGC CTC AAC ATC AGG GTG GAG GAA GGC  
 481 I V T P S G E V V V A S L N I R V E E G  
 1501 ATG CAT CTG CTC ATC ACA GGC CCC AAT GGC TGC GGC AAG AGC TCC CTG TTC CGG ATC CTG  
 501 M H L L I T G P N G C G K S S L F R I L  
 1561 GGT GGG CTC TGG CCC ACG TAC GGT GGT GTG CTC TAC AAG CCC CCA CCC CAG CGC ATG TTC  
 521 G G L W P T Y G G V L Y K P P P Q R M F  
 1621 TAC ATC CCG CAG AGG CCC TAC ATG TCT GTG GGC TCC CTG CGT GAC CAG GTG ATC TAC CCG  
 541 Y I P Q R P Y M S V G S L R D Q V I Y P  
 1681 GAC TCA GTG GAG GAC ATG CAA AGG AAG GGC TAC TCG GAG CAG GAC CTG GAA GCC ATC CTG  
 561 D S V E D M Q R K G Y S E Q D L E A I L  
 1741 GAC GTC GTG CAC CTG CAC CAC ATC CTG CAG CGG GAG GGA GGT TGG GAG GCT ATG TGT GAC  
 581 D V V H L H H I L Q R E G G W E A M C D  
 1801 TGG AAG GAC GTC CTG TCG GGT GGC GAG AAG CAG AGA ATC GGC ATG GCC CGC ATG TTC TAC  
 601 W K D V L S G G E K Q R I G M A R M F Y  
 1861 CAC AGG CCC AAG TAC GCC CTC CTG GAT GAA TGC ACC AGC GCC GTG AGC ATC GAC GTG GAA  
 621 H R P K Y A L L D E C T S A V S I D V E  
 1921 GGC AAG ATC TTC CAG GCG GCC AAG GAC GCG GGC ATT GCC CTG CTC TCC ATC ACC CAC CGG  
 641 G K I F Q A A K D A G I A L L S I T H R  
 1981 CCC TCC CTG TGG AAA TAC CAC ACA CAC TTG CTA CAG TTC GAT GGG GAG GGC GGC TGG AAG  
 661 P S L W K Y H T H L L Q F D G E G G W K  
 2041 TTC GAG AAG CTG GAC TCA GCT GCC CGC CTG AGC CTG ACG GAG GAG AAG CAG CGG CTG GAG  
 681 F E K L D S A A R L S L T E E K Q R L E  
 2101 CAG CAG CTG GCG GGC ATT CCC AAG ATG CAG CGG CGC CTC CAG GAG CTC TGC CAG ATC CTG  
 701 Q Q L A G I P K M Q R R L Q E L C Q I L  
 2161 GGC GAG GCC GTG GCC CCA GCG CAT GTG CCG GCA CCT AGC CCG CAA GGC CCT GGT GGC CTC  
 721 G E A V A P A H V P A P S P Q G P G L  
 2221 CAG GGT GCC TCC ACC TGA  
 741 Q G A S T \*

#### **4. ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DAS PROTEÍNAS ALDP, ALDRP, PMP70 E P70R**



**Figura 1**-Alinhamento das seqüências proteicas das proteínas humanas pertencentes à família de transportadores ABC peroxissomais. De cima para baixo ALDP, ALDRP, PMP70 e P70R. O alinhamento foi efectuado no programa ClustalW (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalW>).

## 5. MODELO DA ALDP



**Figura 1** – Modelo da ALDP, adaptada de [www.x-ald.nl](http://www.x-ald.nl) dos autores J.Berger e S.Kemp. onde estão representados os segmentos transmembranares, localização dos domínios importantes e algumas mutações, incluindo-se as mutações *missense* identificadas em famílias portuguesas **R617** com ALDP ausente e **T632** com ALDP presente em quantidades reduzidas.

## 6. LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABC	Família de proteínas que ligam ATP (ATP binding cassette)
4PBA	4-fenilbutirato (ácido 4-fenil butírico)
AGCL	Ácidos gordos de cadeia longa
AGCML	Ácidos gordos de cadeia muito longa
ALDP	Proteína codificada pelo gene responsável pela X-ALD
ALDRP	Proteína homóloga à ALDP
AMN	Adrenomieloneuropatia
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro de bovino
C22:0	Ácido docosanoico (beênico)
C24:0	Ácido tetracosanoico (lignocérico)
C26:0	Ácido hexacosanoico (cerótico)
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementar
CoA	Coenzima A
DA	Doença de Addison
DBP	Doenças da biogénese do peroxissoma
DHAP-AT	Dihidroxiacetona fosfato-aciltransferase
EBV	Vírus <i>Epstein Barr</i>
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
FITC	Fluoresceína isotiocianato
GAM-AP	Anticorpo <i>goat anti-mouse</i> ligado à fosfatase alcalina
GAM-B	Anticorpo <i>goat anti-mouse</i> ligado à biotina
GAR-AP	Anticorpo <i>goat anti-rabbit</i> ligado à fosfatase alcalina
GAR-B	Anticorpo <i>goat anti-rabbit</i> ligado à biotina
GTE	Glicerol trierucicato
GTO	Glicerol trioleato
hSAGCML	Sintetase dos ácidos gordos de cadeia muito longa humana
IRM	Imagem de ressonância magnética
NaPa	Fenilacetato de sódio
NBF	Local de ligação de nucleotídeo (ATP)
P70R	Proteína semelhante à PMP70 de 69 kDa
PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato pH 7.4
PCR	Reacção em cadeia da polimerase
PEX	Genes que codificam proteínas envolvidas na biogénese peroxissomal (peroxinas)
Pexp	Proteínas codificadas pelos genes PEX
PMP	Proteína da membrana do peroxissoma
PMP70	Proteína da membrana do peroxissoma de 70 kDa
PPRE	Sequências de resposta a proliferadores de peroxissomas
PTS	Sequências de importe para o peroxissoma
PXA 1 e 2	Proteínas de levedura pertencentes à família ABC
R/GCP	Genes dos pigmentos das cores vermelho/verde
SKL	Serina-lisina-leucina (sinal envolvido no importe de proteínas para o peroxissoma)
SNC	Sistema nervoso central
SSCP	Análise de polimorfismos de conformação de cadeia simples
SZ	Síndrome de Zellweger
TMO	Transplante de medula óssea
TNF	Factor de necrose tumoral
UTR	Região com sequência não traduzida
WA e WB	Regiões conservadas <i>Walker A e Walker B</i>
X-ALD	Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X

Os aminoácidos serão citados pelo código da uma letra.

A numeração das mutações descritas neste estudo está de acordo com a descrita por Mosser *et al*, 1993, na qual a adenosina do codão iniciador (ATG-metionina) é o nucleotídeo número 387 e não o número +1 como descrito por outros grupos (apêndice 3).

## **CAPÍTULO VIII**

---

### ***BIBLIOGRAFIA***

## A

- Antonenkov V.D., van Veldhoven P.P., Waelkens E., Mannaerts G.P., (1999) Comparison of the stability and substrate specificity of purified peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolases A and B from rat liver. *Biochim Biophys Acta.* 25;1437(2):136-41.
- Arnheim N. (1992). Polymerase chain reaction strategy. *Annu Rev Biochem.* 61, 131-56.
- Arnold D., Driscoll J., Androlewicz M., Hughes E., Cresswell P., Spies T. (1992). Proteasome subunits encoded in the MHC are not generally required for the processing of peptides bound by MHC class I molecules. *Nature.* 360, 171-74.
- Aubourg P., Adamsbaum C., Lavallard-Rousseau M.-C., Rocchiccioli F., Cartier N., Jambaque I., Jakobezak C., Lemaitre A., Boureau F., Wolf C., Bougneres P.-F. (1993b). A two-year trial of oleic and erucic acids ("Lorenzo's oil") as treatment for adrenomyeloneuropathy. *New Eng J Med.* 329, 745-52.
- Aubourg P., Blanche S., Jambaque I., Rocchiccioli F., Kalifa G., Naud-Saudreau C., Rolland M.-O., Debre M., Chaussain J.-L., Griscelli C., Fischer A., Bougneres P.-F. (1990a). Reversal of early neurologic and neuroradiologic manifestations of X-linked adrenoleukodystrophy by bone marrow transplantation. *New Eng J Med.* 322, 1860-66.
- Aubourg P., Dubois-Dalcq M. (2000). X-linked adrenoleukodystrophy enigma: how does the ALD peroxisomal transporter mutation affect CNS glia? *Glia.* 15;29(2):186-90.
- Aubourg P., Feil R., Guidoux S., Kaplan J.-C., Moser H.W., Kahn A., Mandel J.-L. (1990b). The red-green visual pigment gene region in adrenoleukodystrophy. *Am J Hum Genet.* 46, 459-69.

- Aubourg P., Mosser J., Douar A.M., Sarde C.O., Lopez J., Mandel J.L. (1993a). Adrenoleukodystrophy gene: Unexpected homology to a protein involved in peroxisome biogenesis. *Biochimie*. 75, 293-302.
- Aubourg P., Sack G.H., Meyers D.A., Lease J.J., Moser H.W. (1987). Linkage of adrenoleukodystrophy to a polymorphic DNA probe. *Ann Neurology*. 21, 349-52.
- Aubourg P., Scotto J., Rocchiccioli F., Feldman-Pautrat D., Robain O. (1986). Neonatal adrenoleukodystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 49, 77.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (eds) *Current Protocols in Molecular Biology*. Jonh Wiley & Sons, Inc. (1997). USA Capítulo 10 (Apêndices A.3. e E.1).

**B**

- Bakos J.T., Goen P., Ogden A., Brown F.R., Karaviti L.P. (1995). Adrenoleukodystrophy: A link between adrenal insufficiency and school performance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 80, 2869-72.
- Barceló A., Girós M., Albiach V.J., Vaquerizo J., Pampols T., Estivill X. (1996). Identification of two new nonsense mutations (Q311X and W326X) in Exon 2 of the adrenoleukodystrophy (ALD) gene. *Hum Mutat*. 8, 286-87.
- Barceló A., Girós M., Sarde C.O., Martínez-Bermejo A., Mandel J.L., Pàmpols T., Estivill X. (1994). Identification of a new frameshift mutation (1801delAG) in the ALD gene. *Human Molecular Genetics*. 3, 1889-90.
- Barker D., Schafer M., White R. (1984). Restriction sites containing CpG show a higher frequency of polymorphism in human DNA. *Cell* .36(1):131-8.
- Beck S., Kelly A., Radley E., Khurshid F., Alderton R.P., Trowsdale J. (1992). DNA sequence analysis of 66 kb of the human MHC class II region encoding a cluster of genes for antigen processing. *J Mol Biol*. 228, 433-41.

- Bennett R.L., Steinhaus K.A., Uhrich S.B., O'Sullivan C.K., Resta R.G., Lochner-Doyle D., Markel D.S., Vincent V., Hamanishi J. (1995). Recommendations for standardized human pedigree nomenclature. *Am J Hum Genet.* 56, 745-52.
- Berger J., Molzer B., Faé I., Bernheimer H. (1994). X-linked adrenoleukodystrophy (ALD): A novel mutation of the ALD gene in 6 members of a family presenting with 5 different phenotypes. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 205, 1638-43.
- Berger J., Truppe C., Neumann H., Forss-Petter S. (1998). cDNA cloning and mRNA distribution of a mouse very long-chain acyl-CoA synthetase. *FEBS Lett.* 425(2): 305-9.
- Berger P., Harwood D.C., Petterson H. (1992). *Normal and abnormal myelination.* In: *Neuroradiology, a book from NICER.* 275 London. Merit Communications.
- Bezman L., Moser H.W. (1998). Incidence of X-linked adrenoleukodystrophy and the relative frequency of its phenotypes. *Am J Med Genet.* 76(5):415-9.
- Blau H., Khavari P. (1997). Gene therapy: progress, problems, prospects. *Nat Med.* 3, 612-13.
- Blaw M.E. (1970). *Melanodermic type leucodystrophy (adreno-leukodystrophy).* In: P.J. Vinken G.W. Bruyn (eds.), *Handbook of Clinical Neurology.*
- Boehm C.D., Cutting G.R., Lachtermacher M.B., Moser H.W., Chong S.S. (1999) Accurate DNA-based diagnostic and carrier testing for X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol Genet Metab.* 66(2), 128-36.
- Boué J., Oberle I., Heilig R., Mandel J.L., Moser A.B., Moser H.W., Larsen J.W., Jr. Dumez Y., Boue A. (1985). First trimester prenatal diagnosis of adrenoleukodystrophy by determination of very long chain fatty acid levels and by linkage analysis to a DNA probe. *Hum Genet.* 69, 272-74.

- Bourre J.-M., Daudu O., Baumann N. (1976). Nervonic acid biosynthesis by erucyl-CoA elongation in normal and quaking mouse brain microsomes. Elongation of other unsaturated fatty acyl-CoAs (mono and polyunsaturated). *Biochim Biophys Acta*. 424, 1-6.
- Braiterman L.T., Watkins P.A., Moser A.B., Smith K.D. (1999). Peroxisomal very long chain fatty acid beta-oxidation activity is determined by the level of adrenoleukodystrophy protein (ALDP) expression. *Mol Genet Metab*. 66(2): 91-99.
- Braun A., Ambach H., Kammerer S., Rolinski B., Stöckler S., Rabl W., Gärtner J., Zierz S., Roscher A.A. (1995). Mutations in the gene for X-linked adrenoleukodystrophy in patients with different clinical phenotypes. *American Journal of Human Genetics*. 56, 854-61.
- Budka H., Molzer B., Bernheimer H., Lassmann H., Pilz P., Toijl K. (1981). Clinical morphological and beurochemical findings in adrenoleukodystrophy and its variants. In: T. Yonezawa (ed.), *International Symposium on the Leucodystrophy and Allied diseases*. 209-24. Kyoto.
- Budka H., Sluga E., Heiss W.D. (1976). Spastic paraplegia associated with Addison's disease: adult variant of adrenoleukodystrophy. *J Neurol*. 213, 237-50.

## C

- Cartier N., Lopez J., Moullier P., Rocchiccioli F., Rolland M-O., Jorge P., Mosser J., Mandel J-L., Bougnères P-F., Danos O., Aubourg P. (1995). Retroviral-mediated gene transfer corrects very-long-chain fatty acid metabolism in adrenoleukodystrophy fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 92, 1674-78.
- Cartier N., Miclea J.M., Chomienne C., Bougneres P.F., Aubourg, P. (1996). Gene therapy of adrenoleukodystrophy. *Arch Pediatr*. 3, S77-81.

Cartier N., Sarde C., Douar AM., Mosser J., Mandel J.L., Aubourg P. (1993). Abnormal messenger RNA expression and a missense mutation in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet.* 2, 1949-51.

Cerdan S., Künnecke B., Dölle A., Seelig J. (1988). In situ metabolism of long medium chain dicarboxylic acids in the liver of intact rats as detected by  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR. *J Biol Chem.* 263, 11664-74.

## D

Davis L.E., Snyder R.D., Orth D.N., Nicholson W.E., Kornfeld M., Scelinger D.F. (1979). Adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy associated with partial adrenal insufficiency in three generations of a kindred. *Am J Med.* 66, 342-47.

Dean M., Santis G. (1994). Heterogeneity in the severity of cystic fibrosis and the role of CFTR gene mutations. *Human Genetics.* 93, 364-68.

Diczfalusy U., Alexson S.E.H. (1990). Identification of metabolites from peroxisomal  $\beta$ -oxidation of prostaglandins. *J Lipid Res.* 31, 307-14.

Dodd A., Rowland S.A., Hawkes S.L., Kennedy M.A., Love D.R. (1997). Mutations in the adrenoleukodystrophy gene. *Hum Mutat.* 9(6):500-11.

Doerflinger L., Miclea JM., Lopez J., Chomienne C., Bougneres P., Aubourg P., Cartier N. (1998). Retroviral transfer and long-term expression of the adrenoleukodystrophy gene in human CD34+ cells. *Hum Gene Ther.* 9(7): 1025-36.

Dubois-Dalcq M., Feigenbaum V., Aubourg P. (1999). The Neurobiology of X-linked Adrenoleukodystrophy (ALD). A demyelinating peroxisomal disorder. *Trends in Neurosc.* 22(1):4-12.

**E**

Eichler E., Budarf M., Rocchi M., Deaven L., Doggett N., Baldini A., Nelson D., Mohrenweiser H. (1997). Interchromosomal duplications of the adrenoleukodystrophy locus: a phenomenon of pericentromeric plasticity. *Hum Mol Genet.* 6(7): 990-1002.

Eichler E., Lu F., Shen Y., Antonacci R., Jurecic V., Doggett N., Moyzis R., Baldini A., Gibbs R., Nelson D. (1996). Duplication of a gene-rich cluster between 16p11.1 and Xq28: a novel pericentromeric-directed mechanism for paralogous genome evolution. *Hum Mol Genet.* 5, 899-12.

**F**

Fanconi V.A., Prader A., Isler W., Luthy F., Siebenmann R. (1963). Morbus Addison mit Hirnsklerose im Kindesalter-Ein hereditäres Syndrom mit X-chromosomaler Vererbung? *Helv Paed Acta.* 18, 480-82.

Fanen P., Guidoux S., Sarde C.-O., Douar A.M., Mosser J., Mandel J.-L., Goossens M., Aubourg P. (1994). Identification of mutations in the putative ATP-binding domain of the adrenoleukodystrophy gene. *Journal Clinical Investigation.* 94, 516-20.

Feigenbaum V., Lombard-Platet G., Guidoux S., Sarde C.-O., Mandel J.-L., Aubourg P. (1996). Mutational and Protein Analysis of Patients and Heterozygous Women with X-linked Adrenoleukodystrophy. *Am J Hum Genet.* 58, 1135-44.

Feil R., Aubourg P., Mosser J., Douar A.M., Le Paslier D., Philippe C., Mandel J.L. (1991). Adrenoleukodystrophy: a complex chromosomal rearrangement in the Xq28 red/green pigment region indicates two possible gene localizations. *Am J Hum Genet.* 49, 1361-71.

Flavigny E., Sanhaj A., Aubourg P., Cartier N. (1999). Retroviral-mediated adrenoleukodystrophy-related gene transfer corrects very long chain fatty acid metabolism in adrenoleukodystrophy fibroblasts: implications for therapy. *FEBS Lett.* 448(2-3):261-4.

Forss-Petter S., Werner H., Berger J., Lassmann H., Molzer B., Schwab M.H., Bernheimer H., Zimmermann F., Nave K.A. (1997). Targeted inactivation of the X-linked adrenoleukodystrophy gene in mice. *J Neurosci Res.* 50(5): 829-43.

Fouquet F., Zhou J.M., Ralston E., Murray K., Troalen F., Magal E., Robain O., Dubois-Dalcq M., Aubourg P. (1997). Expression of the adrenoleukodystrophy protein in the human and mouse central nervous system. *Neurobiol Dis.* 3(4): 271-85.

Friedmann T. (1997). Overcoming the obstacles to gene therapy. *Sci Am.* 276, 96-101.

Fuchs S., Sarde C.O., Wedemann H., Schwinger E., Mandel J.-L., Gal A. (1994). Missense mutations are frequent in the gene for X-chromosomal adrenoleukodystrophy (ALD). *Hum Mol Genet.* 3, 1903-5.

## G

Gartner J., Obie C., Moser H., Valle D. (1992). A polymorphic synonymous mutations (K54K) in the human 70 kD peroxisomal membrane protein gene (PMP1). *Hum Mol Genet.* 1(8): 654.

Glavac D., Dean M. (1993). Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Human Mutation.* 2, 404-14.

Gloeckner C.J., Mayerhofer P.U., Landgraf P., Muntau A.C., Holzinger A., Gerber J.K., Kammerer S., Adamski J., Roscher A.A. (2000). Human adrenoleukodystrophy protein and related peroxisomal ABC transporters interact with the peroxisomal assembly protein PEX19p. *Biochem Biophys Res Commun.* 29;271(1):144-50.

Goldfischer S., Collins J., Rapin I., Coltoff-Schiller B., Chang C., Nigro M., Black V., Javitt N., Moser H.W. (1985). Peroxisomal defects in neonatal onset and X-linked adrenoleukodystrophies. *Science.* 227, 67-87.

- Gomez-Lira M., Perusi C., Mottes M., Pignatti P.F., Uziel G., Rizzuto N., Salviati A. (1999). Two novel frameshift mutations in the adrenoleukodystrophy gene in Italian patients. *J Neurol Sci.* 165(1):62-5.
- Griffin D.E., Moser H.W., Mendoza Q., Moench T., O'Toole S., Moser A.B. (1985). Identification of the inflammatory cells in the nervous system of patients with adrenoleukodystrophy. *Ann Neurol.* 18, 660-64.
- Griffin J.W., Goren E., Schaumburg H.H., Engel W.K., Loriaux L. (1977). Adrenomyeloneuropathy: a probable variant of adrenoleukodystrophy. I. Clinical and endocrinologic aspects. *Neurology.* 27, 1107-13.

**H**

- Hashimi M., Stanley W., Singh I. (1986). Lignoceryl-CoASH ligase: enzyme defect in fatty acid  $\beta$ -oxidation system in X-linked childhood adrenoleukodystrophy. *FEBS Lett.* 196, 247-50.
- Hashimoto T. (1999). Peroxisomal beta-oxidation enzymes. *Neurochem Res.* 24(4):551-63.
- Heffungs W., Hameisier H., Ropers H.H. (1980). Addison disease and cerebral sclerosis in an apparently heterozygous girl: Evidence of inactivation of the adrenoleukodystrophy locus. *Clin Genet.* 18, 184-88.
- Hettema E.H., van Roermund C.W., Distel B., van den Berg M., Vilela C., Rodrigues-Pousada C., Wanders R.J., Tabak H.F. (1996). The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 15(15):3813-22.
- Higgins C.F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol.* 8, 67-113.
- Ho J.K., Moser H., Kishimoto Y., Hamilton J.A. (1995). Interactions of a Very Long Chain Fatty Acid with Model Membranes Serum Albumin. *J Clin Invest.* 96, 1455-63.

- Hoefler G., Forstner M., McGuinness C., Hulla W., Hiden M., Krisper P., Kenner L., Ried T., Lengauer C., Zechner R., Moser H.W., Chen G.L. (1994). cDNA cloning of the human peroxisomal enoyl-CoA hydratase: 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional enzyme and localization to chromosome 3q26.3-3q28: A free left Alu arm is inserted in the 3' noncoding region. *Genomics*. 19, 60-7.
- Holmberg B.H., Hagg E., Duchek M., Hagenfeldt L. (1992). Screening of patients with hereditary spastic paraparesis and Addison's disease for adrenoleukodystrophy/adrenomyeloneuropathy. *Acta Neurol Scand*. 85, 147-49.
- Holzinger A., Kammerer S., Berger J., Roscher A.A. (1997b). cDNA cloning and mRNA expression of the human adrenoleukodystrophy related protein (ALDRP) a peroxisomal ABC transporter. *Biochem Biophys Res Commun*. 239(1): 261-64.
- Holzinger A., Kammerer S., Roscher A.A. (1997a). Primary structure of human PMP69, a putative peroxisomal ABC-transporter. *Biochem Biophys Res Commun*. 237(1): 152-57.
- Holzinger A., Maier E., Stockler-Ipsiroglu S., Braun A., Roscher A.A. (1998a). Characterization of a novel mutation in exon 10 of the adrenoleukodystrophy gene. *Clin Genet*. 53(6): 482-87.
- Holzinger A., Munatu A., Mayerhofer P., Kammerer S., Albet S., Bugaut M., Roscher, A.A. (1998c). The mouse gene encoding peroxisomal membrane protein-1-like protein (PXMP1-L): cDNA cloning genomic organization and comparative expression studies. *FEBS Lett*. 433, 179-83.
- Holzinger A., Roscher AA., Landgraf P., Lichtner P., Kammerer S. (1998b). Genomic organization and chromosomal localization of the human peroxisomal membrane protein-1-like (PXMP1-L) gene encoding a peroxisomal ABC transporter. *FEBS Lett*. 426(2): 238-42.
- Hruban Z., Vigil E.L., Slesers A., Hopkins E. (1972). Microbodies: constituent organelles of animal cells. *Lab Invest*. 27(2):184-91.

**I**

Imamura A., Suzuki Y., Song X.Q., Fukao T., Shimozawa N., Orii T., Kondo N. (1996). Prenatal diagnosis of adrenoleukodystrophy by means of mutation analysis. *Prenat Diagn.* 16, 259-61.

Imamura A., Suzuki Y., Song X.Q., Fukao T., Uchiyama A., Shimozawa N., Kamijo K., Hashimoto T., Orii T., Kondo N. (1997). Two novel missense mutations in the ATP-binding domain of the adrenoleukodystrophy gene: immunoblotting and immunocytological study of two patients. *Clin Genet.* 51(5):322-5.

**J**

Jakobs B.S., Wanders R.J.A. (1991). Conclusive evidence that very-long-chain fatty acids are oxidized exclusively in peroxisomes in human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 21, 240-49.

Jedlitschky G., Huber A., Völkl A., Müller M., Leier I., Müller J., Lehmann W.D., Fahimi H.D., Keppler D. (1991). Peroxisomal degradation of leukotrienes by  $\beta$ -oxidation from the  $\omega$ -end. *J Biol Chem.* 266, 24763-72.

Jensen M.E., Sawyer R.W., Braun I.F., Rizzo W.B. (1990). MR imaging appearance of childhood adrenoleukodystrophy with auditory, visual and motor pathway involvement. *Radiographics.* 10, 53-57.

**K**

Kamijo K., Taketani S., Yokota S., Osumi T., Hashimoto T. (1990). The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the MDE (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily. *J Biol Chem.* 265, 4534-40.

Kamijo T., Aoyama T., Miyazaki J., Hashimoto T. (1993). Molecular cloning of the cDNAs for the subunits of rat mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation multienzyme complex. Structural and functional relationships to other mitochondrial and peroxisomal  $\beta$ -oxidation enzymes. *J Biol Chem.* 268, 26452-60.

- Kane S.E., Pastan I., Gottesman M.M. (1990). Genetic basis of multidrug resistance of tumor cells. *J Bioenerg Biomembr.* 22, 593-618.
- Kelley R.I., Moser H.W. (1984). Hyperpepicolic acidemia in neonatal adrenoleukodystrophy. *Am J Med Genet.* 19, 791.
- Kemp S., Ligtenberg M.J.L., van Geel B.M., Barth P.G., Wolterman R.A., Schoute F., Sarde C.-O., Mandel J.-L., van Oost B.A., Bolhuis P.A. (1994). Identification of a two base pair deletion in five unrelated families with adrenoleukodystrophy: A possible hot spot for mutations. *Biochem Biophys Res Commun.* 202, 647-53.
- Kemp S., Mooyer P.A.W., Bolhuis P.A., van Geel B.M., Mandel J.-L., Barth P.G., Aubourg P., Wanders R.J.A. (1996). ALDP expression in fibroblasts of patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *J Inher Metab Dis.* 19, 667-74.
- Kemp S., Wei H.M., Lu J.F., Braiterman L.T., McGuinness M.C., Moser A.B., Watkins P.A., Smith K.D. (1998). Gene redundancy and pharmacological gene therapy: implications for X-linked adrenoleukodystrophy. *Nat Med.* 4(11):1261-68.
- Kirk E.P., Fletcher J.M., Sharp P., Carey B., Poulos A. (1998). X-linked adrenoleukodystrophy: the Australasian experience. *Am J Med Genet.* 76(5):420-3.
- Kishimoto Y., Moser H.W., Kawamura N., Platt M., Pallante B., Fenselau C. (1980). Evidence that abnormal very long chain fatty acids of brain cholesterol esters are of exogenous origin. *Biochem Biophys Res Commun.* 96, 69-76.
- Kobayashi T., Shinnoh N., Kondo A., Yamada T. (1997). Adrenoleukodystrophy protein-deficient mice represent abnormality of very long chain fatty acid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* 232, 631-36.

- Koike R., Onodera O., Tabe H., Kaneko K., Miyatake T., Iwasaki S., Nakano M., Shizuma N., Ikeguchi K., Nishizawa, M. (1995). Partial deletions of putative adrenoleukodystrophy (ALD) gene in Japanese ALD patients. *Hum Mutat.* 6, 263-67.
- Kok F., Neumann S., Sarde C.-O., Zheng S., Wu K.-H., Wei H.-M., Bergin J., Watkins P.A., Gould S., Sack G., Moser H., Mandel J.-L., Smith K.S. (1995). Mutational analysis of patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Human Mutation.* 6, 104-15.
- Kølvraa S., Gregersen N. (1986). *In vitro* studies on the oxidation of medium-chain dicarboxylic acids in rat liver. *Biochim Biophys Acta.* 876, 515-25.
- Korenke G.C., Christen H.J., Hunneman D.H., Hanefeld F. (1996a). Failure of beta interferon therapy in X-linked adrenoleukodystrophy. *Eur J Pediatr.* 155(9):833.
- Korenke G.C., Christen H.J., Kruse B., Hunneman D.H., Hanefeld F. (1997). Progression of X-linked adrenoleukodystrophy under interferon-beta therapy. *J Inherit Metab Dis.* 20, 59-66.
- Korenke G.C., Fuchs S., Krasemann E., Doerr H.G., Wilichowski E., Hunneman D.H., Hanefeld F. (1996b). Cerebral adrenoleukodystrophy (ALD) in only one of monozygotic twins with an identical ALD genotype. *Ann Neurol.* 40(2):254-7.
- Korenke G.C., Hunneman D.H., Kohler J., Stöckler S., Landmark K., Hanefeld F. (1995). Glyceroltrioleate/glyceroltrierucate therapy in 16 patients with X-chromosomal adrenoleukodystrophy /adrenomyeloneuropathy: Effect on clinical, biochemical and neurophysiological parameters. *European Journal of Pediatrics.* 154, 64-70.
- Korenke G.C., Krasemann E., Meier V., Beuche W., Hunneman DH, Hanefeld F. (1998). First missense mutation (W679R) in exon 10 of the adrenoleukodystrophy gene in siblings with adrenomyeloneuropathy. *Hum Mutat.* 1:S204-6.

- Krasemann E.W., Meier V., Korenke G.C., Hunneman D.H., Hanefeld F. (1996). Identification of mutations in the ALD-gene of 20 families with adrenoleukodystrophy / adrenomyeloneuropathy. *Hum Genet.* 97, 194-97.
- Krivit W., Aubourg P., Shapiro E., Peters C. (1999). Bone marrow transplantation for globoid cell leukodystrophy, adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, and Hurler syndrome. *Curr Opin Hematol.* 6(6):377-82.
- Krivit W., Lockman L.A., Watkins P.A., Hirsch J., Shapiro E.G. (1995). The future for treatment by bone marrow transplantation for adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, globoid cell leukodystrophy and Hurler syndrome. *Journal of Inherited Metabolic Disease.* 18, 398-412.
- Kuchler K., Thorner J. (1992). Functional expression of human *mdr1* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 2302-06.

**L**

- Lachtermacher M.B., Seuanez H.N., Moser A.B., Moser H.W., Smith K.D. (2000). Determination of 30 X-linked adrenoleukodystrophy mutations, including 15 not previously described. *Hum Mutat.* 15(4):348-53.
- Laureti S., Aubourg P., Calcinaro F., Rocchiccioli F., Casucci G., Angeletti G., Brunetti P Lernmark A., Santeusanio F., Falorni A. (1998). Etiologic diagnosis of primary adrenal insufficiency using an original flow-chart of immune and biochemical markers. *J Clin Endocrinol Metab.* 83(9): 3163-68 .
- Laureti S., Casucci G., Santeusanio F., Angeletti G., Aubourg P., Brunetti P. (1996). X-linked adrenoleukodystrophy is a frequent cause of idiopathic Addison's disease in young adult male patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 81, 470-74.

- Lazarow P.B. (1995). Peroxisome structure, function, and biogenesis - Human patients and yeast mutants show strikingly similar defects in peroxisome biogenesis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 54, 720-25.
- Lazarow P.B. and Moser H.W. (1995). Disorders of peroxisome biogenesis. In: Scriver, Beaudet, Sly, Valle (eds.), *The metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Mc Graw Hill - International Edition. 1479-1509 e 2287-2324.
- Lazo O., Contreras M., Singh I. (1990b). Topographical localization of peroxisomal acyl-CoA ligases: differential localization of palmitoyl-CoA and Lignoceroyl-CoA ligase. *Biochemistry*. 29, 3981-86.
- Lazo O., Contreras M., Yoshida Y., Singh A.K., Stanley W., Weise M., Singh I. (1990a). Cellular oxidation of lignoceric acid is regulated by the subcellular localization of lignoceroyl-CoA ligases. *J Lipid Res*. 31, 583-95.
- Ligtenberg M.J.L., Kemp S., Sarde C.-O., van Geel B.M., Kleijer W.J., Barth P.G., Mandel J.-L. (1995). Spectrum of mutations in the gene encoding the adrenoleukodystrophy protein. *Am J Hum Genet*. 56, 44-50.
- Liu L.X., Janvier K., Berteaux-Lecellier V., Cartier N., Benarous R., Aubourg P. (1999). Homo- and heterodimerization of peroxisomal ATP-binding cassette half-transporters. *J Biol Chem*. 274(46):32738-43.
- Loes D., Stillman A.E., Hite S. (1994). Childhood cerebral form of adrenoleukodystrophy. Short-term effect of bone-marrow transplantation on brain MR observations. *Am J Neuroradiol*. 15, 1767.
- Lombard-Platet G., Savary S., Sarde C.-O., Mandel J.-L., Chimini G. (1996). A close relative of the adrenoleukodystrophy (ALD) gene codes for a peroxisomal protein with a specific expression pattern. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93, 1265-69.

Lu J.F., Lawler A.M., Watkins P.A., Powers J.M., Moser A.B., Moser H.W., Smith K.D. (1997). A mouse model for X-linked adrenoleukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(17):9366-71.

**M**

Mannaerts G.P., van Veldhoven P.P. (1993a). Metabolic pathways in mammalian peroxisomes. *Biochimie.* 75, 147-58.

Mannaerts G.P., van Veldhoven P.P. (1993b). Functional aspects of peroxisomal  $\beta$ -oxidation: and overview. In: R.J.A. Wanders, R.B.H. Schutgens, H.F. Tabak (eds.), *Functions and biogenesis of peroxisomes in relation to human disease.* 1-28. Amsterdam: Royal Netherlands academy of Arts and Sciences.

Maris T., Androulidakis E.J., Tzagournissakis M., Papavassiliou S., Moser H., Plaitakis, A. (1995). X-linked adrenoleukodystrophy presenting as neurologically pure familial spastic paraparesis. *Neurology.* 45, 1101-4.

Martin J.J., Dompas B., Ceuterick C., Jakobs K. (1980). Adrenomyeloneuropathy and adrenoleukodystrophy in two brothers. *Eur Neurol.* 19, 281-87.

Matsumoto T., Kondoh T., Masuzaki H., Harada, N., Matsusaka T., Kinoshita E., Takeo G. (1994). A point mutation at ATP-binding region of the ALD gene in a family with X-linked adrenoleukodystrophy. *Jpn J Hum Genet.* 39, 345-51.

McGuinness M.C., Griffin D.E., Raymond G.V., Washington C.A., Moser H.W., Smith K.D. (1995). Tumor necrosis factor-alpha and X-linked adrenoleukodystrophy. *J Neuroimmunol.* 61, 161-69.

McGuinness M.C., Powers J.M., Bias W.B., Schmeckpeper B.J., Segal A.H., Gowda V.C., Wesselingh S.L., Berger J., Griffin D.E., Smith K.D. (1997). Human leukocyte antigens and cytokine expression in cerebral inflammatory demyelinating lesions of X-linked adrenoleukodystrophy and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 75, 174-82.

- Menkes J.H., Corbo L.M. (1977). Adrenoleukodystrophy: Accumulation of cholesterol esters with very long chain fatty acids. *Neurology*. 27, 928-30.
- Migeon B.R., Moser H.W., Moser A.B., Axelman J., Sillence D., Norum R.A. (1981). Adrenoleukodystrophy: evidence for X linkage inactivation, and selection favoring the mutant allele in heterozygous cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 78, 5066-70.
- Mortensen P.B. (1992). Formation and degradation of dicarboxylic acids in relation to alterations in fatty acid oxidation in rats. *Biochim Biophys Acta*. 1124, 71-79.
- Moser A.B., Borel J., Odone A., Naidu S., Cornblath D., Sanders D.B., Moser H.W. (1987). A new dietary therapy for adrenoleukodystrophy: biochemical and preliminary clinical results in 36 patients. *Ann Neurol*. 21, 240-48.
- Moser A.B., Jones D.S., Raymond G.V., Moser H.W. (1999). Plasma and red blood cell fatty acids in peroxisomal disorders. *Neurochem Res*. 24(2):187-97.
- Moser A.B., Kreiter N., Bezman L., Lu S.-E., Raymond G.V., Naidu S., Moser H.W. (1999). Plasma very long chain fatty acids in 3,000 peroxisome disease patients and 29,000 controls. *Ann Neurol*. 45(1): 100-10.
- Moser A.B., Singh I., Brown F.R.I., Solish G.I., Kelley R.I., Benke P.J., Moser H.W. (1984a). The cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome: Increased levels and impaired degradation of very long chain fatty acids, and prenatal diagnosis. *N Engl J Med*. 310, 1141-47.
- Moser H.W. (1986). Peroxisomal disorders. *J Pediatr*. 108, 89-93.
- Moser H.W. (1995a). Adrenoleukodystrophy: natural history treatment and outcome. *J Inher Metab Dis*. 18, 435-47.
- Moser H.W. (1995b). Clinical and therapeutic aspects of adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 54, 740-45.

- Moser H.W. (1997). Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain*. 120, 1485-508.
- Moser H.W., Bergin A., Cornblath D. (1991a). Peroxisomal disorders. *Biochem Cell Biol.*69, 463-74.
- Moser H.W., Bergin A., Naidu S., Ladenson P.W. (1991b). Adrenoleukodystrophy: New aspects of adrenal cortical disease. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 20, 1-9.
- Moser H.W., Koehler W., Borel J., Bergin A., Panoscha R., Davoli M., McGuinness M., Smith K.D. (1993). The many faces of X-linked adrenoleukodystrophy: implications for pathogenesis and the evaluation of therapy. In: R.J.A. Wanders, R.B.H. Schutgens H.F. Tabak (Eds.), *Functions and biogenesis of peroxisomes in relation to human disease*. 227-244. Amsterdam: Royal Netherlands Academy of arts and Sciences.
- Moser H.W., Moser A.B. (1990). Measurements of saturated very long chain fatty acids in plasma. In: F. Hommes (ed.). *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics*. New York: Wiley-Liss.
- Moser H.W., Moser A.B. (1996a). Peroxisomal disorders: overview. *Ann N Y Acad Sci.* 804:427-41.
- Moser H.W., Moser A.B. (1996b). Very long-chain fatty acids in diagnosis, pathogenesis, and therapy of peroxisomal disorders. *Lipids.* 31:S141-4.
- Moser H.W., Moser A.B., Frayer K.K., Chen W.W., Schulman J.D., O'Neill, B.P., Kishimoto Y. (1981). Adrenoleukodystrophy: Increased plasma content of saturated very long chain fatty acids. *Neurology.* 31, 1241-47.
- Moser H.W., Moser A.B., Kawamura N., Murphy J., Suzuki K., Schaumburg H.H., Kishimoto Y. (1980). Adrenoleukodystrophy: elevated C26 fatty acid in cultured skin fibroblasts. *Ann Neurol.* 7, 542-49.

- Moser H.W., Moser A.B., Powers J.M., Nitowsky H.M., Schaumburg H.H., Norum R.A., Migeon B.R. (1982). The prenatal diagnosis of adrenoleukodystrophy. Demonstration of increased hexacosanoic acid in cultured amniocytes and fetal adrenal gland. *Pediatric Research*. 16, 172-77.
- Moser H.W., Moser A.B., Singh I., O'Neill B.P. (1984b). Adrenoleukodystrophy: survey of 303 cases: biochemistry, diagnosis and therapy. *Ann Neurol*. 16, 628-41.
- Moser H.W., Moser A.B., Smith K.D., Bergin A., Borel J., Shankrof J., Stine O.C., Merette C., Ott J., Krivit W., Shapiro E. (1992). Adrenoleukodystrophy: Phenotypic variability: Implications for therapy. *J Inher Metab Dis*. 15, 645-64.
- Moser H.W., Powers J.M., Smith K.D. (1995d). Adrenoleukodystrophy: Molecular genetics, Pathology and Lorenzo's oil. *Brain Pathology*. 5, 259-66.
- Moser H.W., Smith K.D., Moser A.B. (1995c). X-linked adrenoleukodystrophy. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly, Valle D (eds). *The metabolic bases of inherited disease*. Seventh Edition. Vol II, New York: McGraw Hill. 2325-49.
- Moser H.W., Tutschka P.J., Brown F.R., III, Moser A.B., Yeager A.M., Singh I., Mark S.A., Kumar A.J., McDonnell J.M., White C.L., Maumenee I.H., Green W.R., Powers J.M., Santos G.W. (1984c). Bone marrow transplant in adrenoleukodystrophy. *Neurology*. 34, 1410-17.
- Mosser J., Douar A.M., Sarde C., Kioschis P., Feil R., Moser H., W., Poutska A.M., Mandel J.-L., Aubourg P. (1993). Positional cloning of X-linked adrenoleukodystrophy gene: unexpected homology to "ABC" superfamily of transporters. *Nature*. 361, 726-30.
- Mosser J., Lutz Y., Stoeckel M.E., Sarde C.-O., Kretz C., Douar A.M., Lopez J., Aubourg P., Mandel J.-L. (1994a). The gene responsible for adrenoleukodystrophy encodes a peroxisomal membrane protein. *Hum Molec Genet*. 3, 265-71.

Mosser J., Sarde C.O., Vicaire S., Yates J.R., Mandel J.L. (1994b). A new human gene (DXS1357E) with ubiquitous expression, located in Xq28 adjacent to the adrenoleukodystrophy gene. *Genomics*. 22, 469-71.

Murad S., Kishimoto Y. (1978). Chain elongation of fatty acid in brain: A comparison of mitochondrial and microsomal enzyme activities. *Arch Biochem Biophys*. 185, 300-4.

## N

Naidu S., Bresnan M.J., Griffin D., O'Toole S., Moser H.W. (1988). Childhood adrenoleukodystrophy: failure of intensive immunosuppression to arrest neurologic progression. *Arch Neurol*. 45, 846-48.

Netik A., Forss-Petter S., Holzinger A., Molzer B., Unterrainer G., Berger J. (1999). Adrenoleukodystrophy-related protein can compensate functionally for adrenoleukodystrophy protein deficiency (X-ALD): implications for therapy. *Hum Mol Genet*. 8(5): 907-13.

Noetzel M.J., Clark H.B., Moser H.W. (1983). Neonatal adrenoleukodystrophy with prolonged survival. *Ann Neurol*. 14, 380.

Nogueira A., Quelhas D., Jorge P., Ferreira R., Almeida M.F. (1994). Adrenoleucodistrofia: três anos de tratamento com óleo de Lorenzo *Revista Portuguesa de Pediatria*.

## O

Oka A., Saito M., Kubota M., Sakakihara Y., Yanagisawa M. (1996). Temporary improvement of neurological symptoms with gammaglobulin therapy in a boy with adrenoleukodystrophy. *Brain Dev*. 18, 119-21.

## P

Pahan K., Khan M., Singh I. (1998). Therapy for X-adrenoleukodystrophy: normalization of very long chain fatty acids and inhibition of induction of cytokines by cAMP. *J Lipid Res*. 39(5):1091-100.

- Poulos A., Gibson R., Sharp P., Beckman K., Grattan-Smith P. (1994). Very long chain fatty acids in X-linked adrenoleukodystrophy brain after treatment with Lorenzo's oil. *Ann Neurol.* 36, 741-46.
- Powers J.M., Liu Y., Moser A.B., Moser H.W. (1992). The inflammatory myelinopathy of adrenoleukodystrophy: Cells, effector molecules, and pathogenetic implications. *J Neuropathol Exp Neurol.* 51, 630-43.
- Powers J.M., Moser H.W., Moser A.B., Schaumburg H.H. (1982). Fetal adrenoleukodystrophy: The significance of pathologic lesions in adrenal gland and testis. *Hum Pathol.* 13, 1013-15.
- Powers J.M., Schaumburg H.H. (1974). Adrenoleukodystrophy: Similar ultrastructural changes in adrenal cortical and Schwann cells. *Arch Neurol.* 30, 406-8.
- Powers J.M., Schaumburg H.H. (1981). The testis in adrenoleukodystrophy. *Am J Pathol.* 102, 90-94.

**R**

- Rasmussen M., Moser A.B., Borel J., Khangoora S., Moser H.W. (1994). Brain, liver, and adipose tissue erucic and very long chain fatty acid levels in adrenoleukodystrophy patients treated with glyceryl trierucate and trioleate oils (Lorenzo's oil). *Neurochem Res.* 19(8):1073-78.
- Restuccia D., Di Lazzaro V., Valeriani M., Oliviero A., Le Pera D., Barba C., Cappa M., Bertini E., Di Capua M., Tonali, P. (1999). Neurophysiologic follow-up of long-term dietary treatment in adult-onset adrenoleukodystrophy. *Neurology.* 52(4): 810-16.
- Rhodin J. (1954). Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. *Aktiebolaget Godvil.* Stockholm.

- Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielenski J., Lok S., Plavsic N., Chou J.L. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 245, 1066-73.
- Rizzo W.B., Avigan J., Chemke J., Schulman J.D. (1984). Adrenoleukodystrophy: very-long chain fatty acid metabolism in fibroblasts. *Neurology*. 34, 163.
- Rizzo W.B., Phillips M.W., Dammann A.L., Leshner R.Y., Jennings S.V.K. (1987). Adrenoleukodystrophy: Dietary oleic acid lowers hexacosanoate levels. *Ann Neurol*. 21, 240-49.
- Ruiz M., Coll M.J., Pampols T., Giros M. (1998). X-linked adrenoleukodystrophy: phenotype distribution and expression of ALDP in Spanish kindreds. *Am J Med Genet*. 76(5):424-7.
- Ruiz M., Pampols T., Giros M. (1996). Glycerol trioleate/glycerol trierucate therapy in X-linked adrenoleukodystrophy: saturated and unsaturated fatty acids in blood cells. Implications for the follow-up. *J Inherit Metab Dis*. 19, 188-92.

**S**

- Sack G.H., Morrell J.C. (1993). Visual pigment gene changes in adrenoleukodystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 34, 2634-37.
- Saraste M., Sibbald P.R., Wittinghofer A. (1990). The P-loop: a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci*. 15, 430-34.
- Sarde C.-O., Mosser J., Kioschis P., Kretz C., Vicaire S., Aubourg P., Poustka A., Mandel J.-L. (1994a). Genomic organization of the adrenoleukodystrophy gene. *Genomics*. 22, 13-20.
- Sarde C.-O., Thomas J., Sadoulet H., Garnier J.-M., Mandel J.-L. (1994b). cDNA sequence of Aldgh, the mouse homolog of the X-linked adrenoleukodystrophy gene. *Mammalian Genome*. 5, 810-13.

- Savary S., Allikmets R., Denizot F., Luciani M.F., Mattei M.G., Dean M., Chimini, G. (1997). Isolation and chromosomal mapping of a novel ATP-binding cassette transporter conserved in mouse and human. *Genomics*. 41(2), 275-78.
- Schlote W., Molzer B., Peiffer J., Poremba M., Schumm F., Harzer K., Schnabel R., Bernheimer H. (1987). Adrenoleukodystrophy in an adult female. A clinical, morphological and neurochemical study. *J Neurol*. 235, 1-9.
- Schwiebert E.M., Egan M.E., Hwang T.H., Fulmer S.B., Allen S.S., Cutting G.R., Guggino W.B. (1995). CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell*. 81(7):1063-73.
- Shani N., Jimenez-Sanchez G., Steel G., Dean M., Valle D. (1997). Identification of a fourth half ABC transporter in the human peroxisomal membrane. *Hum Mol Genet*. 6(11): 1925-31.
- Shani N., Sapag A., Valle D. (1996). Characterization and analysis of conserved motifs in a peroxisomal ATP-binding cassette transporter. *J Biol Chem*. 271, 8725-30.
- Shani N., Valle D. (1998). Peroxisomal ABC transporters. *Methods Enzymol*. 292,753-76.
- Siemerling E., Creutzfeld H. (1923). Bronzkrankheit und sklerotische encephalomyelitis (diffuse sclerose). *Arch Psychiatr Nervenkrankh*. 68, 217-44.
- Singh I., Khan M., Key L., Pai S. (1998). Lovastatin for X-linked adrenoleukodystrophy. *N Engl J Med*. 339(10):702-3.
- Singh I., Moser A.B., Goldfischer S., Moser H.W. (1984a). Lignoceric acid is oxidized in the peroxisomes: Implications for the Zellweger cerebro-hepato-renal syndrome and adrenoleukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 81, 4203-5.

- Singh I., Moser A.B., Moser H.W., Kishimoto Y. (1984b). Adrenoleukodystrophy: Impaired oxidation of very long fatty acids in white blood cells, cultured skin fibroblasts and amniocytes. *Pediatric Research*. 18, 286-88.
- Singh I., Pahan K., Dhaunsi G.S., Lazo O., Ozand P. (1993). Phytanic acid  $\alpha$ -oxidation. Differential subcellular localization in rat and human tissues and its inhibition by Nycodenz. *J Biol Chem*. 268, 9972-79.
- Smith B.T., Sengupta T.K., Singh I. (2000). Intraperoxisomal localization of very-long-chain fatty acyl-CoA synthetase: implication in X-adrenoleukodystrophy. *Exp Cell Res*. 1;254(2):309-20.
- Smith K.D., Kemp S, Braiterman L.T., Lu J.F., Wei H.M., Geraghty M., Stetten G., Bergin J.S., Pevsner J., Watkins P.A. (1999). X-linked adrenoleukodystrophy: genes, mutations, and phenotypes. *Neurochem Res*. 24(4):521-35.
- Sobue G., Ueno-Natsukari I., Okamoto H., Connell T.A., Aizawa I., Mizoguchi K., Honma M., Ishikawa G., Mitsuma T., Natsukari N. (1994). Phenotypic heterogeneity of an adult form of adrenoleukodystrophy in monozygotic twins. *Ann Neurol*. 36, 912-15.
- Song X.-Q., Fukao T., Suzuki Y., Imamura A., Uchiyama A., Shimosawa N., Kondo N., Orii T. (1995). Identification of a novel frameshift mutation in a Japanese adrenoleukodystrophy patient. *Human Molecular Genetics*. 4, 1093-94.
- Spies T., Cerundolo V., Colonna M., Cresswell P., Townsend A., DeMars R. (1992). Presentation of viral antigen by MHC class I molecules is dependent of a putative peptide transporter heterodimer. *Nature*. 355, 644-46.
- Steinberg S.J., Kemp S., Braiterman L.T., Watkins P.A. (1999). Role of very-long-chain acyl-coenzyme A synthetase in X-linked adrenoleukodystrophy. *Ann Neurol*. 46(3):409-12.

Steinberg S.J., Wang S.J., Kim D., Mihalik S., Watkins P. (1999). Human very-long-chain acyl-CoA synthetase: cloning, topography and relevance to branched-chain fatty acid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* 257, 615-21.

Steinberg S.J., Wang S.J., McGuinness M.C., Watkins P.A. (1999). Human liver-specific very-long-chain acyl-coenzyme A synthetase: cDNA cloning and characterization of a second enzymatically active protein. *Mol Genet Metab.* 68(1):32-42.

## T

Takano H., Koike R., Onodera O., Sasaki R., Tsuji S. (1999). Mutational analysis and genotype-phenotype correlation of 29 unrelated Japanese patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Arch Neurol.* 56(3): 295-300.

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(3):254-64.

Trowsdale J., Hanson I., Mockridge I., Beck S., Townsend A., Kelly A. (1990). Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature.* 348, 741-44.

Tsuji S., Suzuki M., Ariga T., Sekine M., Kuriyama M., Miyatake T. (1981). Abnormality of long-chain fatty acids in erythrocyte membrane sphingomyelin from patients with adrenoleukodystrophy. *J Neurochem.* 36, 1046-49.

## U

Uchiyama A., Suzuki Y., Song W.Q., Fukao T., Imamura A., Tomatsu S., Shimozawa N. (1994). Identification of a nonsense mutation in ALD protein cDNA from a patient with adrenoleukodystrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 198, 632-36.

- Uchiyama H., Yamano T., Shimada M., Ohkubo I. (1996). Novel missense and frameshift mutations in the adrenoleukodystrophy gene. *Jpn J Hum Genet.* 41, 407-11.
- Uchiyama M., Hata Y., Tada S. (1991). MR imaging of adrenoleukodystrophy. *Neuroradiology.* 33, 25-27.
- Ulrich J., Hershkowitz N., Heits P., Sigrist T., Baerlocher P. (1978). Adrenoleukodystrophy: Preliminary report of connatal case, light- and electron microscopical, immunohistochemical and biochemical findings. *Acta Neuropathol.* 43, 77.
- Uziel G., Bertini E., Bardelli P., Rimoldi M., Gambetti M. (1991). Experience on therapy of adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. *Dev Neurosci.* 13(4-5):274-79.

## V

- Valle D., Gartner J. (1993). Penetrating the peroxisome. *Nature.* 361, 682-83.
- Vamecq J., Draye J.P. (1989). Peroxisomal and mitochondrial  $\beta$ -oxidation of monocarboxyl-CoA, *w*-hydroxymonocarboxyl-CoA and dicarboxyl-CoA ester in tissues from untreated and clofibratetreated rats. *J Biochem. (Tokyo).* 106, 216-22.
- Vamecq J., Draye J.-P., Van Hoof F., Misson J.-P., Evrard P., Verellen G., Eyssen H., van Eldere J., Schutgens R.B.H., Wanders R.J.A., Roels F., Goldfisher S. (1986). Multiple peroxisomal enzymatic deficiency disorders. A comprehensive biochemical and morphological study of Zellweger cerebrohepatorenal syndrome and neonatal adrenoleukodystrophy. *Am J Pathol.* 125, 524.
- van Geel B.M., Assies J., Wanders R.J.A., Barth P.G. (1997). X linked adrenoleukodystrophy: clinical presentation, diagnosis, and therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 63(1):4-14.
- van Geel B.M., Assies J., Weverling G.J., Barth P.G. (1994). Predominance of the adrenomyeloneuropathy phenotype of X- linked adrenoleukodystrophy in the Netherlands: A survey of 30 kindreds. *Neurology.* 44, 2343-46.

- van Geel B.M., Koelman J.H.T.M., Bart P.G., Ongerboer de Visser B.W. (1996). Peripheral nerve abnormalities in adrenomyeloneuropathy: A clinical and electrodiagnostic study. *Neurology*. 46, 112-18.
- van Grunsven E., van Berkel E., Mooijer P., Watkins P., Moser H., Suzuki, Y., Jiang L., Hashimoto T., Hoefler G., Adamski J., Wanders, R. (1999). Peroxisomal bifunctional protein deficiency revisited: resolution of its true enzymatic and molecular basis. *Am J Hum Genet*. 64, 99-107.
- Verleur N., Hetteema E.H., van Roermund C.W., Tabak H.F. Wanders RJ (1997) Transport of activated fatty acids by the peroxisomal ATP-binding-cassette transporter Pxa2 in a semi-intact yeast cell system. *Eur J Biochem*. 249(3):657-61.
- Victor A. McKusick (eds) *Mendelian Inheritance in Man*. Catalogs of Autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked phenotypes. (1992). Tenth Edition. The Johns Hopkins University Press. Baltimore and London. *Online Mendelian Inheritance in Man*, OMIM, em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

**W**

- Wanders R.J.A., Schutgens R.B.H., Schrakamp G., Tager J.M., van den Bosch H., Moser A.B., Moser H.W. (1987a). Neonatal adrenoleukodystrophy: Impaired plasmalogen biosynthesis and peroxisomal  $\beta$ -oxidation due to a deficiency of catalase-containing particles (peroxisomes) in cultured skin fibroblasts. *J Neurol Sci*. 77, 331.
- Wanders R.J.A., van Roermund C., van Wijland M.J.A. Heikoop, J., Schutgens R.B.H., Schram A.W., Tager J.M., van den Bosch H., Poll-Thé B.T., Saudubray J.M., Moser H.W., Moser A.B. (1987b). Peroxisomal very-long-chain fatty acid  $\beta$ -oxidation in human skin fibroblasts: activity in Zellweger syndrome and other peroxisomal disorders. *Clin Chim Acta*. 166, 255-63.

- Wanders R.J.A., van Roermund C., van Wijland M.J.A., Schram A.W., Tager J.M., van den Bosch H., Schalkwijk C. (1988a). X-linked Adrenoleukodystrophy: identification of the primary defect at the level of a deficient peroxisomal very long chain fatty acid acyl-CoA synthetase using a newly developed method for the isolation of peroxisomes from skin fibroblasts. *J Inher Metab Dis.* 2, 173-77.
- Wanders R.J.A., van Roermund C., van Wijland M.J.A., Schutgens R.B.H., van den Bosch H., Schram A.W., Tager J.M. (1988b). Direct demonstration that the deficient oxidation of very long chain fatty acids in X-linked adrenoleukodystrophy is due to an impaired ability of peroxisomes to activate very long chain fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 153: (2). 618-24.
- Watkins P.A., Gould S.J., Smith M.A., Braiterman L.T., Wei H.-M., Kok F., Moser A.B., Moser H.W., Smith, K.D. (1995). Altered expression of ALDP in X-linked adrenoleukodystrophy. *American Journal of Human Genetics.* 57, 292-301.
- Watkins P.A., Pevsner J., Steinberg S.J. (1999). Human very long-chain-acyl-CoA synthetase and two homologs: Initial characterization and relationship to fatty acid transport protein. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids.* 60(5-6):323-28.
- Willems P.J., Vits L., Wanders R.J.A., Coucke P.J., van der Auwera B.J., Van Elsen A.F., Raeymackers P., Van Broeckhoven C., Schutgens R.B.H., Dacremont G., Leroy J.G., Martin J.J., Dumon J.E. (1990). Linkage of DNA markers at Xq28 to adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy present within the same family. *Arch Neurol.* 47, 665-69.

**Y**

- Yamada T., Shinnoh N., Kobayashi T. (1997). Protease inhibitors suppress the degradation of mutant adrenoleukodystrophy proteins but do not correct impairment of very long chain fatty acid metabolism in adrenoleukodystrophy fibroblasts. *Neurochem Res.* 22, 233-37.

Yamada T., Taniwaki T., Shinnoh N., Uchiyama A., Shimosawa N., Ohyagi Y., Asahara H., Kira J. (1999). Adrenoleukodystrophy protein enhances association of very long-chain acyl-coenzyme A synthetase with peroxisome. *Neurology*. 52(3), 614-16.

**Z**

Zierz S., Schroder R., Unkrig C.J. (1993). Thrombocytopenia induced by erucic acid therapy in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Clin Investig*. 71, 802-05.

## **CAPÍTULO IX**

---

### ***AGRADECIMENTOS***

Para a realização deste trabalho contribuíram diversas pessoas e instituições às quais apresento o meu apreço.

À Doutora Maria Clara Sá Miranda por me ter possibilitado a realização desta tese, por me ter orientado e apoiado ao longo dos vários anos de trabalho. Pelas suas críticas que ajudaram a melhorar este trabalho, aqui expresso a minha gratidão.

À Prof. Doutora Maria João Mascarenhas Saraiva, pelas sugestões formuladas durante a evolução do trabalho, pela disponibilidade e a leitura pormenorizada desta dissertação.

Ao Dr. António Nogueira por me ter proposto e apoiado durante a realização deste trabalho.

Ao Doutor Jorge Azevedo por me ter orientado, pelo apoio incansável e a leitura crítica deste trabalho.

Ao Dr. Rui Aguiar Pinto pelas sugestões, disponibilidade, excelentes ensinamentos e apoio durante o desenvolvimento do trabalho experimental.

Ao Dr. Vaz Osório, Director do Instituto de Genética Médica Doutor Jacinto de Magalhães, por me proporcionar os meios e infra-estruturas necessárias à elaboração da dissertação.

Je remercie à Monsieur le Docteur Patrick Aubourg de m'avoir accueillie a l'unité INSERM 342, Hôpital Saint-Vincent-de-Paul. Au cours de trois mois de travail dans son équipe, j'ai pu profiter de sa rigueur et de ses compétences scientifiques. Je voudrais également remercier à tous les membres de son équipe, specialment le Docteur Nathalie Cartier, Jacqueline Lopez et Anne-Marie Repellin.

To Prof. Ronald Wanders, for a pleasant stay and the opportunity to work in his laboratory at University Hospital Amsterdam, The Netherlands.

Ao Prof. Doutor Sérgio Castedo e Doutora Begoña Criado pela disponibilidade demonstrada durante o estágio efectuado na Unidade de Genética do IPATIMUP, Porto.

Ao Dr. Pedro Brites, Dr.<sup>a</sup> Dulce Quelhas, Lurdes Lopes, Rita Ferreira pela colaboração em algumas das experiências, pelas discussões e apoio técnico concedido durante o trabalho experimental e pela amizade.

A todos os membros da Unidade de Enzimologia do Instituto de Genética Médica, por se disponibilizaram a participar neste trabalho e por todo o apoio e amizade.

A todo o pessoal da Unidade de Genética Molecular pela disponibilidade, simpatia e boa vontade com que me apoiam e em especial à Dr.<sup>a</sup> M. Rosário Dos Santos .

À Dr.<sup>a</sup> Maria José Ortigão e restantes membros do serviço de informática do I.G.M.J.M. pela ajuda na execução de alguns trabalhos gráficos.

Agradeço também, de um modo geral, a todos aqueles que, através das suas sugestões, dúvidas e críticas, me ajudaram a tornar mais completo e claro este trabalho.

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia, através da Fundação para a Ciência e Tecnologia, Programas Ciência e PRAXIS XXI, pelas Bolsas que me foram concedidas.

Aos doentes e seus familiares, pelo incentivo e disponibilidade.

Por último, à minha família e amigos por toda a compreensão, pelo apoio e paciência.