



ADRENOLEUCODISTROFIA LIGADA AO X : CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UMA FAMÍLIA



Camila Braun Heinke, Daniel Zanetti Scherrer,
Luciana Bonadia, Carmen Silvia Bertuzzo, Carlos Eduardo Steiner

steiner@fcm.unicamp.br

Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, CP 6111
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

Adrenoleucodistrofia ligada ao X (X-ALD) é uma doença progressiva que envolve o Sistema Nervoso e o Córtex Adrenal. Está associada ao acúmulo de ácidos graxos de cadeias muito longas (VLCFA) no plasma (Moser, 1999). O gene com a mutação na X-ALD é o *ABCD1*. As manifestações clínicas da X-ALD envolvem desde a forma cerebral infantil, com involução neurológica grave e morte aos 10 de idade, até a forma adulta, além da adrenomieloneuropatia (AMN), em que o paciente sobrevive por volta de 80 anos, e uma forma apenas com doença de Addison (Loes, *et al.*, 2006). O envolvimento do Sistema Nervoso na X-ALD pode ser detectado por exames de ressonância magnética (RM) e avaliado através de um sistema de pontuação baseado no acometimento neuroanatômico e na presença ou ausência de atrofia focal ou global (Loes *et al.*, 2006). Uma pontuação rigorosa (0 a 34 pontos), desenvolvida por Loes *et al.* (1998), é calculada para cada RM, levando em conta a localização e a extensão das lesões cerebrais. Desde modo, há melhores definições da história natural e da progressão da doença e um melhor acompanhamento da evolução terapias adotadas.

PACIENTES E MÉTODOS

A família em questão é procedente de Minas Gerais. O caso índice é um paciente do sexo masculino com 14 anos de idade, terceiro filho de um casal não-consanguíneo, com atraso no desenvolvimento neuromotor e involução neurológica desde nove anos de idade. Há um primo em primeiro grau e outros mais distantes, todos pelo lado materno e já falecidos, com quadro semelhante ao seu. O avô, um tio-avô e um primo em segundo grau maternos apresentam inteligência normal e alterações motoras nos membros inferiores (paraparesia) de início tardio. Um irmão do paciente apresenta dificuldade escolar. No exame físico, o caso índice apresentava antropometria normal, sem sinais dismórficos ou visceromegalias, tendo paraparesia espástica e rebaixamento cognitivo (fig. 1).

A investigação laboratorial através de dosagens VLCFA realizada em laboratório de referência resultou alterada e compatível com X-ALD no caso índice, em seu irmão e em um primo em primeiro grau materno. Uma irmã e uma prima em primeiro grau materna estão sendo submetidas a investigações laboratoriais semelhante

Foram incluídos na pesquisa os indivíduos sob risco de terem a mutação, ou seja, os homens com sintomas ou exames laboratoriais alterados e as mulheres que, segundo a distribuição familiar, puderem ser heterozigotas.

Para os estudos moleculares foram coletadas amostras de DNA a partir de linfócitos de sangue periférico, após obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O DNA foi extraído utilizando-se a técnica padrão do Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética Médica/Unicamp (DGM/Unicamp). Os 10 éxons do gene *ABCD1* foram amplificados pela técnica da PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou Reação em Cadeia da Polimerase). Os produtos da PCR foram submetidos à pesquisa de mutação pelo método do seqüenciamento gênico. Os primers utilizados estão descritos na tabela 1, desenhados (Montagna, *et al.*, 2004).

Tabela 1: Primers utilizados no seqüenciamento do gene *ABCD1*, conforme (Montagna, *et al.*, 2004). O Tamanho é descrito em pares de bases (pb) e a "T_{ann}" se refere à temperatura de anelamento.

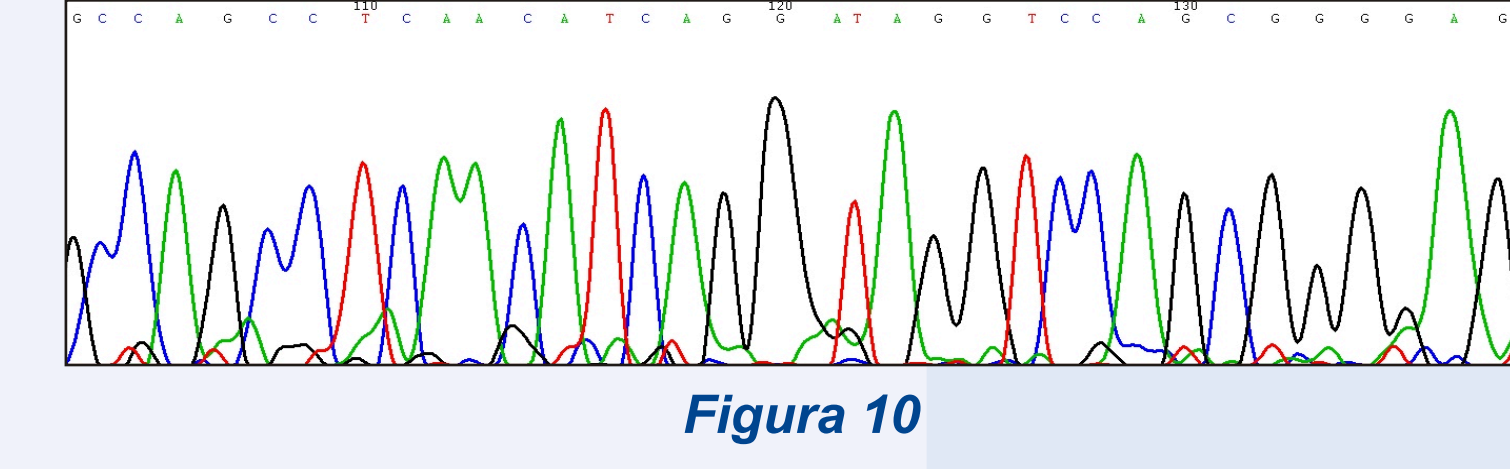
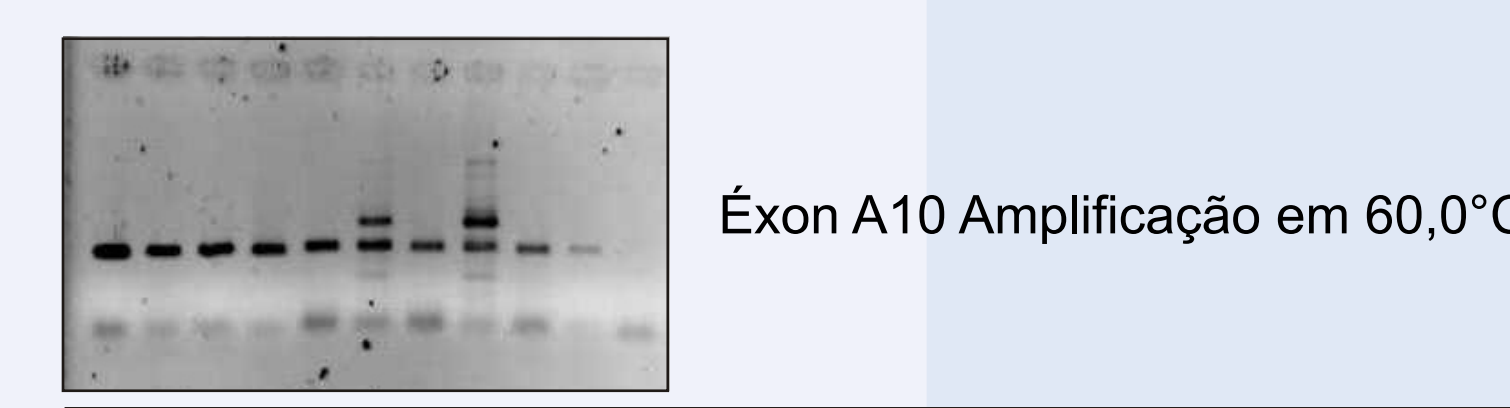
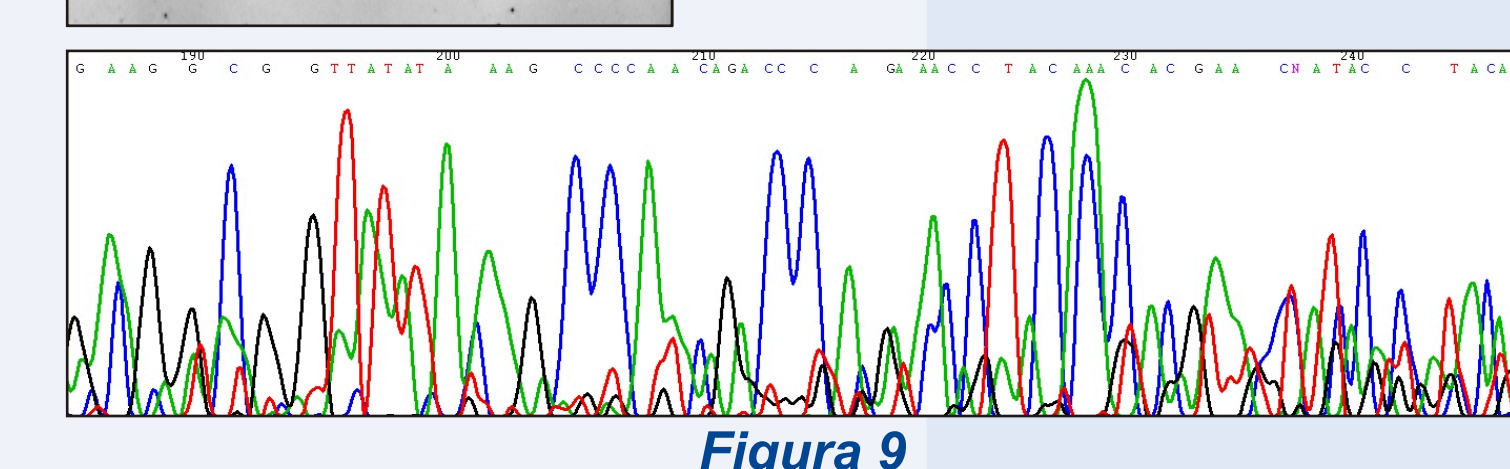
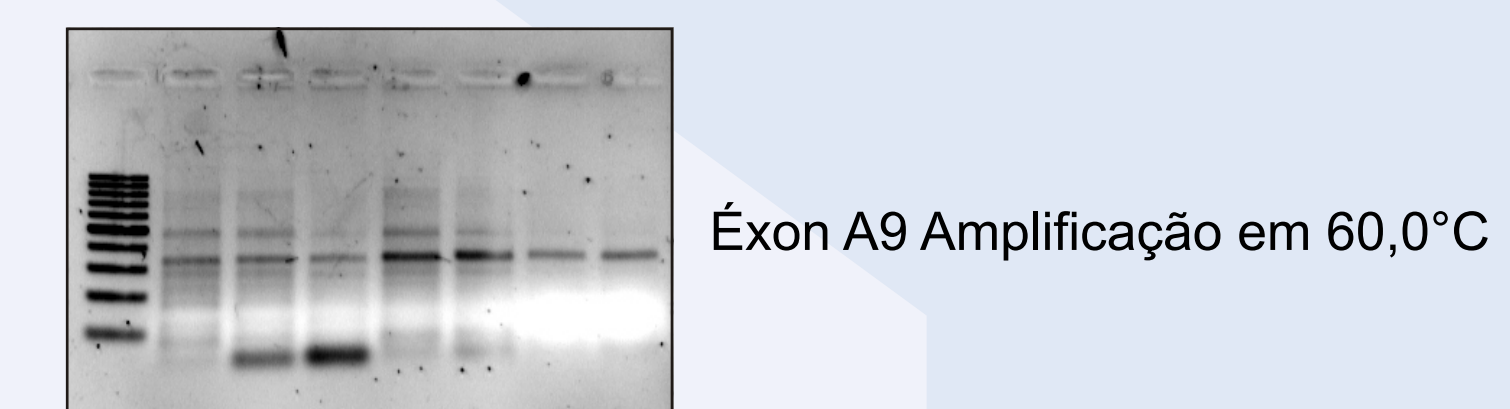
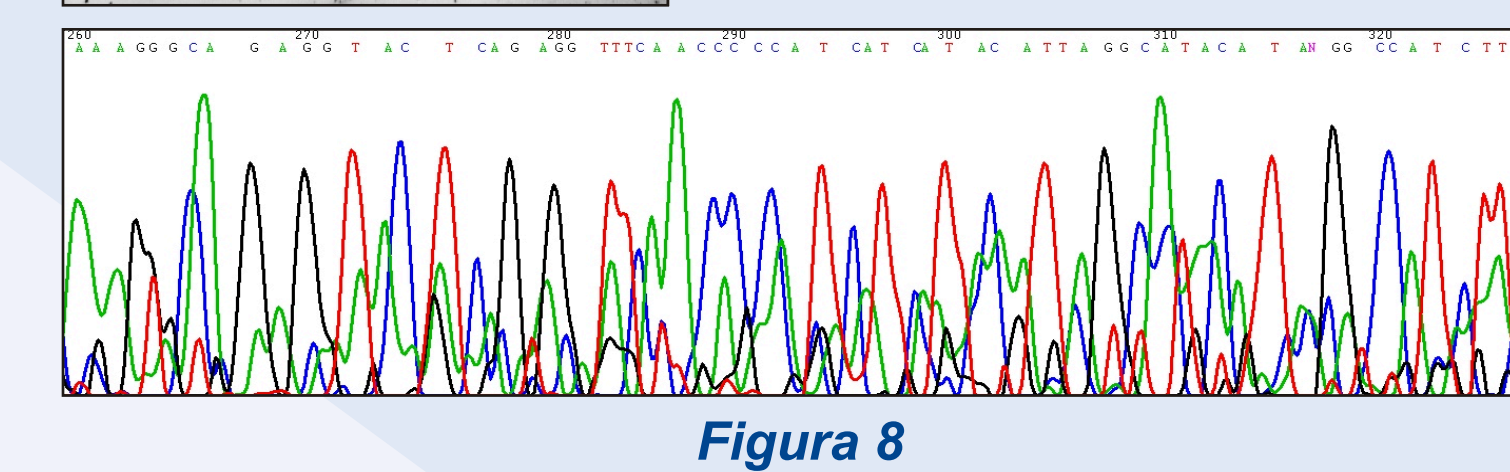
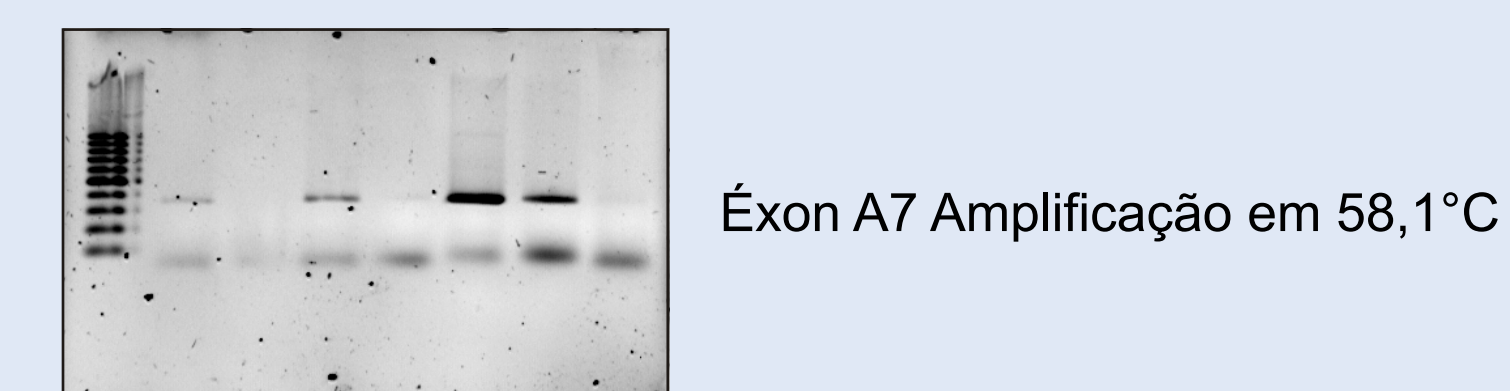
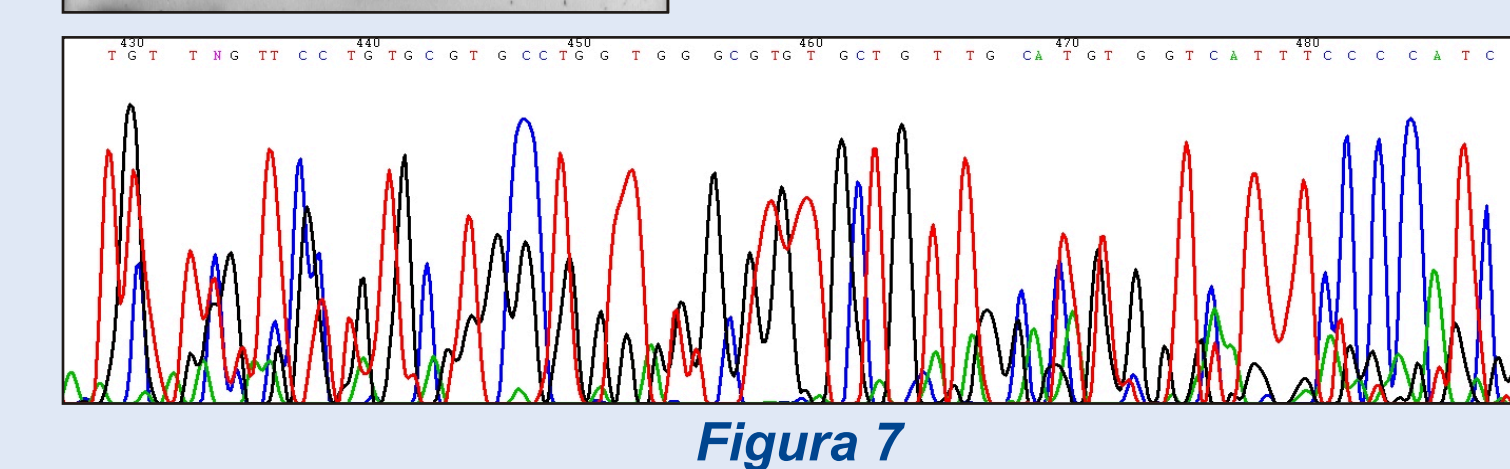
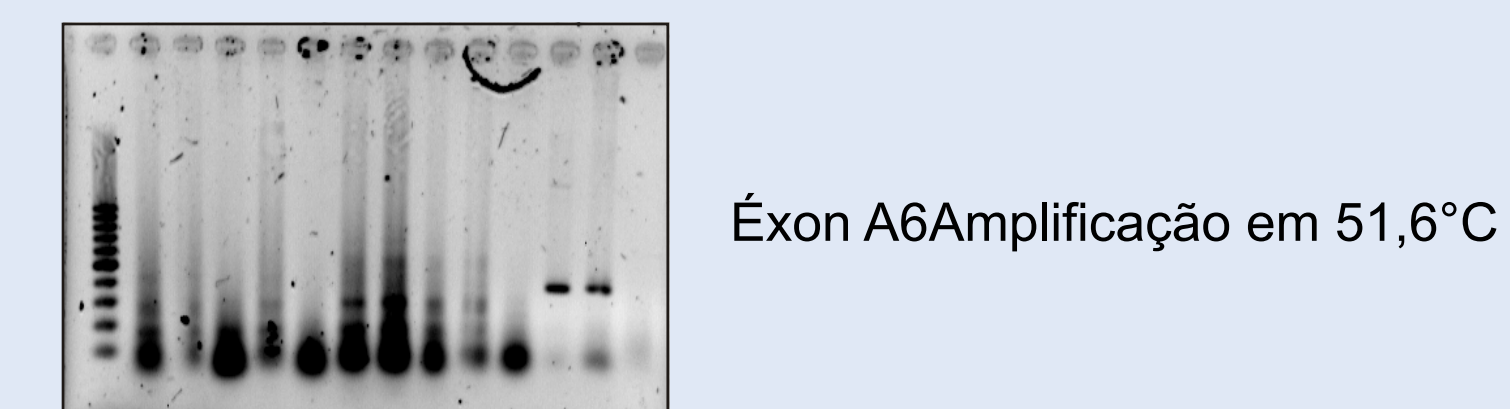
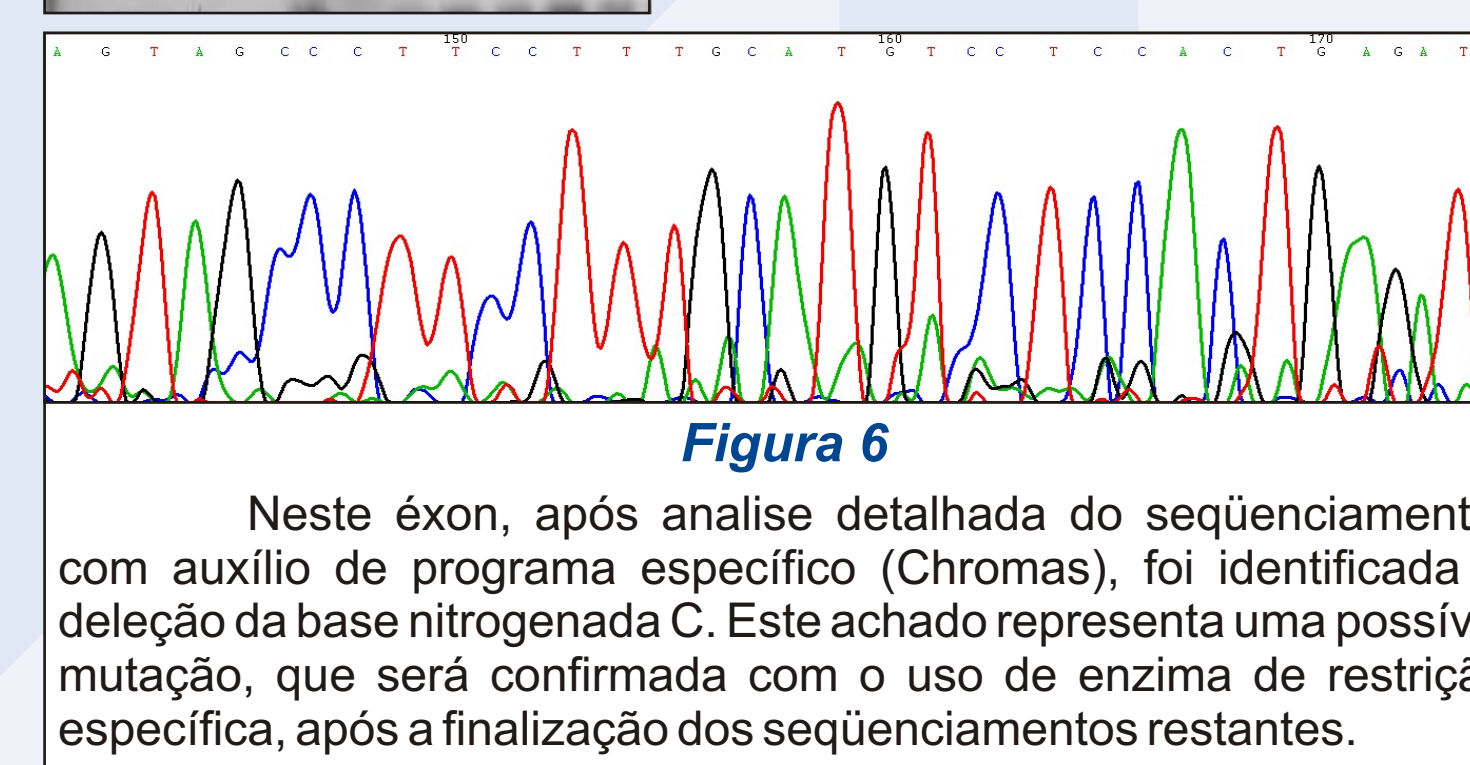
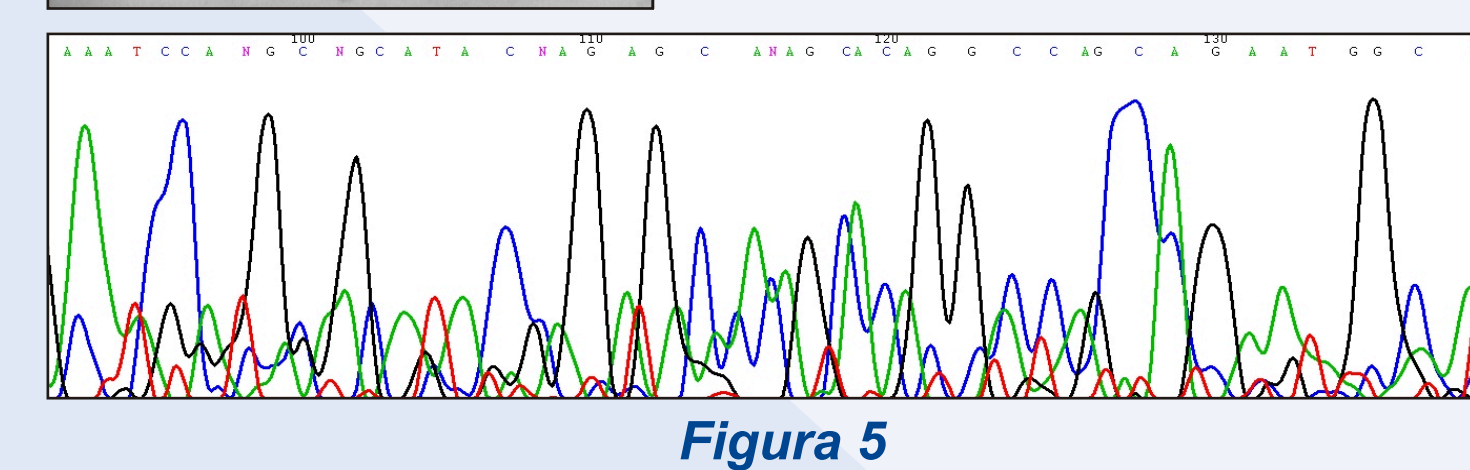
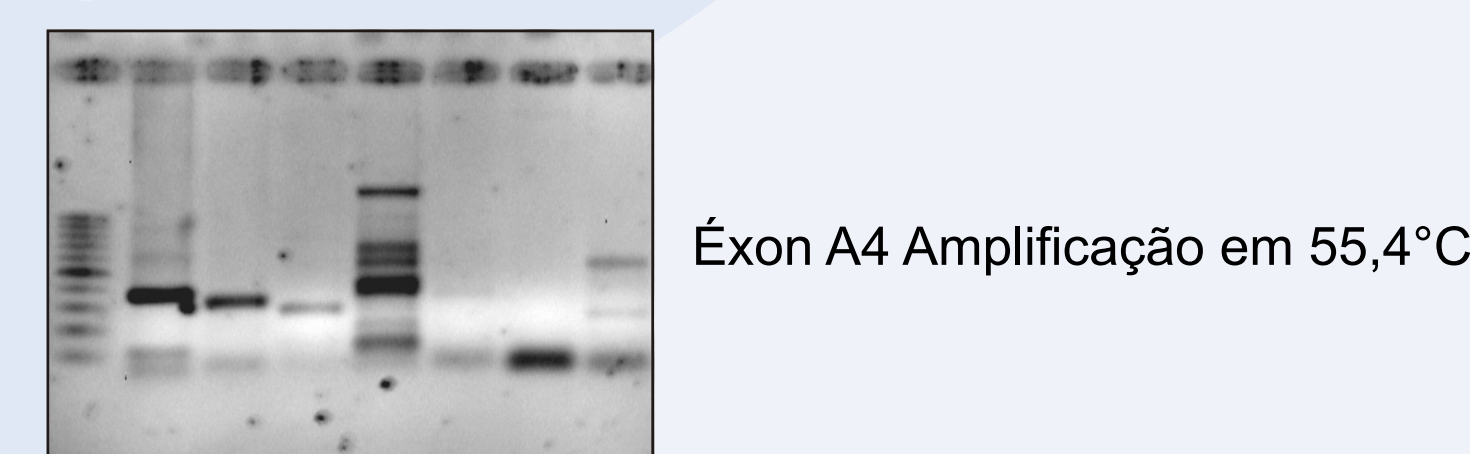
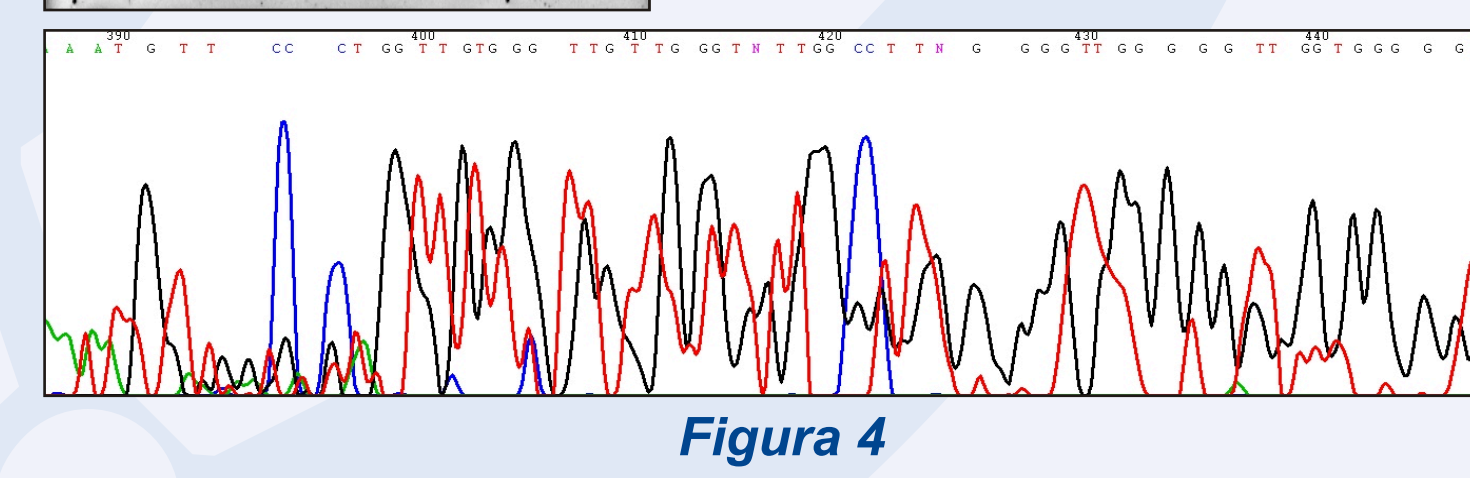
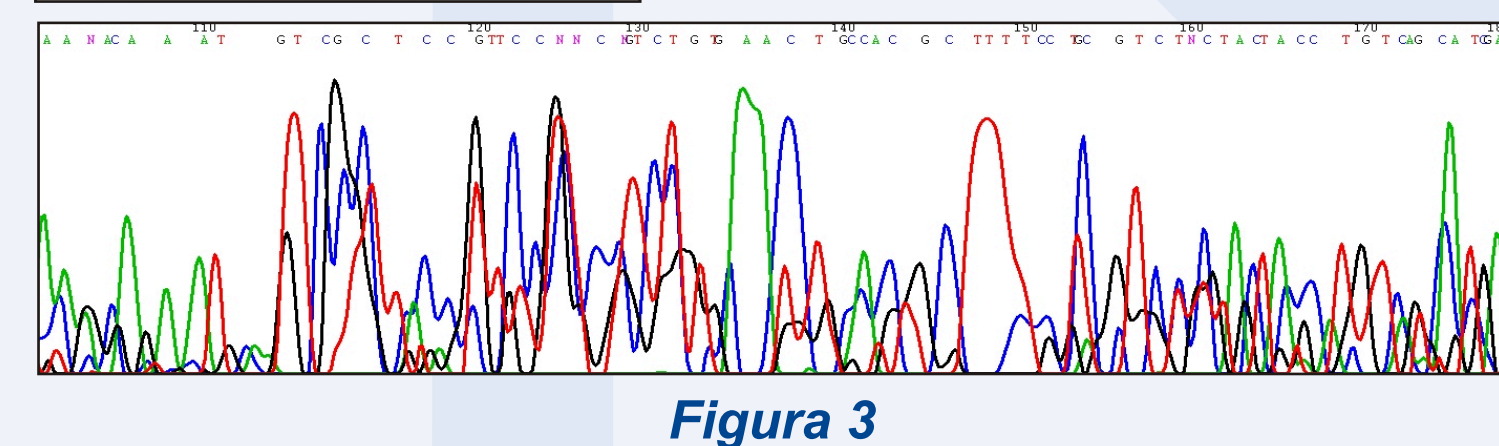
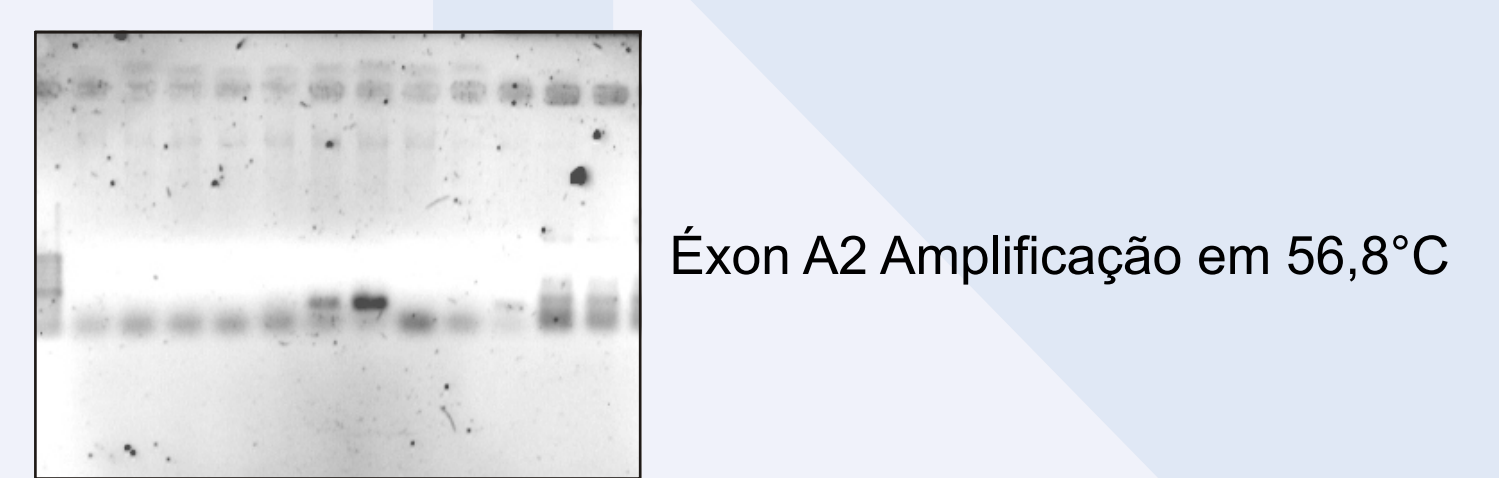
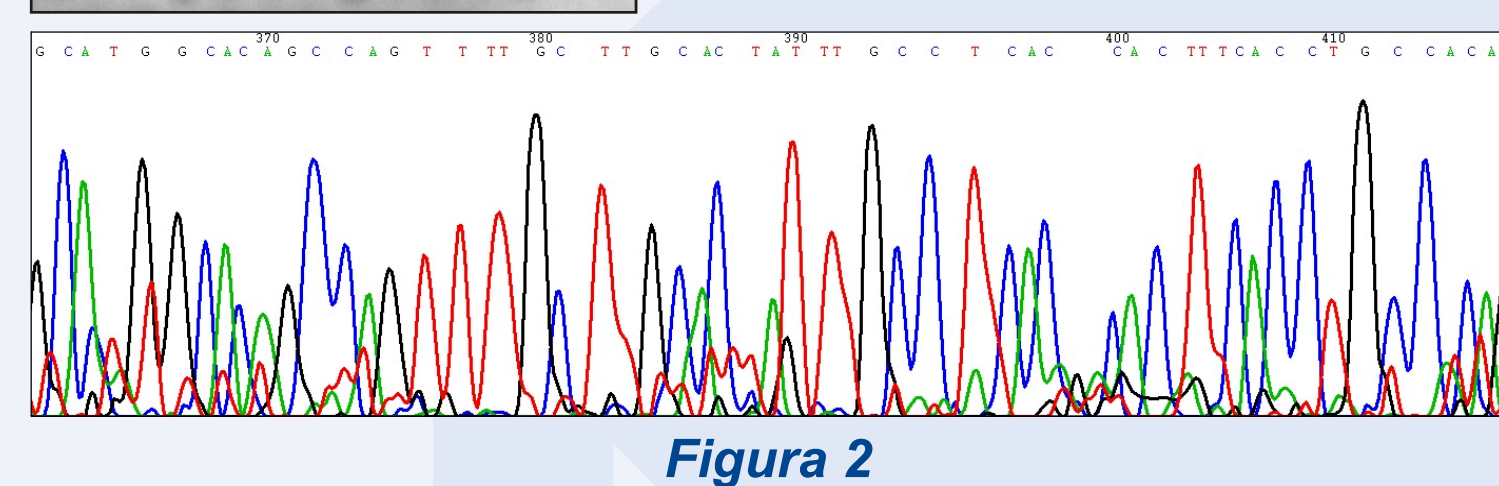
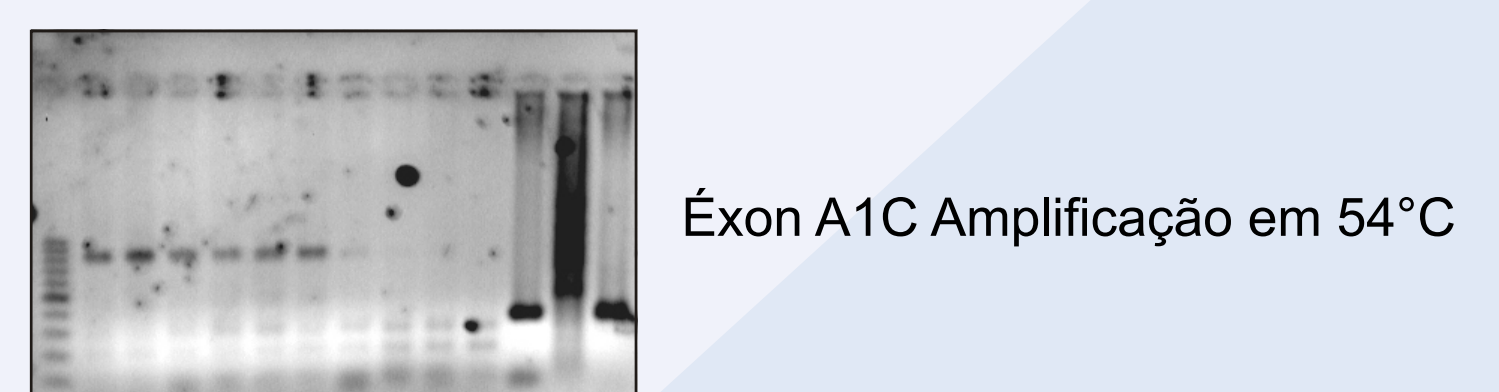
Éxon/ Tam(pb)	Primer Forward / Primer Reverse	T _{ann} .
1 A/427	CCAG GGT CAG AGC AAC AAT C / CCA CAT ACA CCG ACA GGA AG	—
1 B/456	ATG AAC CGG GTA TTC CTG C / TGG CTT GGT CAG GTT GGA G	—
1 C/482	CTA CCG GGT CAG CAACA TG / CAC ACC TTT GGC ATC AGC C	54°C
2/230	CCG GTC TGG GTG CTG GTG G / TCT TGG AGC CCT GGG TCT CAC	56,8°C
3/312	ATT TGC AGA AGA GCC TCG CC / CAG GGA AGA AAG CAT GGC AA	60,2°C
4/325	TTG CCA TGC TTC TCT CCC TG / CTG AGT GAG GGA GCG GGA AT	55,4°C
5/269	AGA ATG CAG AGG GGT CGC CA / CCA CCT GCC ACG TAC ACT TA	60,0°C
6/229	AAG GGG CCT GCG CTC TCT / CAG GAA GAG GTG GAG GAG	51,6°C
7/358	TGG ATG CGT GTG AGC GTG G / GCA CCT GGC ACT TTA GAC TC	58,1°C
8/202	CGC GTC TGG GTG CTG GTG G / GCC TCC CCA CAG CTG CTA CT	57°C
9/266	TGG AGG GTG CAC AGA CTC TC / CTG CTG ATG ACA CCC GCC T	60,0°C
10/349	GTG CCG TGC CCC TGA CC / TGG GTG CTG CTG TCT CCT T	60,0°C

RESULTADOS

Os primers foram conferidos, em relação a tamanho e presença de íntrons, através de modelos existentes em bancos de dados. Cada éxon foi submetido a reações de PCR diferentes, com concentrações de primers, DNA e reagentes diferentes, além da variação das temperaturas de anelamento, para que as bandas obtidas permitissem uma reação de seqüenciamento adequada. Todos os éxons foram testados na faixa de 50°C e 60°C. Os éxons A1C, A2, A3, A4, A5, A9 e A10 apresentaram bons resultados e foram submetidos a seqüenciamento. As análises iniciais indicam ausência de mutação nos éxons A1C, A2, A3, A4, A6, A7, A9 e A10.

A análise do seqüenciamento do éxon A5 revela deleção de base, sugerindo possível mutação, que para confirmação, necessita de testes com enzima de restrição. Aqueles que não amplificaram foram submetidos a reações em temperaturas de 60°C a 65°C, com primers diluídos.

As fotos dos éxons amplificados e o gráfico dos seqüenciamentos realizados estão apresentados nas figuras 2 a 10.



DISCUSSÃO

De acordo com os dados apresentados e com os resultados da padronização dos PCRs os éxons A1C, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A9 e A10 foram analisados e comparados com seqüências existentes na literatura.

Os éxons A1C, A2, A3, A4, A6, A7, A9 e A10 não apresentaram alterações em suas seqüências. No éxon A5 uma possível mutação foi identificada como uma deleção de base nitrogenada C (citocina). Assim, após a conclusão de todos os seqüenciamentos, o éxon A5 será submetido a uma reação com enzima de restrição específica, para que a mutação seja confirmada e comparada com os tipos de mutações já existentes para este gene.

CONCLUSÃO

Por tratar-se de uma doença rara, é fundamental para um maior conhecimento da X-ALD a descoberta das mutações existentes no gene *ABCD1*, permitindo um maior entendimento da doença, melhores estudos para sua identificação precoce, e uma busca mais avançada por tratamentos mais específicos e cada vez mais precoces.

Além disso, a realização de estudos moleculares específicos, a identificação de alterações no DNA e sua posterior comparação com dados já existentes na literatura permitem determinar padrões e freqüência das mutações existentes em determinados tipos de doenças.

REFERÊNCIAS

- BARKOVICH, A. J. Concepts of myelin and myelination in Neuroradiology. *Am J Neuroradiol*, 21: 1099-1109, 2000.
- CASTELLOTE, A.; VERA, J.; VAZQUEZ, E.; ROIG, M.; BELMONT, J.A.; ROVIRA, A. MR in adrenoleukodystrophy: Atypical Presentation as Bilateral frontal Demyelination. *Am J Neuroradiol*, 16: 814-814, 1993.
- GIULIANI, R.; VARGAS, C.R.; BARSCHAK, A.G.; SOUZA, C.F.; KARAM, S.M. Clinical and biochemical findings in 7 patients with X-linked adrenoleukodystrophy treated with Lorenzo's Oil. *Genetics and Molecular Biology*, 23(4): 697-701, 2000.
- MONTAGNA, G.; CAPPÀ, M.; MELONE, M.A.B.; PIANTADOSI, C.; COTURFO, R.; SALVATI, S.; SANTORELLI, F.M. Identification of seven novel mutation in *ABCD1* by a DHPLC-based Assay in Italian patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Human Mutation*, 774, 2004.
- MOSER, H.W.; BROWN, F.R.; MOSER, A.E.; YEAGER, A.M. The adrenoleukodystrophy. *Rev Neurobiol*, 3: 29-88, 1987.
- MOSER, H.W.; SMITH, K.D.; MOSER, A.B. X-linked adrenoleukodystrophy. The metabolic and molecular bases of inherited disease. *Am J Med*, 12: 2325-2345, 1995.
- MOSER, H.W. Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain*, 120: 1485-1508, 1997.

Heredograma

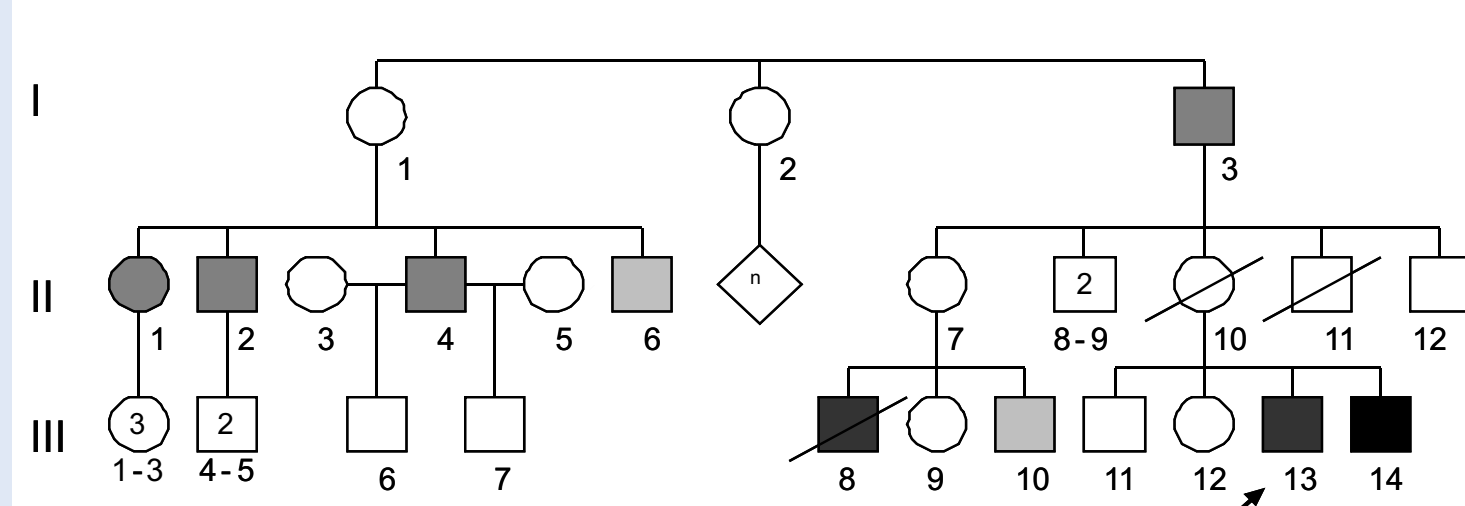


Figura 1

