



CURSO DE BACHARELADO EM BIOMEDICINA

SANDY SANTOS DE SOUZA

**MECANISMOS DA EPIGENÉTICA ASSOCIADOS AO
DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA
ADRENOLEUCODISTROFIA**

Apucarana
2023

SANDY SANTOS DE SOUZA

**MECANISMOS DA EPIGENÉTICA ASSOCIADOS AO
DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA
ADRENOLEUCODISTROFIA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Biomedicina da Faculdade de Apucarana –
FAP, como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof.^a Dra. Sara Mataroli de
Godoy

SANDY SANTOS DE SOUZA

**MECANISMOS DA EPIGENÉTICA ASSOCIADOS AO
DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA
ADRENOLEUCODISTROFIA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Biomedicina da Faculdade de Apucarana –
FAP, como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina, com
nota final igual a _____, conferida pela
Banca Examinadora.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Sara Mataroli de Godoy
Orientadora Faculdade de Apucarana

Prof. Esp. Luciano César Ferreira
Faculdade de Apucarana

Prof.^a Ma. Vera Lúcia Delmônico Vilela
Faculdade de Apucarana

Apucarana, 11 de novembro de 2023.

**Dedico este trabalho a minha
família e tutores, que muito
me apoiaram e incentivaram
a realizá-lo.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais uma realização de um sonho, a conclusão de um ensino superior.

A minha família, pelo constante apoio e acolhimento durante esse árduo processo.

A minha mãe Claudete Vanderleia dos Santos de Souza pelo constante apoio, com todo meu amor e gratidão por tudo que faz em minha vida, nada disso seria possível sem você.

A meu pai, Sergio Leite de Souza, que sempre incentivou o estudo e aperfeiçoamento para um futuro de qualidade, sempre com bons conselhos e um abraço acolhedor.

A meu irmão, Sergio Talisson dos Santos de Souza que é muito importante em minha vida e sempre me apoiou e aconselhou como irmão mais velho e melhor amigo.

A professora e orientadora Sara Mataroli, pela sabedoria e determinação com que me orientou durante as etapas deste trabalho e a forma como inspira o interesse pela pesquisa junto a universidade. Nada disso seria possível sem você, com eterna gratidão por me apresentar o mundo maravilhoso da genética e o fascínio por ela.

Aos professores e ademais profissionais da instituição, desde o protocolo até o laboratório que proporcionaram auxílio e ensinamentos valiosos ao decorrer dos quatro anos de curso.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

*"A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original"*

Oliver Wendell Holmes Sr.

SOUZA, Sandy Santos. **Mecanismos da epigenética associados ao diagnóstico e tratamento da Adrenoleucodistrofia**. 49 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo). Graduação em Biomedicina na Faculdade de Apucarana – FAP. Apucarana-Pr. 2023.

RESUMO

A adrenoleucodistrofia é uma doença caracterizada por uma alteração no gene *ABCD1* do cromossomo X, com incidência maior em meninos. Esta doença apresenta um acúmulo de ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA) nos peroxissomos, o que afeta a mielinização dos neurônios, prejudicando o sistema nervoso e a função adrenal. Na busca por terapias eficientes para a diminuição ou erradicação dos sintomas, a modulação epigenética pelo uso de medicamentos e o transplante de células tronco tem se mostrado promissor. A partir da observação de que muitas doenças neurodegenerativas são abordadas atualmente, tornou-se importante trazer evidenciar a adrenoleucodistrofia, visto que esta não é muito conhecida, ainda que seja relativamente comum à sua ocorrência em meio a população. Por essa razão, através de uma revisão bibliográfica com base em artigos científicos, o presente estudo teve por objetivo elucidar os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na etiologia genética da doença e nos métodos de diagnóstico e tratamento. Embora haja necessidade de mais estudos sobre a doença e formas de tratamento, os dados aqui levantados, mostram terapias genéticas promissoras para adrenoleucodistrofia.

Palavras-chave: Doença neurometabólica. Histonas. Neurodegeneração.

SOUZA, Sandy Santos. **Epigenetic mechanisms associated with the diagnosis and treatment of Adrenoleukodystrophy**. 49 p. Completion of course work (Paper). Bachelor's Degree in Biomedicine. FAP – College of Apucarana. Apucarana-Pr. 2023.

ABSTRACT

Adrenoleukodystrophy is a disease characterized by a mutation in the ABCD1 gene on the X chromosome, with a higher incidence in boys. This disease results in the accumulation of very long-chain fatty acids (VLCFA) in peroxisomes, affecting neuronal myelination and impairing the nervous system and adrenal function. In the search for efficient therapies to reduce or eradicate symptoms, epigenetic modulation through drug use and stem cell transplantation has shown promise. Given that many neurodegenerative diseases are currently being addressed, it is important to highlight adrenoleukodystrophy, which is relatively common but not widely known. Through a literature review based on scientific articles, this study aimed to elucidate the biochemical and molecular mechanisms involved in the genetic etiology of the disease, as well as diagnostic and treatment methods. While more research is needed on the disease and its treatment options, the data collected here show promising genetic therapies for adrenoleukodystrophy.

Keywords: Neurometabolic disease. Histones. Neurodegeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estágios de maturação dos Oligodendrócitos	15
Figura 2 – Demonstração do Redoxfluor em resposta a vários compostos redox....	19
Figura 3 – Heredograma ilustrando o padrão de herança ligada ao X.	21
Figura 4 – Potencial terapêutico do Vorinostat em desordens cerebrais.....	27
Figura 5 – Mecanismo dos vetores lentivirais usado na terapia gênica da X-ALD ...	29

LISTA DE SIGLAS

AAV.....	Vetores virais adeno associados
AB.....	Ácido butírico
ACALD.....	adrenoleucodistrofia cerebral adulta
ADOLCALD.....	adrenoleucodistrofia cerebral juvenil
AMN.....	adrenomieloneuropatia
ARSA.....	gene Arilsulfatase A
BBB.....	barreira hematoencefálica
CALD.....	adrenoleucodistrofia cerebral
CCALD.....	adrenoleucodistrofia cerebral infantil
DI.....	deficiência intelectual
ELOVL.....	complexo de alongamento dos ácidos graxos
HAT.....	histona acetiltransferase
HDAC.....	histona desacetilase
ID.....	inibidor ou diferenciador de proteínas
JAB1.....	proteína 1 de ligação ao domínio de ativação Jun
OL.....	oligodendrócitos
OPC.....	precursores de oligodendrócitos
OLIG.....	fatores de transcrição de oligodendrócitos
NGS.....	sequenciamento da próxima geração
PBA.....	ácido fenilbutírico
QI.....	quociente de inteligência
RNS.....	espécies reativas de nitrogênio
ROS.....	espécies reativas de oxigênio
RV.....	Revestarol
SAHA.....	ácido suberoilânilida hidroxâmico
SNC.....	sistema nervoso central
VLCFA.....	ácidos graxos de cadeia muito longa (do inglês, very long chain fatty acids)
X-ALD	adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X
XLID.....	disfunção no cromossomo X

SUMÁRIO

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
1.1 Adrenoleucodistrofia	11
1.2 Manifestações fenotípicas da Adrenoleucodistrofia	12
1.3 Estruturas envolvidas na Adrenoleucodistrofia	14
1.3.1 Mielina	14
1.3.2 Oligodendróцитos.....	15
1.3.3 Peroxissomos	16
1.4 Epigenética na Adrenoleucodistrofia.....	20
1.4.1 Cromossomo X	20
1.4.2 Modificações epigenéticas	21
1.4.2.1 Modificação das histonas	22
1.4.2.2 Oligodendróцитos e a epigenética	23
1.4.2.3 Histona desacetilase e inibidores	24
1.5 Diagnóstico da Adrenoleucodistrofia	24
1.6 Tratamentos na Adrenoleucodistrofia	25
1.6.1 Revestarol	25
1.6.2 Vorinostat	26
1.6.3 PBA e BA	27
1.6.4 Terapia genética celular	28
2 REFERÊNCIAS	31
3 ARTIGO	34
1 Introdução	36
2 Metodologia.....	37
3 Desenvolvimento	38
4 Considerações finais	46
5 Referências	47
4 ANEXO	49
Normas da Revista Brazilian Journal of Development	49

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Adrenoleucodistrofia

Em 1963 foi especulado que a adrenoleucodistrofia poderia ser uma doença hereditária ligada ao X, entretanto, foi somente em 1970 que o nome “adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X” (X-ALD - *x-linked adrenoleukodystrophy*) foi sugerido. Em 1987, Heubner observou um garoto com deterioração neurológica progressiva, condizente com a doença que, naquela época, era considerada ainda como uma vertente de “esclerose múltipla”. Em 1993, entretanto, Mosser junto aos seus colaboradores descobriram que mutações no gene *ABCD1* situado no cromossomo X (Xq28) eram responsáveis pela X-ALD (MORITA, 2019).

O gene *ABCD1* codifica uma proteína integral de membrana do peroxissomo, envolvida com a importação de ácidos graxos ou acil-CoAs para a β -oxidação peroxissomal (HETTEMA *et al.*, 1996; PALAKUZHIL; CHRISTOPHER; CHANDRA, 2020). A adrenoleucodistrofia é caracterizada pela perda da proteína ALD no cromossomo X que silencia o gene *ABCD1* e reduz a β -oxidação dos VLCFAs nas células, fazendo com que haja o acúmulo desses VLCFAs que aumentam a atividade dos complexos de alongamento dos ácidos graxos (ELOVLs), fazendo uma síntese de VLCFA em massa, resultando na inflamação desmielinizante (SHAH; SINGH, 2017). Portanto, a adrenoleucodistrofia é uma doença neurometabólica, de etiologia genética e herança recessiva ligada ao X, caracterizada pelo acúmulo de níveis tóxicos de ácidos graxos no cérebro, o que danifica as bainhas de mielina e prejudica a função neuronal, resultando em convulsões, dificuldade na fala, hiperatividade, lesões e atrofia musculares, além de outros sintomas (MELROSE, 2019).

A disfunção no cromossomo X, ou também conhecida como XLID, que ocorre em síndromes como a Adrenoleucodistrofia não é restrita apenas aos homens. No sexo feminino, o diagnóstico mais frequente ainda é a síndrome do X frágil, muitas vezes apresentando o fenótipo mais leve. Além disso, alguns distúrbios da XLID tem uma clara herança recessiva ligada ao X, como o caso da X-ALD podendo causar a letalidade precoce em homens (DE LUCA *et al.*, 2020). Essa vantagem feminina

decorre do fato da mulher apresentar dois cromossomos X, enquanto o homem apresenta apenas um (FANG; DENG; DISTECHE, 2021).

1.2 Manifestações fenotípicas da Adrenoleucodistrofia

De acordo com Morita (2019), os fenótipos encontrados na X-ALD são: a forma cerebral infantil (CCALD), a forma cerebral juvenil/adolescente (AdolCALD), a forma cerebral adulta (ACALD), a Adrenomieloneuropatia (AMN) e a síndrome de Addison. Cerca de 60% dos pacientes masculinos com X-ALD desenvolvem ALD cerebral (CALD), uma desmielinização inflamatória rapidamente progressiva do cérebro (ZIERFUSS *et al.*, 2020a).

A Adrenoleucodistrofia cerebral (CALD) é caracterizada por uma desmielinização cerebral progressiva com uma alta resposta inflamatória na substância branca levando a neurodegeneração ou morte antes do paciente chegar à adolescência. Pacientes com CCALD morrem ainda na primeira infância, enquanto pacientes diagnosticados com a doença que não apresentam o fator inflamatório, como a Adrenomieloneuropatia (AMN), vivem até 50 a 60 anos (SHAH; SINGH, 2017). Pacientes com CCALD são diagnosticados entre 5 aos 10 anos de vida, apresentando como sintomas um processo inflamatório na desmielinização do cérebro, além de um comportamento progressivo, cognitivo e deficiência neurológica com incapacidade total dos seis meses aos dois anos, que pode seguir a morte. Embora apresentem os mesmos sintomas que a CCALD e possuam um progresso lento da doença, a AdolCALD aparece entre os 10 a 20 anos de idade, enquanto a ACALD aparece a partir dos 21 anos nos pacientes (MORITA, 2019).

Pacientes diagnosticados com ACALD apresentam um risco ao longo da idade de apresentar um estado vegetativo, enquanto 45% dos pacientes diagnosticados com AMN possui um progresso lento e os sintomas são limitados a medula espinhal e a periferia dos nervos (MORITA, 2019).

A Adrenomieloneuropatia (AMN) atinge adultos e é caracterizada por axonopatia (similar a atrofia muscular), porém sem apresentar neuroinflamação ou neurodegeneração (SHAH; SINGH, 2017). Com relação a AMN, se apresenta a partir

dos 30 anos com uma desmielinização não inflamatória na medula espinhal e na periferia dos nervos, além de uma fraqueza nas pernas e rigidez progressiva, junto a uma sensação de vibração prejudicada nos membros inferiores, distúrbios no esfíncter anal e disfunção sexual (MORITA, 2019). Pacientes diagnosticados com AMN apresentam em seu organismo acúmulo de ácidos graxos de cadeia muito longa (*very long chain fatty acids* – VLCFA) no plasma e leucócitos, sendo confirmado na medição de ácidos graxos ou macrófagos (ZIERFUSS *et al.*, 2020a).

A portadora feminina é diagnosticada a partir dos trinta anos de idade, seus sintomas são anormalidades na medula espinhal e nos nervos das pernas, assim como a AMN. No geral, a maioria das portadoras femininas não apresentam sintomas antes dos 30 anos, embora 80% dessas portadoras apresentem os sintomas de disfunção neurológica a partir dos 60 anos. Pacientes diagnosticados com a Síndrome de Addison não apresentam sintomas neurológicos embora apresentem a função adrenal prejudicada (MORITA, 2019).

Pacientes diagnosticados com X-ALD, mais especificamente os diagnosticados com CALD apresentam nas lesões cerebrais células espumosas. Essas células são constituídas por macrófagos carregados de lipídios que se acumulam na mielina e alteram a homeostase lipídica. No sistema nervoso central, encontramos na micróglia macrófagos responsáveis pela remielinização por meio da depuração da mielina rica em lipídios (ZIERFUSS, *et al.*, 2020a). Na X-ALD, durante a fagocitose da mielina, as células presentes nela adotam um aspecto espumoso aumentado, ficando semelhante aos macrófagos que são carregados de lipídios nas placas de ateroma. Dessa forma, é observado nos pacientes com CALD o aumento de células espumosas e a elevação do número de macrófagos pró-inflamatórios CD8 positivos, que demonstram a má absorção dos resíduos de mielina e células micróglia que acometem o sistema nervoso central (ZIERFUSS, *et al.*, 2020a).

1.3 Estruturas envolvidas na Adrenoleucodistrofia

1.3.1 Mielina

A mielina é uma substância rica em proteína e lipídios produzida pelos oligodendrócitos (OL) no sistema nervoso central (SNC) e pelas células de Schwann no sistema nervoso periférico (SNP), que envolve os axônios neuronais, formando uma bainha. Por se apresentar relativamente mais clara, essa estrutura é também chamada de substância branca e é responsável pela condução rápida e eficiente do potencial de ação entre um axônio e outro, auxiliando na sobrevivência neuronal e estrutura axonal. Caso haja lesões na substância branca, doenças neurodegenerativas, como leucodistrofias, podem se desenvolver (RIVELLINI *et al.*, 2021).

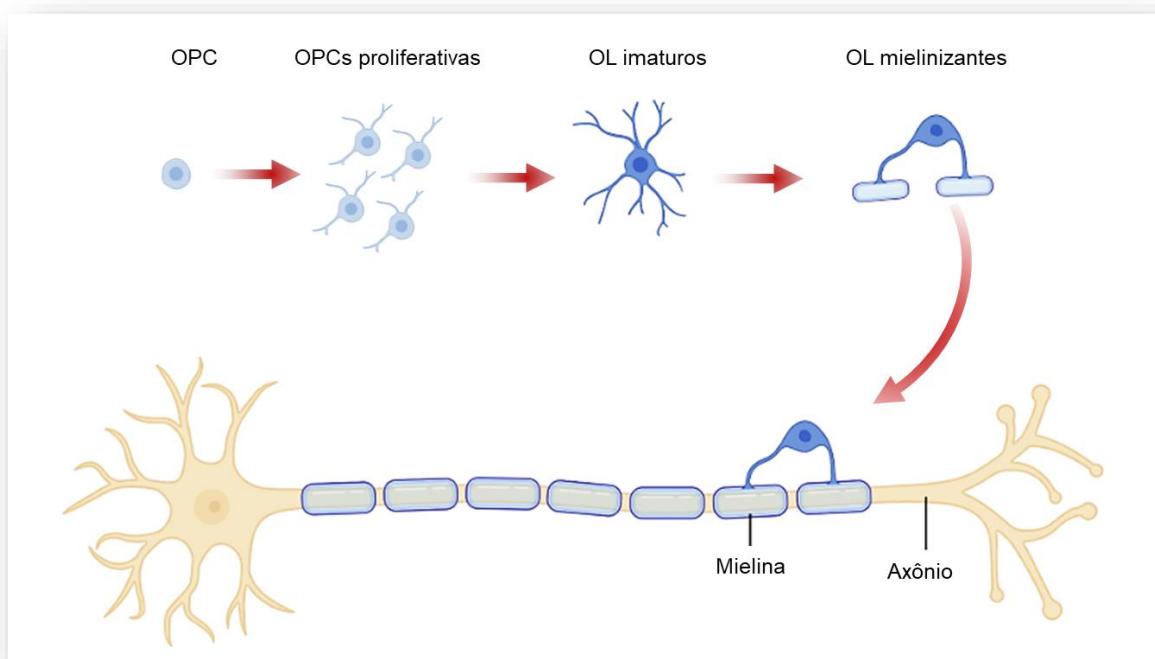
A mielina é uma estrutura lipídica que isola o axônio e permite sua condução nervosa. No SNC, a bainha de mielina é baseada no empacotamento de inúmeras membranas de oligodendrócitos e células de Schwann, e antes de atingir a capacidade de mielinização, os oligodendrócitos passam por um processo de maturação (MARANGON *et al.*, 2021). A mielina, no SNC, é caracterizada pelos sinais do ambiente transmitidos a ela e pelas propriedades dos oligodendrócitos. Os oligodendrócitos dependem diretamente dos processos de diferenciação, migração e mielinização para se desenvolverem, além de fatores inerentes à maturação do axônio (BUTT; IBRAHIM; BERRY, 1997; LEFERINK; HEINE, 2018).

Dado a correlação entre o axônio e o oligodendrócito, a atividade neuronal é quem define o número de progenitores de oligodendrócitos e a quantidade de mielina formada, mudanças nessa atividade interferem na liberação dos neurotransmissores presentes na atividade neuronal. Temos como exemplo o processo de mielinização que ocorre quando axônios não mielinizados geram potenciais de ação que liberam o neurotransmissor glutamato, que ao se conectar aos receptores de glutamato permite a mielinização. Porém, por depender do processo de maturação do OL e da localização no cérebro, esses receptores de glutamato possuem funções reguladoras específicas. Em processos patológicos que envolvam a substância branca, os oligodendrócitos, geralmente, são afetados (LEFERINK; HEINE, 2018).

1.3.2 Oligodendrócitos

Os oligodendrócitos (OL) são responsáveis por fornecerem auxílio metabólico e funcional às células do sistema nervoso central. As células precursoras dos oligodendrócitos (OPC) se originam em estágios iniciais do desenvolvimento embrionário e possuem a capacidade de se proliferar e se diferenciar em oligodendrócitos produtores de mielina. Esse processo de maturação envolve quatro tipos celulares: OPCs, OPCs proliferativas, OL imaturos ou pré-mielinizantes e OLs mielinizantes (Figura 1) (SUTER; HE, 2021).

Figura 1 – Estágios de maturação dos Oligodendrócitos



Adaptado de MIRON; HUANG (2023)

Os precursores de oligodendrócitos (OPCs) são células que se dividem rapidamente durante a embriogênese e se transformam em células quiescentes com capacidade de mielinização após uma lesão. Ao longo de sua diferenciação em células maduras mielinizantes, as OPCs ligam-se com outras células gliais e neurônios no qual formam sinapses e junções comunicantes. Alguns fatores que podem contribuir no direcionamento dos OPCs são neurotransmissores, sinais axonais, citocinas e proteínas da matriz extracelular. Esses fatores modulam o tempo de maturação

indicando sua migração ou então mantendo-os indiferenciados com uma proliferação lenta (NISHIYAM; SERWANSKI; PFEIFFER, 2021).

Considerado como alvo primário de distúrbios desmielinizantes, os oligodendrócitos foram estudados, em camundongos, evidenciando que ao sofrerem deleção autônoma nas células do SNC, desenvolvem danos no DNA e causam um reparo defeituoso em células mielinizantes. Por serem sensíveis a danos ao DNA e ao estresse oxidativo, os oligodendrócitos sofrem perda axonal progressiva e são considerados cruciais no diagnóstico de patologias neurodegenerativas (RIVELLINI *et al.*, 2021).

A proteína 1 de ligação ao domínio de ativação Jun (JAB1) é uma proteína nuclear multifuncional envolvida no controle de vários aspectos da função celular por meio da transcrição de genes e degradação de proteínas. A perda da proteína JAB1 gera danos progressivos ao DNA em oligodendrócitos que produzem um processo similar a senescência, esses oligodendrócitos senescentes geram inflamação e o estresse oxidativo difuso, promovendo a neurodegeneração. Foi constatado que o JAB1 é responsável por definir o destino celular a partir do reparo do DNA. Quando essa proteína é ausente, o destino da célula varia de acordo com a extensão do dano ao DNA, podendo gerar apoptose ou senescência. As células senescentes geradas liberam elementos inflamatórios e produzem espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS) nos peroxissomos, amplificando o dano celular (RIVELLINI *et al.*, 2021).

1.3.3 Peroxissomos

Os peroxissomos são organelas de células eucarióticas, delimitadas por membranas que surgem a partir do retículo endoplasmático devido a união de vesículas mitocondriais e de estruturas derivadas do retículo endoplasmático. Conhecida pelo seu papel ativo no metabolismo de complexos lipídicos e de espécies iônicas reativas, esta organela garante, por meio da sua plasticidade, uma resposta rápida às necessidades celulares (DI CARA *et al.*, 2023).

Os peroxissomos estão presentes nas células de todo o organismo, e suas principais funções envolvem a α - e β -oxidação de ácidos graxos, biossíntese de éter-fosfolipídios e ácidos biliares, bem como a detoxificação celular (FRANSEN; LISMONT, 2019). A β -oxidação no peroxissomo produz como subproduto o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que depende da taxa de oxidação do comprimento do ácido graxo de cadeia muito longa a ser oxidado. O H_2O_2 é decomposto pela catalase sendo separado em H_2O e O_2 , moléculas que contribuem na produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (*reactive nitrogen species* - RNS) que auxiliam no metabolismo redox nos peroxissomos. A β -oxidação que os ácidos graxos sofrem confere uma regulação da maturação das células B, ativação das células T e a secreção de citocinas inflamatórias, promovendo o controle da resposta imune do organismo (DI CARA *et al.*, 2023).

Além dos peroxissomos possuírem papel fundamental na metabolização de lipídios e H_2O_2 , eles são responsáveis também pela proteção e modulação do equilíbrio redox, cujas alterações culminam no envelhecimento e no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (FRANSEN; LISMONT, 2019). De acordo com Morita (2019) as doenças nos peroxissomos podem ser apresentadas em duas formas: distúrbios da biogênese do peroxissomo ou deficiências enzimáticas localizadas. As deficiências enzimáticas localizadas manifestam sintomas que atuam em um órgão específico ou no transporte metabólico de substratos no peroxissomo por meio dos transportadores ABC, assim como na oxidação de ácidos e na síntese de éter-fosfolipídios (MORITA, 2019).

Sendo considerados essenciais a sustentação da vida, o estado redox é definido pelo grau de oxidação ou redução, respectivamente, a perda ou o ganho de elétrons em uma reação química. As alterações nas vias de oxirredução podem afetar o estresse redox, desencadeando diversas respostas do organismo, modulando os sinais que o corpo recebe e causando danos oxidativos graves. Por apresentarem a capacidade de mediar os eventos de sinalização conduzidos por redox, os peroxissomos apresentam algumas ferramentas de monitoração das alterações redox, como: sensores fluorescentes (substâncias químicas sensíveis a oxidação que podem penetrar nas células e são oxidadas por moléculas fluorescentes) e sensores redox fluorescentes (codificados geneticamente, são direcionados para vários lugares por sinalização específica) (FRANSEN; LISMONT, 2019).

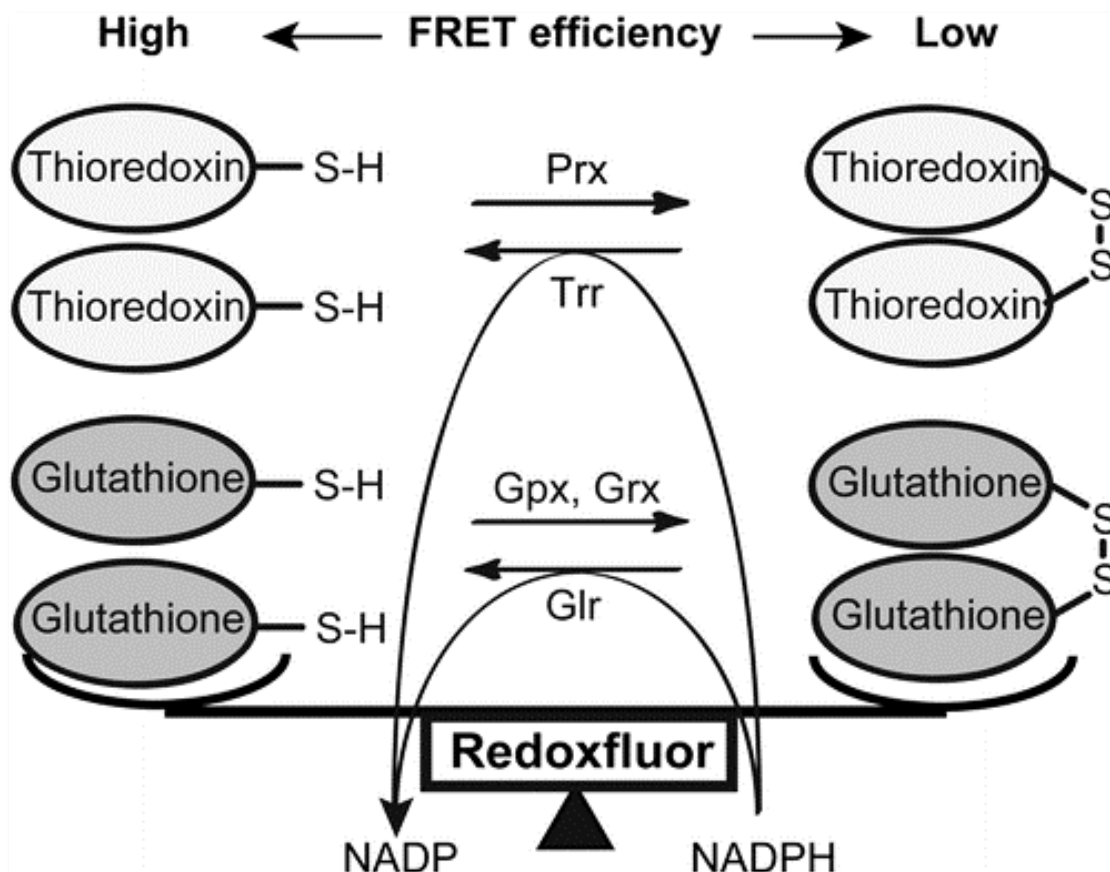
Quando há um desequilíbrio na produção e na remoção de ROS nos peroxissomos, ocorre o que chamamos de estresse oxidativo. Este acúmulo de espécies reativas provoca alterações epigenéticas e culmina em danos ao DNA e no envelhecimento. Algumas dessas alterações envolvem disfunção mitocondrial, dano oxidativo e inflamação. Dessa forma, o acúmulo de radicais livres ao longo do tempo gera um aumento na inflamação e estresse, o que perturba o equilíbrio homeostático entre as citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, promovendo a neurodegeneração e diminuição da função cognitiva (GRINAN-FERRE *et al.*, 2021). Hoje, sabe-se que, quando as células têm seu equilíbrio redox perturbado, elas reagem com respostas adaptativas, cujos impactos são condizentes a adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (FRANSEN; LISMONT; 2019). Nesta doença os peroxissomos apresentam uma elevação de ROS e redução das enzimas antioxidantes como a catalase, glutatona e peroxidase, tanto no cérebro quanto na medula, além de apresentarem aumento excessivo de VLCFAs saturados (DI CARA *et al.*, 2023).

Os oxidantes celulares são encontrados em diversos locais (como mitocôndria, retículo endoplasmático, peroxissomos etc.) e para evitar danos nas células causados pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, os peroxissomos funcionam por meio de um sistema de defesa antioxidante. Tal sistema pode ser enzimático, utilizando a catalase e a tiorredoxina, ou não enzimático, empregando o ácido ascórbico e a glutatona. Alterações nesse sistema contribuem diretamente ou indiretamente para o desenvolvimento de doenças (FRANSEN; LISMONT, 2019). Da mesma forma, o equilíbrio redox pode ser perturbado por inflamação ou disfunção mitocondrial. Entretanto, conforme mencionado por Grinan-Ferre *et al.* (2021) em condições fisiológicas, as enzimas antioxidantes mantêm em níveis relativamente baixo as ROS.

Um método que pode ser usado na detecção de ROS é o Redoxfluor, um sensor redox baseado em transferência de energia de ressonância de fluorescência, que consiste em um domínio central rico em cisteína, flanqueado por proteínas em suas extremidades N-terminal e C-terminal. Este indicador tem como princípio que durante a oxidação é formado uma ligação dissulfeto que reduz a emissão da taxa de fluorescência na estrutura do peroxissomo. O Redoxfluor é caracterizado por apresentar vários metabólitos relacionados ao estado redox e, na célula, detecta principalmente os potenciais redox da glutatona e da tiorredoxina (Figura 2). Sendo

assim, esse indicador é usado para comparar o estado redox dentro dos peroxissomos (FRANSEN; LISMONT, 2019).

Figura 2 – Demonstração do Redoxfluor em resposta a vários compostos redox.



Fonte: OKU, SAKAI (2012).

As alterações condicionadas a ROS que são identificadas nos sensores genéticos como no Redoxfluor, podem ser reversíveis, permitindo dessa forma medições em tempo real para acompanhar as possíveis variações. Alterações genéticas que interfiram na estruturação dos peroxissomos e no desempenho de suas funções podem desencadear doenças graves, como por exemplo a adrenoleucodistrofia (PALAKUZHIL; CHRISTOPHER; CHANDRA, 2020).

1.4 Epigenética na Adrenoleucodistrofia

1.4.1 Cromossomo X

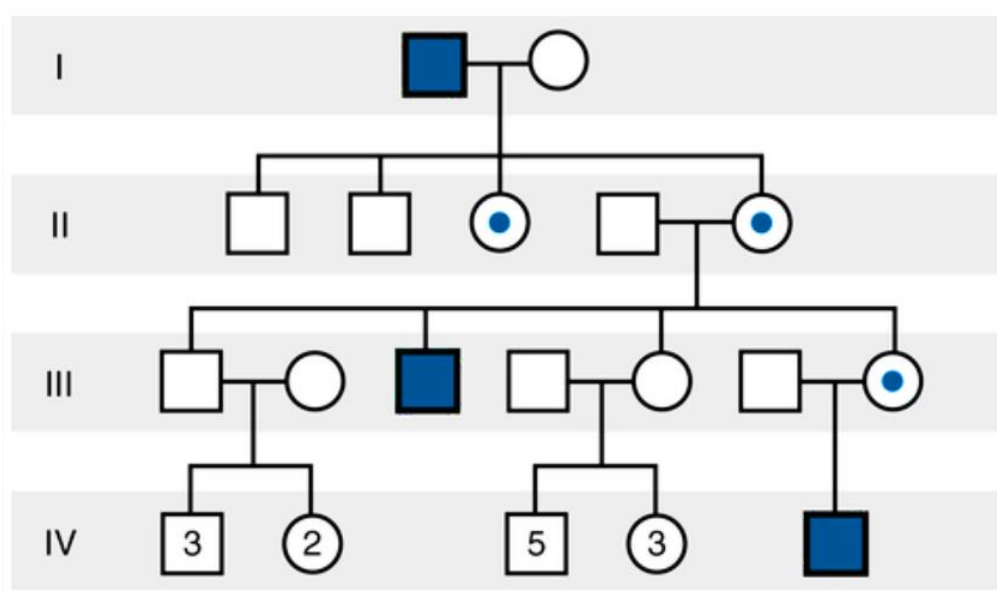
Mudanças epigenéticas representam uma ocorrência regular e natural, que podem ser influenciadas por fatores como idade, ambiente e estágio de uma doença (ZUSSO *et al.*, 2018). Para compensar a dosagem gênica do cromossomo X entre homens e mulheres, as células das mulheres dispõem de mecanismos epigenéticos de inativação de um dos cromossomos X. Esse processo ocorre nos estágios mais iniciais do desenvolvimento embrionário e é aleatório, o que resulta em populações de células com X materno inativo e populações de células com o X paterno inativo. Esse mecanismo tem efeitos significativos nas doenças ligadas ao X, uma vez que os homens herdam um único alelo materno, enquanto as mulheres expressam alelos maternos e paternos em mosaico. Além disso, existem genes que não sofrem inativação no cromossomo X e são expressos a partir de ambos os alelos nas mulheres, adicionando complexidade ao quadro (FANG; DENG; DISTECHE, 2021).

Dentre os muitos genes presentes no cromossomo X que podem estar envolvidos em condições patogênicas, encontra-se o *ABCD1*. Tal gene codifica o transportador peroxissomal de ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFAs) e mutações em sua sequência estão relacionadas à adrenoleucodistrofia. Nas mulheres heterozigotas, a inativação aleatória do X pode culminar em linhagens de células cujo X contendo a cópia normal do gene *ABCD1* é inativado e, nesse caso, a presença da cópia mutada do gene *ABCD1* não permitirá a produção de proteínas funcionais (FANG; DENG; DISTECHE, 2021).

De Luca *et al.* (2020) diz que, clinicamente, a disfunção intelectual (DI) pode ser dividida em formas não sindrômicas e sindrômicas, dependendo da ausência ou presença de outras características clínicas. Geneticamente, uma distinção pode ser feita com base na localização da alteração, seja no cromossomo X (XLID) ou em um dos 22 pares autossômicos. Devido ao excesso de homens diagnosticados com DI (Figura 3), foi realizada uma pesquisa que identificou na população masculina um número aumentado de genes de deficiência intelectual no cromossomo X, dos quais, 40% são expressos no cérebro. Assim, devido ao fato de as células masculinas

apresentarem um único cromossomo X, os homens acabam sendo mais vulneráveis a essas doenças (DE LUCA *et al.*, 2020). Quando a expressão dos genes localizados no cromossomo X é alterada, geralmente as regiões do córtex, hipotálamo e músculos são mais afetadas (FANG; DENG; DISTECHE, 2021).

Figura 3 – Heredograma ilustrando o padrão de herança ligada ao X. Os homens afetados apresentam um símbolo preenchido por completo e as mulheres portadoras possuem um pequeno ponto centralizado em seu símbolo.



Fonte: NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD (2008).

1.4.2 Modificações epigenéticas

Mecanismos epigenéticos são modificações hereditárias que alteram a expressão gênica, sem necessariamente alterar a sequência de DNA. A manutenção e o controle epigenético é dado por fatores como a metilação do DNA, modificação de histonas e microRNAs. A metilação do DNA envolve o acréscimo de um grupo metil (CH_3) a uma base de citosina ligado a uma guanina, formando o dinucleotídeo 5'citosina-guanina-3', que é adicionado em regiões ricas em CG (ilhas CpG) nos promotores dos genes (TIANE *et al.*, 2019).

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes (ncRNA) de 21 a 25 nucleotídeos, que fazem parte da classe de RNAs de interferência (iRNAs),

juntamente com os pequenos RNAs de interferência (siRNAs). Esses iRNAs são capazes de ligar à RNAs mensageiros (mRNA) e silenciar sua expressão, participando do processo de controle da expressão gênica. Os miRNA são usados em processos pós-transcricionais e atuam na patogênese de várias doenças, incluindo as neurodegenerativas como a adrenoleucodistrofia (SHAH; SINGH, 2017).

Existem dois tipos de modificações epigenéticas que ocorrem no DNA ou na cromatina: as que modificam diretamente no DNA (hipo ou hipermetilação do DNA) e as que modificam proteínas de ligação ao DNA (modificação de histonas). Essas alterações ocorrem de forma previsível, porém, ao contrário das mutações nas sequências de DNA, essas modificações epigenéticas são reversíveis (GHEORGHE *et al.*, 2022).

1.4.2.1 Modificação das histonas

Histonas são proteínas nucleares envoltas no DNA que formam os nucleossomos. As caudas N-terminais das histonas ficam expostas e podem sofrer acetilação, metilação, fosforilação ou ubiquitilação (ZUSSO *et al.*, 2018).

De forma resumida, pode-se dizer que a metilação das caudas das histonas resulta em expressão gênica aumentada ou reduzida, dependendo da forma como o aminoácido sofre a metilação nos resíduos de lisina. Ao contrário da metilação, a acetilação das caudas das histonas está exclusivamente associada a expressão genética. Existem evidências denotando o envolvimento da histona acetiltransferase e da histona desacetilase (HDAC - *histone deacetylase*) em vários processos cognitivos, propondo que a regulação dinâmica da histona, onde o status de acetilação estaria associado à plasticidade sináptica e memória. A fosforilação de histonas geralmente está associada com dano ao DNA, causando danos no hipocampo e astrócitos corticais em pacientes com síndrome de Alzheimer. A ubiquitilação das histonas é outra consequência de danos no DNA, sendo importante na regulação e manutenção de células-tronco e diferenciação, incluindo células-tronco neurais. A ubiquitinina representa uma família de pequenas proteínas capazes de modificar a função de outras proteínas através de interações covalentes (ZUSSO *et al.*, 2018).

Existem enzimas que adicionam modificações, como histonas metiltransferases, e outras que removem essas modificações, incluindo histonas demetilases. Uma complexa interação entre ativar e reprimir as modificações das histonas é a principal via reguladora para a expressão gênica. Assim por meio de metilações e acetilações em resíduos de lisina encontrados nas terminações das histonas, é possível alterar o nível de compactação da cromatina e, por consequência, controlar a expressão gênica. Com uma estrutura menos compactada, como no caso da eucromatina, a transcrição gênica é frequente, enquanto níveis maiores de compactação, como os encontrados na heterocromatina, a transcrição gênica é, na maioria das vezes, ausente (ZUSSO et al, 2018).

As enzimas responsáveis pela acetilação das histonas são chamadas de acetiltransferases (HAT) enquanto as histonas que removem um grupo acetil da histona são chamadas de histonas desacetilase (HDAC), sendo que ambas atuam na estrutura da cromatina. A HAT promove a descompactação da cromatina, ativando o processo de transcrição, enquanto a HDAC promove a condensação da cromatina, inibindo o processo de transcrição. Durante a ativação de um gene há a participação da acetilação dos resíduos de lisina, presentes nas histonas, que devido a sua carga negativa facilita o relaxamento da estrutura da cromatina, promovendo a transcrição do DNA (ATHIRA; SADANANDAN; CHAKRAVARTY, 2021).

1.4.2.2 Oligodendrócitos e a epigenética

Quando essas modificações epigenéticas ocorrem nos oligodendrócitos (OL), principalmente a desmetilação do DNA e a desacetilação, elas interferem na maturação e diferenciação dessas células (TIANE et al., 2019).

O mau funcionamento epigenético interfere especificamente na regeneração e remielinização do oligodendrócito resultando no envelhecimento de células e doenças relacionadas. O envelhecimento é atribuído a diminuição da eficiência da remielinização por conta do nível reduzido de recrutamento do OPC, visto que a metilação do DNA atua diretamente na maturação do oligodendrócito e impede que essas células sofram senescência antes do previsto. Quando na X-ALD, a inibição da metilação do DNA

interfere na diferenciação dos oligodendrócitos impedindo sua maturação, culminando as células a senescência ou apoptose (TIANE *et al.* 2019).

1.4.2.3 Histona desacetilase e inibidores

A enzima histona desacetilase (HDAC) tem em sua estrutura a presença de um cátion Zn^{2+} em seu sítio catalítico, que catalisa a desacetilação nos resíduos de lisina, reestabelecendo a carga positiva e diminuindo o acesso aos fatores de transcrição, o que inibe a expressão do gene. As moléculas químicas inibidoras da HDAC buscam interromper as atividades desempenhadas pela enzima, incluindo sua interferência na expressão gênica. Os inibidores da histona desacetilase podem ser utilizados no tratamento de diversas doenças que afetam o cérebro, como X-ALD, e possuem mecanismo dependente do tipo de inibidor, a natureza da doença e a dosagem usada a ser utilizada (ATHIRA; SADANANDAN; CHAKRAVARTY, 2021).

1.5 Diagnóstico da Adrenoleucodistrofia

Diante da análise de um paciente com o possível diagnóstico de X-ALD, um bom exame clínico deve ser conduzido por um geneticista clínico treinado, avaliando a presença de estatura baixa, macro ou microcefalia, pele seca ou escamosa, marcadores neurocutâneos, anormalidades de pigmentação, polegares aduzidos e anormalidades nos órgãos genitais, olhos ou cabelo. Além da análise visual e macroscópica, exames físicos e bioquímicos também são importantes como método de diagnóstico, como: triagem metabólica, avaliação auditiva, ressonância magnética e exame oftalmológico (DE LUCA *et al.*, 2020).

A importância de um diagnóstico genético molecular é que este pode ajudar a prevenir uma possível manifestação secundária. O diagnóstico molecular também permite um prognóstico geral, possibilitando a identificação do fenótipo funcional, e direcionando para intervenções terapêuticas e educacionais específicas. Além disso, o diagnóstico genético é um grande aliado no planejamento reprodutivo futuro, possibilitando análises mais assertivas durante o processo de pré-implantação, na

fertilização in vitro (FIV), além do diagnóstico genético pré-natal (DE LUCA *et al.*, 2020). A expressão de miRNAs junto a quantificação de VLCFAs podem servir como um biomarcador de pré-diagnóstico ou pós-diagnóstico em CCALD e AMN, auxiliando na diferenciação dos fenótipos AMN e CCALD da X-ALD (SHAH; SINGH, 2017).

O diagnóstico de XLID também pode ser feito em consulta médica, desde que seja possível construir a árvore genealógica do paciente, com no mínimo três gerações anteriores (DE LUCA *et al.*, 2020).

1.6 Tratamentos na Adrenoleucodistrofia

A nutrição e a suplementação são elementos que auxiliam no impedimento do declínio cognitivo condicionado a idade, um dos fatores relacionados a Adrenoleucodistrofia. Visto que a nutrição está relacionada a estruturação e funcionalidade do cérebro, a utilização de moléculas antioxidantes como polifenóis auxilia na redução do estresse oxidativo, redução da inflamação e a manutenção da integridade mitocondrial (GRINAN-FERRE *et al.*, 2021).

Uma das formas de tratamento da Adrenoleucodistrofia é a minimização de riscos por meio do uso de medicamentos terapêuticos que podem reduzir os sintomas ou então manter o paciente em estágio assintomático se diagnosticados com X-ALD (MORITA, 2019). Zierfuss *et al.* (2020a) também propõe a estratégia terapêutica medicamentosa baseada na reprogramação farmacológica do metabolismo lipídico em pacientes diagnosticados com CCALD, visto que a presença de células espumosas representa macrófagos disfuncionais, e certos medicamentos buscam reverter essa disfuncionalidade.

1.6.1 Revestarol

Alguns polifenóis, como o Revestarol (RV), são encontrados em vegetais e frutas, especialmente em uvas, amendoim, vinho tinto e frutas vermelhas. O uso desse polifenol está relacionado a atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, anticancerígenas e antienvelhecimento. Já foi observado que o RV pode prevenir ou

retardar a progressão de doenças, especialmente as neurodegenerativas. Dessa forma, o uso de RV como forma de prevenção pode auxiliar na mediação das alterações epigenéticas envolvidas no envelhecimento e no SNC. A atividade antioxidante do RV permite, ainda, a eliminação de radicais livres e metais, reduzindo o estresse oxidativo e melhorando a expressão de genes relacionados a memória, consequentemente, reduzindo a formação de ROS e promovendo a produção de enzimas antioxidantes (GRINAN-FERRE *et al.*, 2021). Uma outra proposta de tratamento com base em moléculas de origem vegetal é o uso do Glucosinolato, associados a manutenção da saúde do cérebro (MELROSE, 2019).

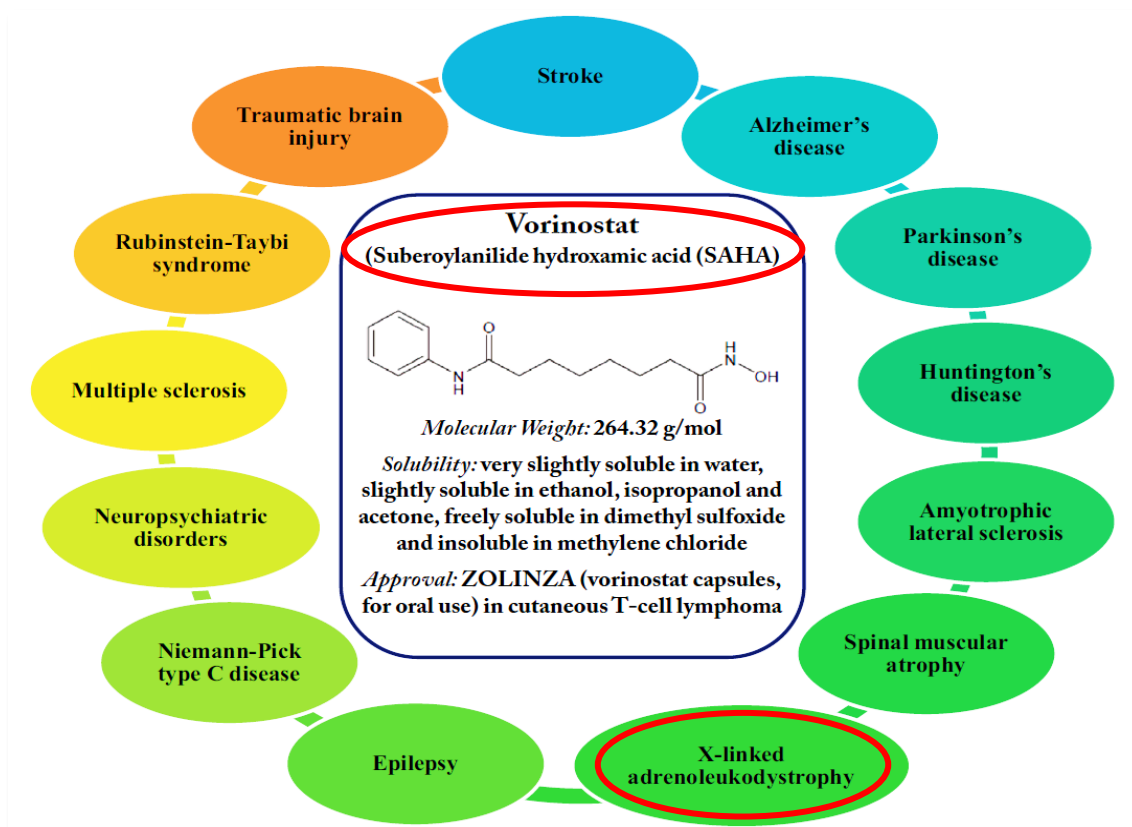
1.6.2 Vorinostat

O Vorinostat (também conhecido como ácido suberoilânilida hidroxâmico – SAHA) (Fig. 5) representa um dos inibidores da HDAC que apresenta um grupo de ácido hidroxâmico que se liga a um íon metálico, neste caso o Zn^{2+} , inibindo a ação da histona desacetilase. Este inibidor é usado para induzir a interrupção do crescimento e a morte celular das células mutadas, promovendo um acúmulo de histonas acetiladas e fatores de transcrição, o que propicia a expressão gênica. O Vorinostat tem como alvo os supressores tumorais, proteínas estruturais, proteínas de regulação de proliferação celular, da angiogênese e do estresse oxidativo (ATHIRA; SADANANDAN; CHAKRAVARTY, 2021). O ácido suberoilânilida hidroxâmico (SAHA) é um potente e seletivo inibidor de HDAC classe I e II, sendo útil para a normalização dos níveis de VLCFA (SHAH; SINGH, 2017).

Com relação a Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X, o Vorinostat tem ação específica na indução da expressão da proteína ABCD2, na β -oxidação peroxissômica e na diminuição do acúmulo de VLCFA, fazendo assim uma compensação da deficiência da proteína ABCD1 (ATHIRA; SADANANDAN; CHAKRAVARTY, 2021). O tratamento com SAHA impede a perda de células de oligodendrócitos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, neutralizando o desarranjo de VLCFA associado à patologia X-ALD (TIANE *et al.*, 2019).

Estudos realizados no tratamento com SAHA demonstraram que a aplicação do inibidor da histona desacetilase, especificamente o HDAC3 (membro da família HDAC), corrigiu parcialmente os defeitos imunológicos e metabólicos causados em macrófagos na X-ALD, se mostrando essencial para a regulação do metabolismo de lipídios em macrófagos. A deleção desse inibidor específico pode causar o aumento do acúmulo lipídico junto ao número de células espumosas na mielina, produzindo a neuroinflamação (ZIERFUSS *et al.*, 2020a). O potencial terapêutico do Vorinostat pode ser visto na figura 4.

Figura 4 – Potencial terapêutico do Vorinostat em desordens cerebrais



Adaptado de ATHIRA, SADANANDAN, CHAKRAVARTY (2021)

1.6.3 PBA e BA

O ácido butírico (AB) seu derivado, o ácido fenilbutírico (PBA) são utilizados como um método terapêutico em distúrbios lipídicos, estimulando a β -oxidação de

ácidos graxos. O ácido butírico é um produto de fermentação anaeróbica das bactérias que pode ser encontrado no intestino humano e possui um período curto de permanência no organismo. Encontrado em gordura animal e em óleos vegetais, além de atuar junto a outros ácidos no intestino humano, o AB age como um inibidor da HDAC, assim como o PBA (HE; MOREAU, 2019).

O ácido 4-fenilbutírico (PBA - *4-phenylbutyric acid*) atua como um estimulador da transcrição gênica no retículo endoplasmático facilitando na formação de proteínas. O PBA possui sua ação inibitória na lipólise (quebra de um lipídio), favorecendo a lipogênese (síntese de ácidos graxos e triglicérides). Este ácido atua na lipogênese como estimulador ou inibidor, enquanto o ácido butírico (*butyric acid* - BA) induz à lipólise. A ação inibitória de BA na lipogênese, culmina no catabolismo dos ácidos graxos por meio da β -oxidação. O ácido butírico também é usado como promotor de alterações epigenéticas por meio do reposicionamento do nucleossomo (HE; MOREAU, 2019).

Quando estimula a β -oxidação de ácidos graxos na X-ALD, o PBA corrige os níveis de ácido lignocérico em fibroblastos e os níveis de ácido cerótido em linfoblastóides. Além disso atua na β -oxidação do ácido palmítico em fibroblastos primários, melhorando a oxidação de ácidos graxos na mitocôndria e no peroxissomo (HE; MOREAU, 2019). A redução do dano oxidativo retarda o envelhecimento e o desenvolvimento de patologias neurodegenerativas, de forma que terapias antioxidantes podem auxiliar na imitação do sistema de defesa antioxidante natural do organismo, prolongando a vida do paciente (GRINAN FERRE *et al.*, 2021).

1.6.4 Terapia genética celular

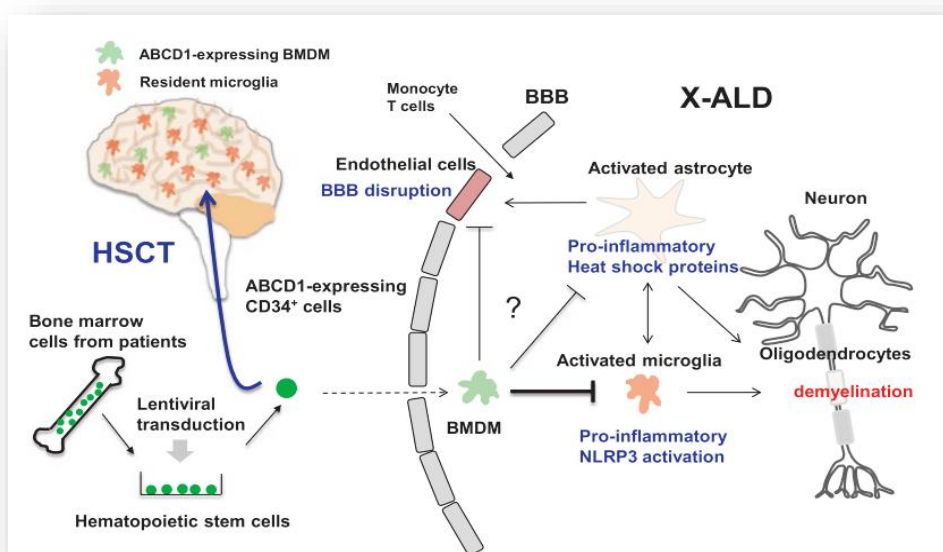
Em uma pesquisa direcionada a Síndrome do X frágil, o uso da terapia gênica mediada por vetores virais adeno associados (AAV) permitiram a expressão da proteína de funcionamento intelectual no X frágil, que estava reduzida ou ausente, corrigindo ou ativando parcialmente a atividade (HAMPSON; HOOPER; NIBORI, 2019).

Os lentivirais são vírus de RNA da família *Retroviridae*, que por meio dos seus derivados, os vetores lentivirais, são utilizados atualmente como método de entrega

das células tronco hematopoiéticas, visto que esta tem participação na correção de genes por meio da adição ou edição do gene, servindo como um ótimo modelo de terapia gênica em distúrbios como a X-ALD. O que torna estes vetores lentivirais capazes dessa atividade de entrega é sua capacidade de acomodar transgenes relativamente grandes, com um tamanho de até 10 kb (kilobases) (PSATHA *et al.* 2022).

A terapia gênica realizada por meio do transplante de células tronco hematopoiéticas CD34⁺, contendo a cópia funcional do gene *ABCD1*, é capaz de interromper a desmielinização neuronal no cérebro. As células tronco hematopoiéticas CD34⁺ são coletadas da medula óssea dos pacientes e isoladas. Um vetor lentiviral, contendo uma cópia do gene *ABCD1*, é transferido (transdução) para a célula CD34⁺. As células CD34⁺ modificadas são reintroduzidas no paciente, e migram para o parênquima central através da barreira hematoencefálica (*brain blood barrier* - BBB), diferenciando-se em células parecidas com macrófagos. Esses macrófagos derivados da medula óssea (*bone marrow-derived macrophages* - BMDMs) interagem com a micróglia, astrócitos ou as células endoteliais, restaurando a homeostase metabólica, suprimindo a neuroinflamação (MORITA, 2019). Um esquema do processo de terapia gênica mencionado pode ser visto na figura 5.

Figura 5 – Mecanismo dos vetores lentivirais usado na terapia gênica da X-ALD



Fonte: MORITA (2019)

A terapia gênica quando aplicada em um estágio inicial da doença, pode diminuir a neuroinflamação de pacientes diagnosticados com CCALD. Devido a troca de mononucleares (células imunes que são mais afetadas durante o metabolismo de VLCFA) na terapia gênica, as células-alvo passam por uma reprogramação metabólica (ZIERFUSS *et al.*, 2020a). O transplante células CD34⁺ autólogas transduzidas com um vetor lentiviral Lenti-D (composto por um DNA complementar *ABCD1*), permitiu a restauração da proteína ALD e estabilização da doença em meninos diagnosticados com CCALD. Houve uma melhora significativa nos garotos participantes da pesquisa, demonstrando que o transplante de células-tronco é uma alternativa segura e eficaz de terapia em meninos com adrenoleucodistrofia cerebral em estágio inicial (EICHLER *et al.*, 2017).

Outras vantagens também proporcionadas pelo uso de lentivirais em tratamento de leucodistrofias, como na leucodistrofia metacromática desmielinizante, é o desenvolvimento cognitivo normal e a desmielinização prevenida ou retardada, pelo uso de células CD34⁺ autólogas contendo o gene arilsulfatase A (*ARSA*) no organismo afetado. Entretanto este medicamento apresentou riscos quando aplicado em pacientes sintomáticos, sendo direcionado apenas a pacientes assintomáticos (SHAIMARDANOVA *et al.*, 2023).

A terapia de reposição celular é usada como uma das opções de tratamento, entretanto, embora as células transplantadas sejam espalhadas pelo cérebro com sucesso, a recuperação é dificultosa. Dessa forma, as estratégias terapêuticas utilizadas na regeneração da mielina devem incluir mais do que apenas a substituição de células (LEFERINK; HEINE, 2018). Portanto a identificação de novos mecanismos é indispensável para a pesquisa e desenvolvimento de terapias direcionadas, como as de reposição enzimática ou, mais recentemente, de edição de genes (DE LUCA *et al.*, 2020).

2 REFERÊNCIAS

- ATHIRA, K.V.; SADANANDAN, P.; CHAKRAVARTY, S. Repurposing Vorinostat for the Treatment of Disorders Affecting brain. **NeuroMolecular Medicin**, v. 23, p. 449-465, 2021.
- BUTT, A. M.; IBRAHIM, M.; BERRY, M. The relationship between developing oligodendrocyte units and maturing axons during myelinogenesis in the anterior medullary velum of neonatal rats. **Journal of neurocytology**, v. 26, p. 327–338, 1997.
- DE LUCA, C.*et al.* Challenges in molecular diagnosis of X-linked Intellectual disability. **British Medical Bulletin**, v. 133, p. 36–48, 2020.
- DI CARA, F. *et al.* The peroxisome: an up-and-coming organelle in immunometabolism. **Trends in Cell Biology**, v. 33, p. 70–86 2023.
- EICHLER, F. *et al.* Terapia gênica com células-tronco hematopoiéticas para adrenoleucodistrofia cerebral. **New England Journal of Medicine**, v. 377, p.1630-1638, 2017.
- FANG, E.; DENG, X.; DISTECHE, C. M. X factors in human disease: impact of gene content and dosage regulation. **Human Molecular Genetics**, v. 30, R285-R295, 2021.
- FRANSEN, M.; LISMONT, C. Redox signaling from and to peroxisomes: progress, challenges and perspectives. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 30, p. 95-112, 2019.
- GHEORGHE, A. S. *et al.* Biochemical and Metabolical Pathways Associated with Microbiota-Derived Butyrate in Colorectal Cancer and Omega-3 Fatty Acids Implications: A Narrative Review. **Nutrients**, v. 14,1152, 2022.
- GRINAN-FERRE, C. *et al.* The pleiotropic neuroprotective effects of resveratrol in cognitive decline and Alzheimer's disease pathology: From antioxidant to epigenetic therapy. **Ageing Research Reviews**, v. 67, 101271, 2021.
- HAMPSON, D. R.; HOOPER, A. W. M; NIBORI, Y. The Application of Adeno-Associated Viral Vector Gene Therapy to the Treatment of Fragile X Syndrome. **Brain Sciences**, v. 9, 32, 2019.
- HE, B.; MOREAU, R. Lipid-regulating properties of butyric acid and 4-phenylbutyric acid: Molecular mechanisms and therapeutic applications. **Pharmacological Research**, v. 144, p. 116-131, 2019.
- HETTEMA, E. H. *et al.* The ABC transporter proteins pat 1 and pat 2 are required for import of long chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J.**, v. 15, p. 3813–3822, 1996.
- LEFERINK, P. S.; HEINE, V. M. The healthy and diseased microenvironment regulate oligodendrocyte properties: implications for regenerative medicine. **The American Journal of Pathology**, v. 188, p. 39-52, 2018.

MARANGON, D. *et al.* Novel in vitro Experimental Approaches to Study Myelination and Remyelination in the Central Nervous System. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 15, 748849, 2021.

MELROSE, J. The Glucosinolates: A Sulphur Glucoside Family of Mustard Anti-Tumour and Antimicrobial Phytochemicals of Potencial Therapeutic Application. **Biomedicines**, v. 7, 62, 2019.

MIRON, V.; HUANG, E. Myelination. Disponível em: <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-625d889797712a77bbb6327b-myelination>. Acesso: 24 out 2023.

MORITA, M. **Therapeutic Strategies for X-Linked Adrenoleukodystrophy, a Representative Peroxisomal Disorder**. In: IMANAKA, T.; SHIMOZAWA, N. (eds). *Peroxisomes: Biogenesis, Function, and Role in Human Disease*. Singapore: Springer, 2019. pp. 171-200.

NISHIYAMA, A.; SERWANSKI, D. R.; PFEIFFER, F. Many roles for oligodendrocyte precursor cells in physiology and pathology. **Neuropathology**, v. 41, p. 161-173, 2021.

NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R. R.; WILLARD, H. F. **Thompson e Thompson, genética médica**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

OKU, M.; SAKAI, Y. Assessment of Physiological Redox State with Novel FRET Protein Probes. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 16, p. 698-704, 2012.

PALAKUZHIL, S. V.; CHRISTOPHER, R.; CHANDRA, S. R. Deciphering the modifiers for phenotypic variability of X-linked adrenoleukodystrophy. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 11, p. 99–111, 2020.

PSATHA, Nikoletta *et al.* In Vivo Hematopoietic Stem Cell Genome Editing: Perspectives and Limitations. **Genes**, v. 13, p. 2222, 2022.

RIVELLINI, C. *et al.* JAB1 deletion in oligodendrocytes causes senescence-induced inflammation and neurodegeneration in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 132, e145071, 2021.

SHAH, N.; SINGH, I. MicroRNA profiling identifies miR-196a as differentially expressed in childhood adrenoleukodystrophy and adult adrenomyeloneuropathy. **Molecular neurobiology**, v. 54, p. 1392-1403, 2017.

SHAIMARDANOVA, Al. A. *et al.* Gene therapy of sphingolipid metabolic disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, p. 3627, 2023.

SUTER, T. A. C. S.; HE, Z. How oligodendrocytes help the brain function. **Neuroscience and Psychology**, v. 9, 682189, 2021.

TIANE, A. *et al.* From OPC to oligodendrocyte: an epigenetic journey. **Cells**, v. 8, 1236, 2019.

ZIERFUSS, B. *et al.* Targeting foam cell formation in inflammatory brain diseases by the histone modifier MS-275. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 7, p. 2161-2177, 2020a.

ZIERFUSS, Bettina *et al.* Vorinostat in the acute neuroinflammatory form of X-linked adrenoleukodystrophy. **Clinical and Translational Neurology**, v. 7 ed. 5, p. 639-652. doi: 10.1002/acn3.51015, 2020b.

ZUSSO, M. *et al.* Neuroepigenetics and Alzheimer's Disease: An Update. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 64, p. 671-688, 2018.

3 ARTIGO

Epigenetic mechanisms associated with the diagnosis and treatment of Adrenoleukodystrophy

Mecanismos da epigenética associados ao diagnóstico e tratamento da Adrenoleucodistrofia

Sandy Santos de Souza

Discente do curso de Bacharelado em Biomedicina

Faculdade de Apucarana – FAP

R. Osvaldo de Oliveira, 600 – Jardim Flamingos, Apucarana – PR, CEP 86811-500, Brasil

E-mail: sandyca.santos@gmail.com

Sara Mataroli de Godoy

Pós-doutorado em Genética e Biologia Molecular

Faculdade de Apucarana – FAP

R. Osvaldo de Oliveira, 600 – Jardim Flamingos, Apucarana – PR, CEP 86811-500, Brasil

E-mail: godoy.sm@hotmail.com

RESUMO

A adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (X-ALD) é uma doença neurometabólica de etiologia genética, caracterizada por alterações no gene *ABCD1*. Com incidência maior em meninos do que em meninas, esta doença se deve a um acúmulo de ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA) nos peroxissomos, o que afeta a mielinização dos neurônios, comprometendo o sistema nervoso e a função adrenal. Ainda que muitas doenças neurodegenerativas sejam amplamente conhecidas, a adrenoleucodistrofia permanece pouco divulgada. Esta revisão bibliográfica narrativa visou copilar os principais aspectos genéticos e epigenéticos associados ao diagnóstico e tratamento da X-ALD. Na busca por terapias mais eficientes na diminuição ou erradicação dos sintomas, a modulação epigenética, pelo uso de medicamentos, e a terapia gênica, por meio de vetores lentivirais e células CD34⁺ têm se mostrado promissoras. Também os micro RNAs (miRNAs) constituem uma importante ferramenta na identificação de X-ALD, permitindo, inclusive, o diagnóstico diferencial entre as formas adrenoleucodistrofia cerebral infantil (CCALD) e adrenomieloneuropatia (AMN). Desta maneira, a compreensão dos mecanismos epigenéticos e genéticos associados à X-ALD é vital para o diagnóstico precoce e o

desenvolvimento de intervenções terapêuticas eficazes, impactando significativamente na progressão da doença e na qualidade de vida geral do paciente.

Palavras-chave: doença neurometabólica, histonas, neurodegeneração.

ABSTRACT

X-linked Adrenoleukodystrophy (X-ALD) is a genetically etiological neurometabolic disease characterized by alterations in the *ABCD1* gene. It is more common in boys than girls and results from an accumulation of very-long-chain fatty acids (VLCFA) in peroxisomes, affecting neuronal myelination, thus compromising the nervous system and adrenal function. Although many neurodegenerative diseases are widely known, adrenoleukodystrophy remains little known. This narrative literature review aimed to compile key genetic and epigenetic aspects associated with X-ALD diagnosis and treatment. In the quest for more effective therapies to reduce or eradicate symptoms, epigenetic modulation through drug use and gene therapy using lentiviral vectors and CD34⁺ cells have shown promise. Additionally, microRNAs (miRNAs) serve as valuable tools in X-ALD identification, enabling differential diagnosis between cerebral childhood adrenoleukodystrophy (CCALD) and adrenomyeloneuropathy (AMN). Therefore, understanding the epigenetic and genetic mechanisms linked to X-ALD is crucial for early diagnosis and the development of effective therapeutic interventions, significantly impacting disease progression and the patient's overall quality of life.

Keywords: neurometabolic disease, histones, neurodegeneration.

1 Introdução

Considerada uma doença neurodegenerativa, a adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (X-ALD) é associada à deficiência no gene *ABCD1*, que culmina no acúmulo de ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFAs) nos tecidos, especialmente no cérebro e na adrenal. Consiste em uma doença genética hereditária que se caracteriza pela desmielinização do sistema nervoso central e pode ocorrer tanto de forma assintomática como sintomática ainda na primeira infância (ZIERFUSS *et al.*, 2020a).

Tendo maior incidência no sexo masculino, pode se manifestar de cinco formas: adrenoleucodistrofia cerebral infantil (CCALD), durante a juventude (na forma AdolCALD), na forma cerebral adulta (ACALD), na forma de Adrenomieloneuropatia (AMN) e em mulheres na forma de Síndrome de Addison (ZIERFUSS *et al.*, 2020a). O acúmulo de VLCFA forma complexos lipídicos nos tecidos e causa um desequilíbrio redox na membrana (SHAH; SINGH, 2017). Diante de um paciente possivelmente afetado pela X-ALD, é importante obter um diagnóstico genético molecular, visto que este pode ajudar a prevenir possíveis manifestações secundárias. O diagnóstico molecular também permite um prognóstico geral, permitindo a identificação do fenótipo funcional, e direcionando para intervenções terapêuticas e educacionais específicas (DE LUCA *et al.*, 2020).

Uma das formas de tratamento da adrenoleucodistrofia consiste em minimizar riscos, por meio do uso de medicamentos terapêuticos, os quais podem reduzir os sintomas ou então manter o paciente em estágio assintomático se diagnosticado com X-ALD (MORITA, 2019). Além do uso de medicamentos, oclusão da ingestão de VLCFA, terapia genética por meio de autotransplante de células tronco e utilização do butirato e 4-fenilbutirato como terapia epigenética, são utilizadas como formas de tratamento da Adrenoleucodistrofia (BETHIN; MAJUDAR; MUGLIA, 2018).

A epigenética estuda as alterações na expressão gênica, que decorrem de modificações químicas na estrutura dos genes, sem afetar diretamente a sequência de DNA. Mudanças epigenéticas ocorrem naturalmente e de maneira regular nas células, sendo influenciadas por fatores como idade, ambiente e estágio de uma doença (ZUSSO *et al.*, 2018). A manutenção e o controle epigenético ocorre, no geral, por meio da metilação do DNA, modificação de histonas e microRNAs (TIANE *et al.*, 2019).

Outra forma de tratamento da adrenoleucodistrofia é a utilização de vetores lentivirais na terapia gênica, os quais têm sido utilizados como método de entrega de células tronco hematopoiéticas, contendo uma cópia funcional de determinado gene. Os lentivirais são vírus de RNA da família *Retroviridae*, capazes de acomodar insertos relativamente grandes, com tamanho de até 10 kb (HAMPSON; HOOPER; NIBORI, 2019; PSATHA *et al.* 2022), o que os torna excelentes ferramentas moleculares. Quando aplicada em um estágio inicial da doença, a terapia gênica pode diminuir a neuroinflamação de pacientes diagnosticados com CCALD (ZIERFUSS *et al.*, 2020a).

Ainda que muitas doenças neurodegenerativas sejam amplamente conhecidas e divulgadas, a adrenoleucodistrofia permanece sem destaque na mídia e nos círculos científicos da área da saúde. Apesar da gravidade da doença, pouco se fala sobre a adrenoleucodistrofia, o que dificulta o diagnóstico precoce da condição e propicia quadros clínicos de maior gravidade. Por essa razão, esse estudo teve por objetivo a caracterização dos principais aspectos genéticos e epigenéticos associados ao diagnóstico e tratamento da adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (X-ALD).

2 Metodologia

Este trabalho apresenta os principais aspectos relativos à doença adrenoleucodistrofia, sendo, portanto, um estudo qualitativo de revisão narrativa. Revisões narrativas são de fundamental importância, pois além de contribuírem para a aquisição de conhecimentos acerca de uma temática específica, também possibilitam a atualização dessas informações e a discussão de métodos e subtemas a ela relacionados (ELIAS *et al.*, 2012). Além disso, estudos qualitativos de revisão narrativa propiciam uma análise ampla da literatura, provendo informações qualitativas de um determinado tema (VOSGERAU; ROMANOWSK, 2014).

As buscas pelos artigos científicos foram realizadas nas bases de dados “Google Scholar”, “LILACS”, “PubMed” e “SciELO”, utilizando-se a combinação dos termos indexadores “*adrenoleukodystrophy AND epigenetic*” “*adrenoleukodystrophy AND histones*”. Para o desenvolvimento desse trabalho, foram selecionados os artigos mais relevantes sobre o tema, publicados nos idiomas inglês e português, e que foram citados, ao menos, por dois outros artigos. Artigos cuja data de publicação não se encontrava no intervalo entre os anos 2017 a 2023 foram excluídos, bem os que não possibilitavam acesso gratuito ao conteúdo.

3 Desenvolvimento

Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X

A adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X é causada por uma mutação no gene *ABCD1*, que codifica o transportador ABCD1 (adenosina trifosfato – Subfamília D de Transportador de Cassetes de Ligação de ATP, membro 1) e fica localizado no cromossomo Xq28. O transportador ABCD1 realiza o transporte de ácidos graxos de cadeia muito longa nos peroxissomos e promove a degradação desses ácidos através da β -oxidação. Essa síndrome é caracterizada pela perda da proteína responsável por esse transporte, ocorrendo o acúmulo desses VLCFAs nos tecidos e fluídos corporais e que resulta na desmielinização axonal e na insuficiência adrenal (FURLAN *et al.*, 2019). Dessa forma, a adrenoleucodistrofia é uma doença genética neurometabólica desmielinizante, com padrão de herança recessiva ligada ao X, caracterizada pelo acúmulo de VLCFAs, os quais aumentam, a atividade dos complexos de alongamento dos ácidos graxos (ELOVLs), favorecendo a síntese em massa de VLCFAs, o que culmina na inflamação desmielinizante (MELROSE, 2019; SHAH; SINGH, 2017).

Cerca de 60% dos pacientes masculinos com X-ALD desenvolvem adrenoleucodistrofia cerebral (CALD), uma desmielinização inflamatória rapidamente progressiva do cérebro (ZIERFUSS *et al.*, 2020b). Esses pacientes demonstram uma tendência à evolução do quadro para mielopatia ou insuficiência adrenal (FURLAN *et al.*, 2019). Pacientes com adrenoleucodistrofia cerebral infantil (CCALD) inflamatória morrem ainda na primeira infância, enquanto pacientes diagnosticados com a doença, que não apresentam o fator inflamatório vivem até 50 a 60 anos (SHAH; SINGH, 2017).

No estudo realizado por Furlan *et al.* (2019) foi possível observar que alguns dos sintomas de CALD variam entre afasia, regressão na fala e na escrita, baixo rendimento escolar, dificuldade na orientação espacial, distúrbios visuais, comportamento desinibido ou agressivo e convulsões. Pacientes com X-ALD, mais especificamente os diagnosticados com CALD, apresentam nas lesões cerebrais células espumosas. Tais células são constituídas por macrófagos carregados de lipídios que se acumulam na mielina e alteram a homeostase lipídica (ZIERFUSS, *et al.*, 2020b).

A adrenomieloneuropatia (AMN) atinge adultos e é caracterizada por axonopatia (similar a paralisia mental e atrofia muscular), porém sem apresentar neuroinflamação ou

neurodegeneração (SHAH; SINGH, 2017). Pacientes diagnosticados com AMN apresentam em seu organismo acúmulo de ácidos graxos de cadeia muito longa (*very long chain fatty acids* – VLCFA) no plasma e leucócitos, confirmado pela medição de ácidos graxos ou macrófagos (ZIERFUSS *et al.*, 2020b). Os pacientes com AMN tendem a apresentar dificuldade na deambulação, diminuição da sensibilidade dos membros inferiores, impotência sexual e disfunção adrenal. Já os pacientes do sexo feminino tendem a desenvolverem sinais e sintomas de mielopatia e/ou neuropatia periférica (FURLAN *et al.*, 2019).

Mulheres portadoras (heterozigotas) para X-ALD podem apresentar sintomas, como anormalidades na medula espinhal e nos nervos das pernas, sendo diagnosticadas a partir dos trinta anos de idade. No geral, a maioria das portadoras não apresentam sintomas antes dos 30 anos, embora 80% dessas apresentem os sintomas de disfunção neurológica a partir dos 60 anos. Pacientes diagnosticados com a Síndrome de Addison não apresentam sintomas neurológicos embora apresentem a função adrenal prejudicada (MORITA, 2019).

No sistema nervoso central, encontramos na micróglia macrófagos responsáveis pela remielinização por meio da depuração da mielina rica em lipídios. Na X-ALD, durante a fagocitose da mielina, as células presentes nela adotam um aspecto espumoso aumentado, ficando semelhante aos macrófagos que são carregados de lipídios nas placas de ateroma. Dessa forma, é observado em pacientes com CALD o aumento de células espumosas e a elevação do número de macrófagos pró-inflamatórios CD8 positivos, o que demonstra má absorção dos resíduos de mielina e células micróglia, causando danos ao sistema nervoso central (ZIERFUSS, *et al.*, 2020b).

Epigenética na Adrenoleucodistrofia

Mecanismos epigenéticos são modificações hereditárias que alteram a expressão gênica, sem necessariamente alterar a sequência de DNA. A manutenção e o controle epigenético é dado por fatores como a metilação do DNA, modificação de histonas e microRNAs. A metilação do DNA envolve o acréscimo de um grupo metil (CH₃) a uma base de citosina ligado a uma guanina, formando o dinucleotídeo 5'citosina-guanina-3', que é adicionado em regiões ricas em CG (ilhas CpG) nos promotores dos genes (TIANE *et al.*, 2019). Mudanças epigenéticas ocorrem naturalmente e de maneira regular nas células, sendo influenciadas por fatores como idade, ambiente e estágio de uma doença (ZUSSO *et al.*, 2018).

Uma das modificações epigenéticas mais estudadas consiste na inativação do cromossomo X em fêmeas de mamíferos, para compensar a dosagem gênica do cromossomo X entre machos e fêmeas. Esse processo ocorre nos estágios mais iniciais do desenvolvimento embrionário e é aleatório, o que resulta em populações de células com X materno inativo e populações de células com o X paterno inativo. Esse mecanismo tem efeitos significativos nas doenças ligadas ao X, uma vez que os homens expressam apenas o alelo materno, enquanto as mulheres expressam alelos maternos e paternos em mosaico. Além disso, existem genes que não sofrem inativação no cromossomo X e são expressos a partir de ambos os alelos nas mulheres, adicionando complexidade ao quadro (FANG; DENG; DISTECHE, 2021).

Dentre os muitos genes presentes no cromossomo X que podem estar envolvidos em condições patogênicas, encontra-se o *ABCD1*. Nas mulheres heterozigotas, a inativação aleatória do X pode culminar em linhagens de células cujo X contendo a cópia normal do gene *ABCD1* é inativado e, nesse caso, a presença da cópia mutada de *ABCD1* não permitirá a produção de proteínas funcionais (FANG; DENG; DISTECHE, 2021).

Quando modificações epigenéticas ocorrem nos oligodendrócitos (OL), principalmente a desmetilação do DNA e a desacetilação, elas interferem na maturação e diferenciação dessas células. Os oligodendrócitos (OL) são responsáveis por fornecerem auxílio metabólico e funcional as células do sistema nervoso central. Sendo pertencentes ao grupo de células da glia, os oligodendrócitos isolam os axônios neuronais por meio da formação da bainha de mielina (TIANE *et al.*, 2019).

Alterações no controle epigenético interferem na regeneração e remielinização do oligodendrócito resultando no envelhecimento celular e estabelecimento de patologias relacionadas. O envelhecimento é atribuído a diminuição da eficiência da remielinização, devido à uma redução no recrutamento de células precursoras de oligodendrócitos (OPC) e de sua maturação. Como que a metilação do DNA atua diretamente na maturação do oligodendrócito, ela impede que essas células sofram senescência antes do previsto. Assim, um dos mecanismos relacionados à X-ALD é a inibição da metilação do DNA, a qual interfere na diferenciação dos oligodendrócitos, o que impede sua maturação e culmina com processos de envelhecimento celular e apoptose (TIANE *et al.* 2019).

Outro processo epigenético relacionado à adrenoleucodistrofia, consiste nas alterações de histonas. Histonas são proteínas nucleares envoltas no DNA que formam os nucleossomos. As caudas N-terminais das histonas ficam expostas e podem sofrer acetilação, metilação, fosforilação ou ubiquitilação (ZUSSO *et al.*, 2018). Essas alterações ocorrem de forma

constante, porém, ao contrário das mutações nas sequências de DNA, essas modificações epigenéticas são reversíveis (GHEORGHE *et al.*, 2022). Assim, a ligação das histonas a grupos químicos, bem como a reversão dessas ligações, desempenha um papel fundamental no controle da expressão gênica, e tal mecanismo pode ser explorado como forma de tratamento para diferentes doenças.

Diagnóstico na Adrenoleucodistrofia

De acordo com Furlan *et al.* (2019) quando as manifestações clínicas estão associadas a alterações na substância branca do SNC e a ressonância magnética (RM) mostra presença de desmielinização ativa, há grande suspeita para X-ALD. Entretanto, o distúrbio só é confirmado com os níveis séricos de VLCFA alterados e/ou testes genéticos de genotipagem. Alguns dos exames a serem realizados para o diagnóstico em X-ALD para CALD e AMN podem ser vistos nas figuras 1 e 2, e realizados por profissionais formados na área da biomedicina e afins.

Figura 1 – Exames solicitados em pacientes com suspeita de adrenoleucodistrofia inflamatória desmielinizante cerebral

Exames solicitados para a investigação de CALD
Níveis séricos de VLCFA
RM da cabeça
Níveis séricos de cortisol
Tomografia computadorizada da cabeça
Eletroencefalograma
Níveis séricos de ACTH
Níveis séricos de Na ⁺
Níveis séricos de K ⁺
Glicose no sangue
Teste molecular para X-ALD (teste genético)
Desempenho neurológico (QI, capacidade visuoespacial, linguagem, memória)
Urinalise
Avaliação oftalmológica completa

Adaptado: Furlan *et al.* (2019).

Figura 2 – Exames solicitados em pacientes com suspeita de adrenomieloneuropatia

Exames solicitados para a investigação de AMN
Níveis séricos de VLCFA
RM da cabeça
RM da coluna
Tomografia computadorizada do abdômen
Avaliação oftalmológica
Desempenho neurológico (QI, capacidade visuoespacial, linguagem, memória)
Teste molecular para X-ALD (teste genético)
Níveis séricos de Na ⁺
Níveis séricos de K ⁺
Níveis séricos de cortisol
Níveis séricos de renina
Níveis séricos de ACTH
Função do fígado
Urinálise
Níveis séricos de vitamina B
Investigação de doença de Lyme
Investigação de HIV

Adaptado: Furlan *et al.* (2019).

Um teste laboratorial que confirma o diagnóstico para X-ALD no sexo masculino consiste na medição dos níveis plasmáticos de VLCFA. Entretanto, para as pacientes do sexo feminino apenas a quantificação de VLCFA no plasma não é suficiente haja vista os valores normais de VLCFA encontrados, sendo necessário solicitar um teste genético que faça análise de mutações no *ABCD1* (FURLAN *et al.*, 2019).

A importância de um diagnóstico genético molecular é que este pode ajudar a prevenir uma possível manifestação secundária. O diagnóstico molecular também permite um prognóstico geral, possibilitando a identificação do fenótipo funcional, e direcionando para intervenções terapêuticas e educacionais específicas. Além disso, o diagnóstico genético é um grande aliado

no planejamento reprodutivo futuro, possibilitando análises mais assertivas durante o processo de pré-implantação, na fertilização *in vitro* (FIV), além do diagnóstico genético pré-natal (DE LUCA *et al.*, 2020). A expressão de miRNAs junto a quantificação de VLCFAs podem servir como um biomarcador de pré-diagnóstico ou pós-diagnóstico em CCALD e AMN, auxiliando na diferenciação dos fenótipos AMN e CCALD da X-ALD (SHAH; SINGH, 2017).

O uso de microRNAs também pode ser uma importante forma de diagnóstico de X-ALD. Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes (ncRNA) de 21 a 25 nucleotídeos, que fazem parte da classe de RNAs de interferência (iRNAs), juntamente com os pequenos RNAs de interferência (siRNAs). Esses iRNAs são capazes de ligar à RNAs mensageiros (mRNA) e silenciar sua expressão, participando do processo de controle da expressão gênica. Os miRNA são usados em processos pós-transcricionais e podem atuar no diagnóstico e terapia de várias patologias, incluindo alguns tipos de câncer e doenças neurodegenerativas como a adrenoleucodistrofia (JESUS, SILVA-NETO; GODOY, 2023; SHAH; SINGH, 2017; TIAN *et al.*, 2021).

Shah e Sing (2017) mostraram a aplicação de miRNA no diagnóstico de X-ALD. Onde observam que os miRNAs são expressos de forma diferente na síntese de VLCFAs, tendo sua expressão diminuída em casos de CCALD, e aumentada no caso de AMN. O nível de expressão de miRNAs, junto à quantificação de VLCFAs, pode ser utilizado com um biomarcador de pré-diagnóstico ou pós-diagnóstico em CCALD e AMN, permitindo o diagnóstico diferencial entre esses dois fenótipos (SHAH; SINGH, 2017).

Tratamentos na Adrenoleucodistrofia

Medicamentos que apresentam em sua composição o ácido butírico (AB) e seu derivado, o ácido fenilbutírico (PBA) são utilizados como um método terapêutico em distúrbios lipídicos, estimulando a β -oxidação de ácidos graxos. O ácido butírico é um produto de fermentação anaeróbica das bactérias que pode ser encontrado no intestino humano e possui um período curto de permanência no organismo. Encontrado em gordura animal e em óleos vegetais, além de atuar junto a outros ácidos no intestino humano, o AB age como um inibidor da HDAC, assim como o PBA (HE; MOREAU, 2019).

O ácido 4-fenilbutírico (PBA - 4-phenylbutyric acid) atua como um estimulador da transcrição gênica no retículo endoplasmático facilitando na formação de proteínas. O PBA possui sua ação inibitória na lipólise (quebra de um lipídio), favorecendo a lipogênese (síntese de ácidos graxos e triglicérides). Este ácido atua na lipogênese como estimulador ou inibidor, enquanto o ácido butírico (butyric acid - BA) induz à lipólise. A ação inibitória de BA na lipogênese, culmina no catabolismo dos ácidos graxos por meio da β -oxidação. O ácido butírico também é usado como promotor de alterações epigenéticas por meio do reposicionamento do nucleossomo (HE; MOREAU, 2019).

Quando estimula a β -oxidação de ácidos graxos na X-ALD, o PBA corrige os níveis de ácido lignocérico em fibroblastos e os níveis de ácido cerótido em linfoblastóides. Além disso atua na β -oxidação do ácido palmítico em fibroblastos primários, melhorando a oxidação de ácidos graxos na mitocôndria e no peroxissomo (HE; MOREAU, 2019). A redução do dano oxidativo retarda o envelhecimento e o desenvolvimento de patologias neurodegenerativas, de forma que terapias antioxidantes podem auxiliar na imitação do sistema de defesa antioxidante natural do organismo, prolongando a vida do paciente (GRINAN-FERRE *et al.*, 2021).

Outro método terapêutico para X-ALD consiste no uso do Vorinostat (também conhecido como ácido suberoilânilda hidroxâmico – SAHA), o qual consiste em um inibidor da enzima histona desacetilase (HDAC). O SAHA apresenta um grupo de ácido hidroxâmico que se liga a um íon metálico, neste caso o Zn^{2+} , inibindo a ação da histona desacetilase. Este inibidor é usado para induzir a interrupção do crescimento e a morte celular das células mutadas, promovendo um acúmulo de histonas acetiladas e fatores de transcrição, o que propicia a expressão gênica. O Vorinostat tem como alvo os supressores tumorais, proteínas estruturais, proteínas de regulação de proliferação celular, da angiogênese e do estresse oxidativo (ATHIRA; SADANANDAN; CHAKRAVARTY, 2021). O ácido suberoilânilda hidroxâmico (SAHA) é um potente e seletivo inibidor de HDAC classe I e II, sendo útil para a normalização dos níveis de VLCFA (SHAH; SINGH, 2017).

Com relação a Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X, o Vorinostat tem ação específica na indução da expressão da proteína ABCD2, na β -oxidação peroxissômica e na diminuição do acúmulo de VLCFA, fazendo assim uma compensação da deficiência da proteína ABCD1 (ATHIRA; SADANANDAN; CHAKRAVARTY, 2021). O tratamento com SAHA impede a perda de células de oligodendrócitos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, neutralizando o desarranjo de VLCFA associado à patologia X-ALD (TIANE *et al.*, 2019).

Estudos realizados no tratamento com SAHA demonstraram que a aplicação do inibidor da histona desacetilase, especificamente o HDAC3 (membro da família HDAC), corrigiu parcialmente os defeitos imunológicos e metabólicos causados em macrófagos na X-ALD, se mostrando essencial para a regulação do metabolismo de lipídios em macrófagos. A deleção desse inibidor específico pode causar o aumento do acúmulo lipídico junto ao número de células espumosas na mielina, produzindo a neuroinflamação (ZIERFUSS *et al.*, 2020a).

A terapia gênica realizada por meio do transplante de células tronco hematopoiéticas CD34⁺, contendo a cópia funcional do gene *ABCD1*, é capaz de interromper a desmielinização neuronal no cérebro. As células CD34⁺ são coletadas da medula óssea dos pacientes e isoladas. Um vetor lentiviral, contendo uma cópia do gene *ABCD1*, é transferido (transdução) para a célula CD34⁺. As células CD34⁺ modificadas são reintroduzidas no paciente, e migram para o parênquima central através da barreira hematoencefálica (brain blood barrier - BBB), diferenciando-se em células parecidas com macrófagos. Esses macrófagos derivados da medula óssea (bone marrow-derived macrophages - BMDMs) interagem com a micróglia, astrócitos ou as células endoteliais, restaurando a homeostase metabólica, suprimindo a neuroinflamação (MORITA, 2019).

A terapia gênica quando aplicada em um estágio inicial da doença, pode diminuir a neuroinflamação de pacientes diagnosticados com CCALD. Devido a troca de mononucleares (células imunes que são mais afetadas durante o metabolismo de VLCFA) na terapia gênica, as células-alvo passam por uma reprogramação metabólica (ZIERFUSS *et al.*, 2020a). O transplante células CD34⁺ autólogas transduzidas com um vetor lentiviral Lenti-D (composto por um DNA complementar *ABCD1*), permitiu a restauração da proteína ALD e estabilização da doença em meninos diagnosticados com CCALD. Houve uma melhora significativa nos garotos participantes da pesquisa, demonstrando que o transplante de células-tronco é uma alternativa segura e eficaz de terapia em meninos com adrenoleucodistrofia cerebral em estágio inicial (EICHLER *et al.*, 2017).

Outras vantagens também proporcionadas pelo uso de lentivirais em tratamento de leucodistrofias, como na leucodistrofia metacromática desmielinizante, é o desenvolvimento cognitivo normal e a desmielinização prevenida ou retardada, pelo uso de células CD34⁺ autólogas contendo o gene arilsulfatase A (*ARSA*) no organismo afetado. Entretanto este medicamento apresentou riscos quando aplicado em pacientes sintomáticos, sendo direcionado apenas a pacientes assintomáticos (SHAIMARDANOVA *et al.*, 2023).

A terapia de reposição celular é usada como uma das opções de tratamento, entretanto, embora as células transplantadas sejam espalhadas pelo cérebro com sucesso, a recuperação é dificultosa. Dessa forma, as estratégias terapêuticas utilizadas na regeneração da mielina devem incluir mais do que apenas a substituição de células (LEFERINK; HEINE, 2018). Portanto a identificação de novos mecanismos é indispensável para a pesquisa e desenvolvimento de terapias direcionadas, como as de reposição enzimática ou, mais recentemente, de edição de genes (DE LUCA *et al.*, 2020).

4 Considerações finais

A Adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (X-ALD) é uma doença neurometabólica, desmielinizante, de origem genética causada por mutações no gene *ABCD1*, localizado no cromossomo Xq28. A doença é caracterizada pelo acúmulo de ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA) em vários tecidos, causando desmielinização axonal e insuficiência adrenal. Essa condição apresenta um padrão de herança recessiva ligada ao X e se manifesta de maneira diferente em homens e mulheres. Devido à inativação aleatória do cromossomo X nas mulheres, a manifestação da X-ALD se torna ainda mais complexa, uma vez que as mulheres heterozigotas também podem apresentar sintomas. Mecanismos epigenéticos desempenham um importante papel na X-ALD. A metilação do DNA e modificações nas histonas, por exemplo, influenciam na expressão gênica, afetando a diferenciação e maturação dos oligodendrócitos, responsáveis pela mielinização dos neurônios no sistema nervoso central. O diagnóstico da X-ALD depende de manifestações clínicas, ressonância magnética (MRI), níveis de VLCFA no plasma sanguíneo e testes genéticos. Além disso, os microRNAs (miRNAs) têm se mostrado importantes na identificação da doença, funcionando como biomarcadores para o diagnóstico diferencial de fenótipos da X-ALD. As opções de tratamento incluem terapias para gerenciar os níveis de VLCFA, como ácido butírico e ácido fenilbutírico. O Vorinostat, um inibidor da enzima HDAC, ajuda a regular a expressão gênica e corrigir os níveis de VLCFA. Já a terapia gênica, por meio de células-tronco hematopoiéticas CD34⁺ com um gene *ABCD1* funcional, pode retardar a progressão da CCAALD, quando aplicada de forma precoce.

5 Referências

- ATHIRA, K.V.; SADANANDAN, P.; CHAKRAVARTY, S. Repurposing Vorinostat for the Treatment of Disorders Affecting brain. **NeuroMolecular Medicin**, v. 23, p. 449-465, 2021.
- BETHIN, K. E.; MAJUMDAR, I.; MUGLIA, L. J. **Adrenal Insufficiency**. In: RODOVICK, S.; MACGILLIVRAY, M. H. Pediatric Endocrinology: A Practical Clinical Guide. 2 ed. Totowa: Humana Press. 2018. pp. 285-310
- DE LUCA, C. *et al.* Challenges in molecular diagnosis of X-linked Intellectual disability. **British Medical Bulletin**, v. 133, p. 36-48, 2020.
- EICHLER, Florian *et al.* Hematopoietic Stem-Cell Gene Therapy for Cerebral Adrenoleukodystrophy. **The New England journal of medicine**, v. 377, p. 1630–1638, 2017.
- ELIAS, C. S. R. *et al.* When is the end? A narrative review about the end of school period for mentally disabled students. SMAD: Electronic Journal in Mental Health, **Alcohol and Drugs**, v.1, p. 48-53, 2012.
- FANG, E.; DENG, X.; DISTECHE, C. M. X factors in human disease: impact of gene content and dosage regulation. **Human Molecular Genetics**, v. 30, R285-R295, 2021.
- FURLAN, F. L. S. *et al.* X-linked adrenoleukodystrophy in Brazil: a case series. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 37, p. 465-471, 2019.
- GHEORGHE, A. S. *et al.* Biochemical and Metabolical Pathways Associated with Microbiota-Derived Butyrate in Colorectal Cancer and Omega-3 Fatty Acids Implications: A Narrative Review. **Nutrients**, v. 14,1152, 2022.
- GRINAN-FERRE, C. *et al.* The pleiotropic neuroprotective effects of resveratrol in cognitive decline and Alzheimer's disease pathology: From antioxidant to epigenetic therapy. **Ageing Research Reviews**, v. 67, 101271, 2021.
- HAMPSON, D. R.; HOOPER, A. W. M; NIBORI, Y. The Application of Adeno-Associated Viral Vector Gene Therapy to the Treatment of Fragile X Syndrome. **Brain Sciences**, v. 9, 32, 2019.
- HE, B.; MOREAU, R. Lipid-regulating properties of butyric acid and 4-phenylbutyric acid: Molecular mechanisms and therapeutic applications. **Pharmacological Research**, v. 144, p. 116-131, 2019.
- JESUS, D. K. O.; SILVA-NETO, J. F.; GODOY, S. M. RNAi gene therapy in Cancer treatment. **Brazilian Journal of Development**, v. 9, p. 15008–15019, 2023.
- LEFERINK, P. S.; HEINE, V. M. The healthy and diseased microenvironment regulate oligodendrocyte properties: implications for regenerative medicine. **The American Journal of Pathology**, v. 188, p. 39-52, 2018.
- MELROSE, J. The Glucosinolates: A Sulphur Glucoside Family of Mustard Anti-Tumour and Antimicrobial Phytochemicals of Potencial Therapeutic Application. **Biomedicines**, v. 7, 62, 2019.

- MORITA, M. **Therapeutic Strategies for X-Linked Adrenoleukodystrophy, a Representative Peroxisomal Disorder**. In: IMANAKA, T.; SHIMOZAWA, N. (eds). *Peroxisomes: Biogenesis, Function, and Role in Human Disease*. Singapore: Springer, 2019. pp. 171-200.
- PSATHA, Nikoletta *et al.* In Vivo Hematopoietic Stem Cell Genome Editing: Perspectives and Limitations. **Genes**, v. 13, p. 2222, 2022.
- SHAH, Navjot; SINGH, Inderjit. MicroRNA profiling identifies miR-196a as differentially expressed in childhood adrenoleukodystrophy and adult adrenomyeloneuropathy. **Molecular neurobiology**, v. 54, p. 1392-1403, 2017.
- SHAIMARDANOVA, A. A. *et al.* Gene therapy of sphingolipid metabolic disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, p. 3627, 2023.
- TIAN, Z. *et al.* Insight Into the prospects for RNAi therapy of cancer. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 644718, 2021.
- TIANE, A. *et al.* From OPC to oligodendrocyte: an epigenetic journey. **Cells**, v. 8, 1236, 2019.
- VOSGERAU, D. S. A. R.; ROMANOWSKI, J. P. Estudos de revisão: implicações conceituais e metodológicas. **Revista de Diálogo Educacional**, v. 41, p. 165-189, 2014.
- ZIERFUSS, B. *et al.* Vorinostat in the acute neuroinflammatory form of X-linked adrenoleukodystrophy. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 7, p. 639-652, 2020a.
- ZIERFUSS, B. *et al.* Targeting foam cell formation in inflammatory brain diseases by the histone modifier MS-275. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 7, n. 11, p. 2161-2177, 2020b.
- ZUSSO, M. *et al.* Neuroepigenetics and Alzheimer's Disease: An Update. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 64, p. 671-688, 2018.

4 ANEXO

Normas da Revista Brazilian Journal of Development

Author Guidelines

The BJD accepts only original articles, not published in other journals. Articles presented at events are accepted, provided that this information is made available by the authors.

The rules for formatting and preparing originals are:

- Maximum of 20 pages and 8 authors;
- Font Times New Roman, size 12, line spacing of 1.5;
- Figures, Charts and Tables must appear together with the text, editable, in font 10, both for the content and for the title (which must appear just above the graphic element) and font (which must appear just below the graphic element).
- Title in Portuguese and English, at the beginning of the file, with font 14;
- Summary and abstract, along with keywords and keywords, with single spacing, just below the title;
- The file sent must not contain the identification of the authors.

This journal adopts as an editorial policy the guidelines for good practices in scientific publication of the National Association for Research and Postgraduate Studies in Administration (ANPAD), available at:
http://www.anpad.org.br/diversos/boas_praticas.pdf.

Publication model: BJD template