

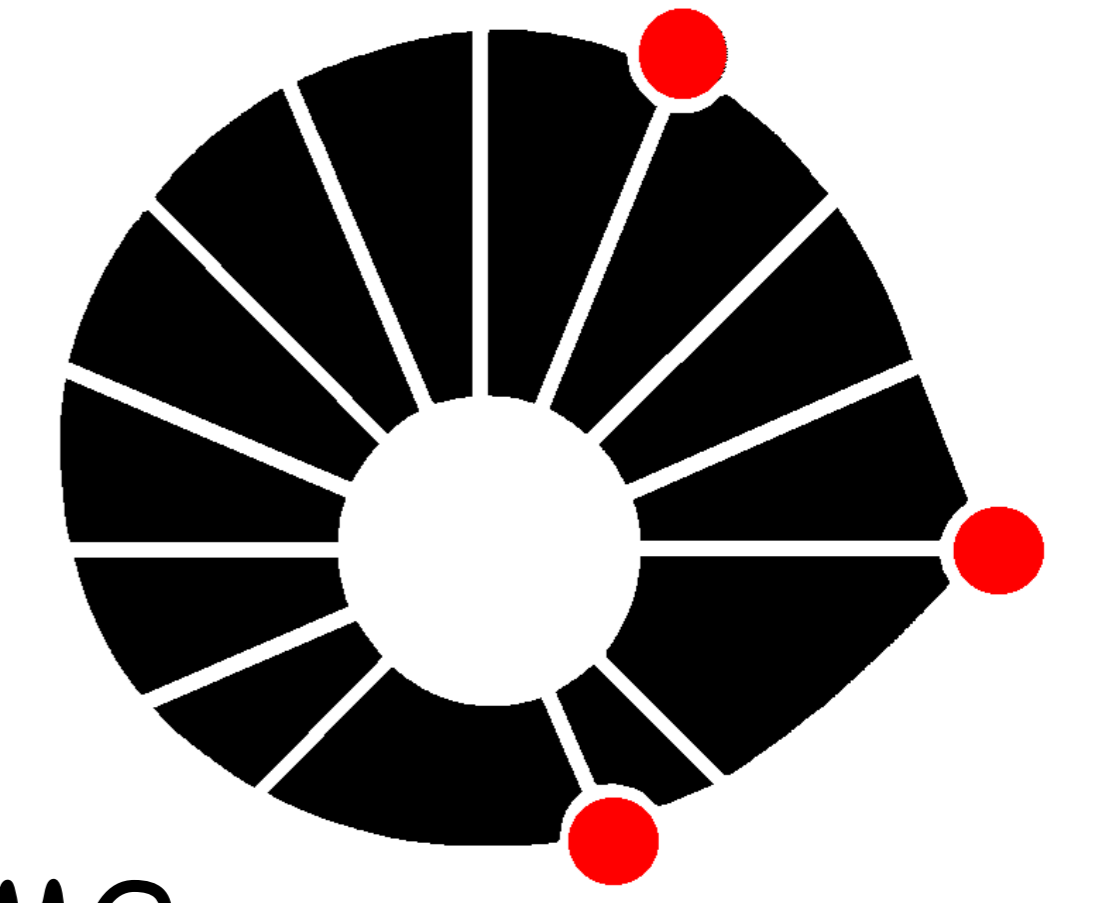
ESTRATÉGIAS, DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

DE ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AO X



Falco, L.F.G.; Höehr, N. F.

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS - FCM
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP



PALAVRAS CHAVE: ADRENOLEUCODISTROFIA, HPLC, METABOLISMO,

FINANCIAMENTO: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ

Introdução:

A adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (X-ALD) é uma doença peroxissomal hereditária bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo dos ácidos graxos de cadeia muito longa (AGCML), ácidos hexacosanoico (C26:0) e tetracosanoico (C24:0) nos tecidos e fluidos biológicos nos pacientes afetados. O aumento da concentração desses metabólitos está relacionado com a progressiva desmielinização da substância branca do sistema nervoso central, bem como com a insuficiência adrenal. Sete formas clínicas já estão descritas, sendo a forma cerebral infantil (cALD) e a adrenomieloneuropatia (AMN) as mais frequentes, podendo ocorrer todas na mesma família. A diminuição dos níveis plasmáticos de AGCML é obtida por tratamento com uma dieta de restrição em gorduras saturadas e com uso do Óleo de Lorenzo (gliceroltrierucato + gliceroltrioleato), eficaz em pacientes que não apresentam sintomas neurológicos. Este trabalho propõe o desenvolvimento de um método de análise via HPLC para que seja possível a quantificação de metabólitos intermediários das vias de degradação de ácidos graxos de cadeia longa (VLCFA) em urina, de pacientes previamente diagnosticados com a adrenoleucodistrofia ligada ao X uma vez que as atuais técnicas de diagnóstico de doença são realizadas através de extração de metabólitos em cultura de células, como fibroblastos, miócitos leucócitos e hemácias.

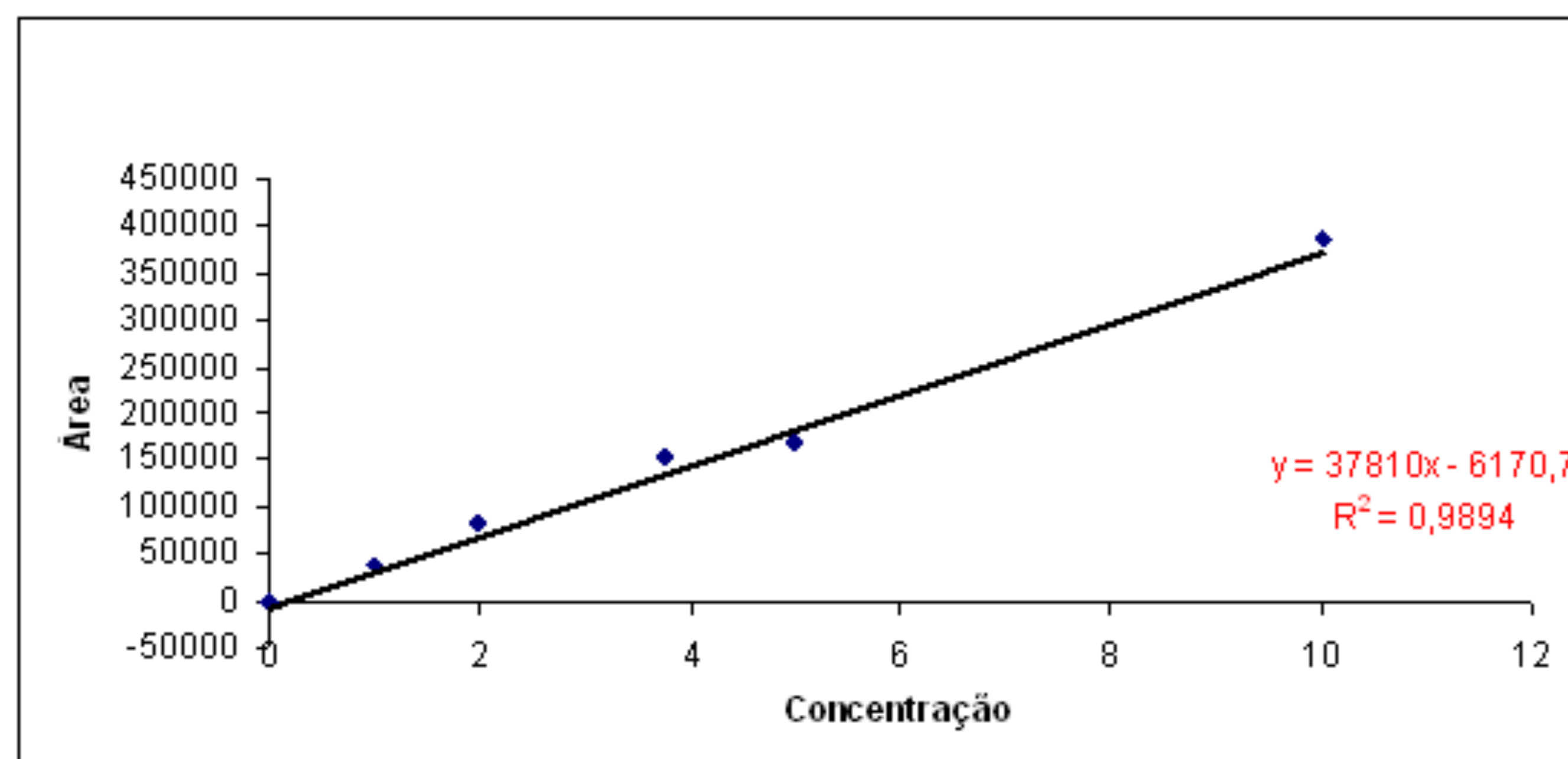


FIGURA 1 Curva de calibração, HPLC obtida para análise ácido Cerpillico (C26:0). Coluna C18, fase móvel isocrática (80% AcN e 20% Água Deionizada)

Materiais e Métodos

A curva padrão foi obtida através de sistema cromatográfico com coluna **C18**, fase reversa, isocrática, fase móvel **H₂O/AcN, 80:20** 242 nm.

0,1 mg de ácido cerílico foram dissolvidos em **metanol** e o meio neutralizado com solução de **KOH 0,2 mol.L⁻¹**. À mistura obtida foi adicionado gás nitrogênio para evaporação do solvente. À sobra adicionou-se **0,1 ml** solução **2 mol.L⁻¹ do éter coroa 18-crown-6** em acetonitrila e a mesma quantidade de uma solução de **brometo de 4-bromofenacil**. A mistura foi aquecida até **80°C** e mantida agitação constante, **durante 15 minutos**. Após esfriamento a solução final foi dissolvida em **250ml de acetonitrila**, para adequação ao sistema cromatográfico.

O material biológico obtido (urina) foi submetido à desproteinização através da adição de **Sal Sódico de EDTA** e solução **ácida de HCL 1,0 mol.L⁻¹** até pH 2,0. O precipitado foi descartado e ao sobrenadante procedeu-se extração com solvente orgânico para isolamento dos analitos. Para esta etapa, utilizou-se **funil de separação 100 ml**, contendo a amostra previamente desproteinizada, e realizou-se 3 vezes o procedimento de com adição de **10ml de acetato de etila**. Recolheu-se a fase orgânica e evaporou-se o solvente, para posterior submissão ao método de análise.



Figura 2: Reação geral de derivatização do ácido graxo

Resultados e Conclusões

Os resultados obtidos foram satisfatórios. No decorrer do projeto, atividades propostas em trabalhos anteriores tiveram que ser revisadas. A etapa de derivatização é um processo que pode inferir possíveis fontes de erros. Desta forma, a principal meta futura consiste na análise dos metabólitos através de um método economicamente viável e que não necessite desta etapa. Houve melhoria e do método empregado ao longo das atividades.