

## **Anexo B**

## **ANEXO B**

### **Avaliação da aplicabilidade de um método de HPLC-DAD na quantificação de colestanol em amostras biológicas**

#### **B.1. Objectivos do trabalho**

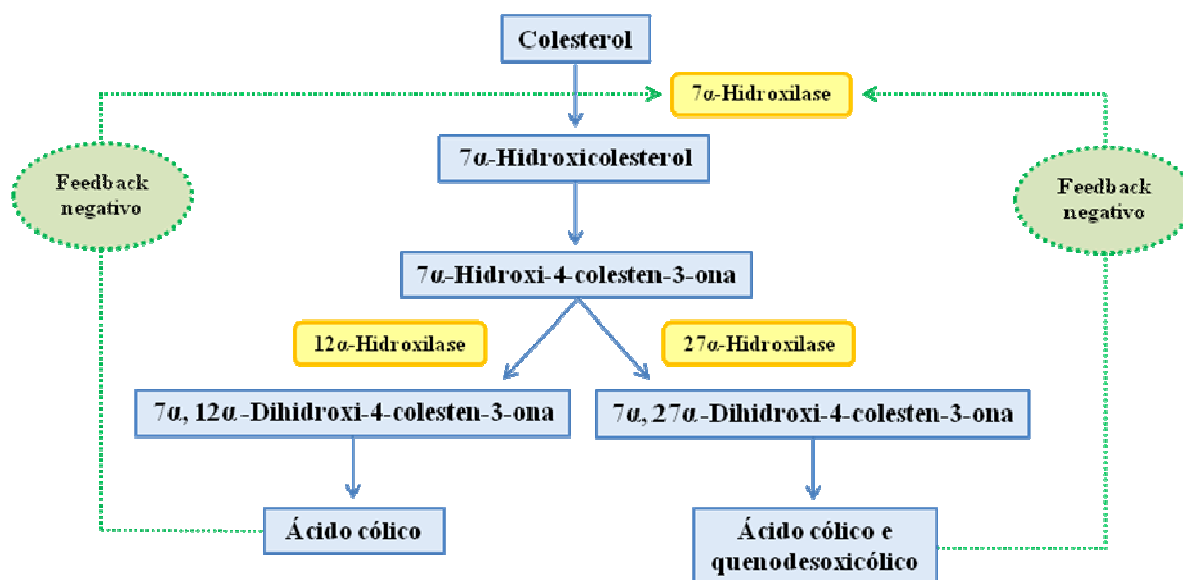
1. Identificar e quantificar os níveis de colestanol em amostras de soros, utilizando o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector “diode-array” (DAD), optimizado para a identificação e quantificação de diversos esteróis (método descrito na tese e anexo A).
2. Estabelecer valores de referência para o colestanol, numa população Portuguesa controlo e para diferentes faixas etárias.
3. Dosear o colestanol sérico em doentes Portugueses com Xantomatose Cerebrotendinosa (CTX).

#### **B.2. Introdução**

A **Xantomatose Cerebrotendinosa** (MIM 213700) é uma doença metabólica, de transmissão autossómica recessiva, da via da biossíntese dos ácidos biliares e armazenamento lipídico. É caracterizada por níveis aumentados de colestanol nos tecidos e fluídos biológicos (Smithard *et al.*, 2007). Foi pela primeira vez descrita em 1937 por Van Bogaert em dois primos (Bel *et al.*, 2001).

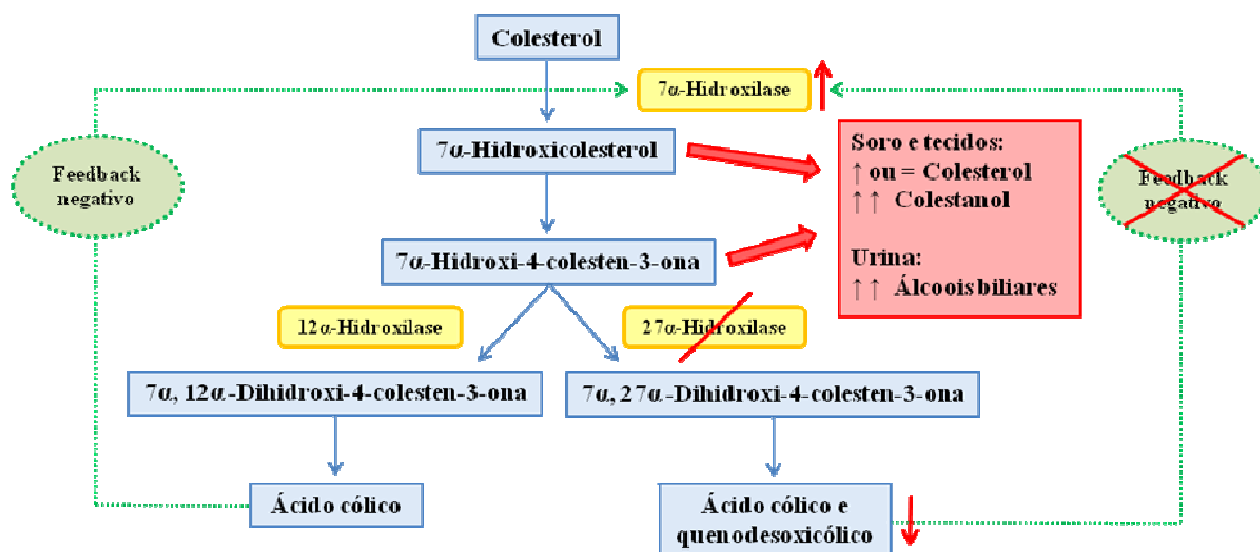
A CTX é causada por mutações no gene *CYP27A1*, que codifica a enzima mitocondrial esterol 27-hidroxilase (CYP27A1) (E.C. 1.14.13.15) (Bel *et al.*, 2001; Burnett *et al.*, 2001). Esta enzima pertence à família do citocromo P-450 e catalisa o passo inicial da via de biossíntese dos ácidos biliares a nível mitocondrial, nomeadamente a oxidação da cadeia lateral do colesterol produzindo os ácidos biliares: cólico e quenodesoxicólico (CDCA) (Bel *et al.*, 2001; Dubrac *et al.*, 2005). Também desempenha um papel importante na clivagem das cadeias laterais dos intermediários sintéticos dos ácidos biliares e, nos tecidos periféricos, catalisa a conversão de colesterol a 27-hidroxicolesterol e ácido 3 $\beta$ -hidroxi-5-colestanoico, compostos que podem ser transportados para o fígado (via transporte reverso do colesterol)

para serem convertidos a ácidos biliares (Dubrac *et al.*, 2005). Esta enzima tem também um papel importante na homeostase do colesterol nas células endoteliais e macrófagos humanos (Bahr *et al.*, 2002).



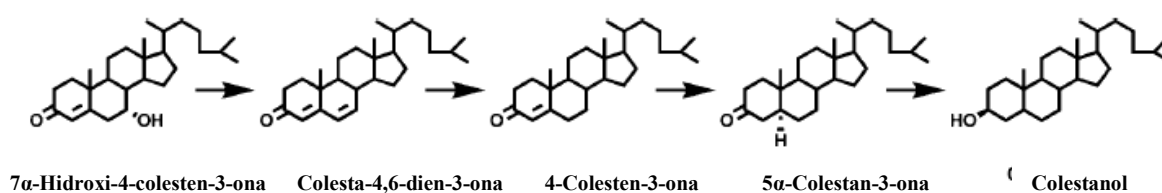
**Figura B.2.1.** Conversão hepática de colesterol a ácidos biliares. A amarelo estão representadas as enzimas, a azul estão representados os substratos e produtos das reacções enzimáticas e a verde está representado o mecanismo de feedback negativo (Adaptado de Smithard *et al.*, 2007).

Nos indivíduos normais, os ácidos biliares primários inibem por mecanismo de feedback negativo, o passo limitante da sua biossíntese ao nível da enzima 7 $\alpha$ -hidroxilase (Lange *et al.*, 2004). Na CTX, o défice na enzima CYP27A1, provoca uma síntese reduzida de ácidos biliares, uma vez que o colesterol não é oxidado a ácidos biliares, especialmente CDCA, e por consequência não há inibição por feedback da produção de ácidos biliares (Bel *et al.*, 2001). A ausência do mecanismo de feedback pelo ácido cólico e CDCA na 7 $\alpha$ -hidroxilase (enzima limitante da via de síntese de ácidos biliares) conduz a um aumento da sua actividade enzimática, e consequentemente a acumulação de precursores biliares, tais como, colestanol (derivado 5 $\alpha$ -dihidro do colesterol) no sangue e tecidos e um aumento da concentração de álcoois biliares urinários, com concentrações elevadas a moderadas de colesterol no soro (Bel *et al.*, 2001; Dubrac *et al.*, 2005).



**Figura B.2.2.** Metabolismo dos ácidos biliares nos indivíduos com CTX. A amarelo estão representadas as enzimas, a azul estão representados os substratos e produtos das reacções enzimáticas, a verde está representado o mecanismo de feedback negativo e a vermelho os efeitos de um défice na CYP27A1 (Adaptado de Smithard *et al.*, 2007 e Lange *et al.*, 2004).

O colestanol é produzido a partir de derivados  $7\alpha$ -hidroxilados:  $7\alpha$ -hidroxicolesterol e  $7\alpha$ -hidroxi-4-colesten-3-ona, intermediários e precursores biliares da via de biossíntese de ácidos biliares, que se acumulam com a redução da síntese de ácidos biliares devido ao aumento da actividade da  $7\alpha$ -hidroxilase e ao défice enzimático da CYP27A1 (Panzenboeck *et al.*, 2007).



**Figura B.2.3.** Sequência de reacções de conversão de  $7\alpha$ -Hidroxi-4-colesten-3-ona a colestanol (Adaptado de Panzenboeck *et al.*, 2007).

Como o colestanol também é um substrato para a CYP27A1, um défice nesta enzima na CTX, contribui para o efeito de acumulação de colestanol nos fluídos e tecidos biológicos (Panzenboeck *et al.*, 2007).

Vários estudos indicam que uma deficiência na enzima CYP27A1 afecta três vias do metabolismo hepático: a via de biossíntese do colesterol, a dos ácidos gordos e a dos ácidos biliares. Assim, compostos específicos, formados directamente pela actividade da CYP27A1, ou seus metabolitos, tal como mecanismos compensatórios induzidos por deficiência em CYP27A1, desempenham um papel importante na regulação hepática e do organismo e na integração destas três vias (Dubrac *et al.*, 2005).

### **B.2.1. Sinais Clínicos**

Os principais sinais clínicos da CTX são: a presença de cataratas bilaterais na juventude, xantomas nos tendões (especialmente no tendão de Aquiles), aterosclerose prematura, distúrbios neurológicos progressivos como demência, ataxia, epilepsia, convulsões, alterações psíquicas, incapacidade cognitiva e neuropatia periférica (Lorincz *et al.*, 2005; Bel *et al.*, 2001; Smithard *et al.*, 2007; Gallus *et al.*, 2006; Burnett *et al.*, 2001).

A nível do SNC a patologia inclui xantomas no hemisfério do cerebelo, degeneração axonal, desmielinização e re-mielinização, sinais piramidais e cerebelosos, gliose e depósitos de lípidos nas células Schwann (Gallus *et al.*, 2006; Geraldles *et al.*, 2007).

A CTX pode também apresentar-se com outras manifestações clínicas como osteoartrites, osteoporose e aumento de fracturas ósseas, insuficiência pulmonar, endocrinopatia, cálculo renal e hepático e diarreia crónica desde a infância (Lorincz *et al.*, 2005; Gallus *et al.*, 2006; Lange *et al.*, 2004). A doença cardiovascular e enfarte do miocárdio também têm sido descritos, como causa frequente de morte prematura na CTX (Burnett *et al.*, 2001). Os doentes com esta patologia por vezes apresentam distúrbios no comportamento, depressão, mudanças de humor, irritabilidade, redução do apetite, insónias e fadiga (Lange *et al.*, 2004). O Parkinsonismo é raro mas também se pode manifestar nalguns doentes (Gallus *et al.*, 2006).

**Tabela B.1.1.** Quadro resumo das características clínicas descritas em casos com diagnóstico de CTX (Smithard *et al.*, 2007; Gallus *et al.*, 2006; Okuma *et al.*, 2007).

Sinais Clínicos	N.º de casos descritos (%)
Cataratas	86% - 97%
Xantomas bilaterais principalmente no tendão de Aquiles	90-95%
Atraso mental	83.3%
Sinais piramidais	82.7%
Sinais na zona do cerebelo	71 - 73%
Diarreia crónica durante a infância	50%
Convulsões	50%
Neuropatia periférica	31%
Parkinsonismo	3%

A idade de aparecimento da sintomatologia é variável, embora a maioria das manifestações clínicas apareça na primeira ou na segunda década de vida. As cataratas normalmente surgem durante a adolescência e os xantomas, situados maioritariamente nos tendões de Aquiles, geralmente aparecem na infância como nódulos inflamatórios (Bel *et al.*, 2001). Os xantomas estão depositados na pele ou no tecido subcutâneo e assemelham-se a pápulas amarelas, nódulos e pseudo-tumores (Smithard *et al.*, 2007). São constituídos por tecido conjuntivo que contém colesterol, ésteres de colesterol, colestanol, triglicérides, fosfolípidos e numerosos macrófagos carregados de lípidos (Smithard *et al.*, 2007; Bahr *et al.*, 2002).



**Figura B.2.4.** Dois Xantomas no tendão junto aos joelhos (Retirado de Bel *et al.*, 2001).



**Figura B.2.5.** Xantoma no Tendão de Aquiles (os limites estão definidos com linhas em azul) (Retirado de Geraldés *et al.*, 2007).

Uma das explicações para a acumulação de colesterol juntamente com colestanol nos xantomas é que na CTX, devido ao défice na enzima CYP27A1, esta para além de não ser capaz de reduzir por supressão a biossíntese de colesterol, não é capaz de converter o colesterol a 27-hidroxicolesterol, logo o colesterol ou se acumula ou é convertido em intermediários, como o colestanol (Panzenboeck *et al.*, 2007; Bahr *et al.*, 2002). Desta forma, a CYP27A1, desempenha um importante papel no efluxo de colesterol e colestanol nos tendões, uma vez que, nos indivíduos normais, converte colesterol em 27-hidroxicolesterol e desta forma impede a acumulação de colesterol nos tendões (Bahr *et al.*, 2002).

A polineuropatia, frequente nos doentes com CTX, pode ser explicada pelo depósito de colestanol e colesterol neuro-tóxicos, no sistema nervoso central e periférico (Wang *et al.*, 2007). O mecanismo para as manifestações neurológicas, como ataxia cerebelosa, ainda não é bem conhecido, embora um aumento de produção de colestanol no fluido cérebro-espinhal (LCR), induza a apoptose de células neuronais (Bel *et al.*, 2001; Lange *et al.*, 2004; Moghadasianl *et al.*, 2002). Por outro lado, Philippart e Van Bogaert, sugerem que uma parte do colesterol habitualmente presente nas membranas plasmáticas das células da mielina e do lóbulo frontal do cérebro é substituída pelo colestanol, o que altera a estrutura membranar das células, produzindo disfunções neurológicas características de CTX (Bhattacharyya *et al.*, 2007). Contudo, o mecanismo pelo qual o colestanol se acumula no cérebro ainda não é bem conhecido, uma vez que este não atravessa a barreira hematoencefálica. No entanto, alguns estudos sugerem que os intermediários  $7\alpha$ -hidroxilados podem atravessar esta barreira e serem convertidos a colestanol no cérebro (Bhattacharyya *et al.*, 2007; Panzenboeck *et al.*, 2007).

O aparecimento de doença da artéria coronária em doentes CTX pode ser devido à aterosclerose precoce (Bel *et al.*, 2001).

A morte normalmente acontece entre a quarta e a sexta décadas de vida e deve-se à deterioração neurológica progressiva, paralisia ou enfarte do miocárdio (Bel *et al.*, 2001).

### **B.2.2. Características Bioquímicas**

Bioquimicamente a CTX caracteriza-se por níveis elevados a moderados de colesterol no soro, níveis normais de triglicerídeos no soro, perfil de lipoproteínas plasmáticas normal, hipoalfalipoproteinémia, baixos níveis de glucose no soro e LCR, mas elevados níveis de colestanol no soro e tecidos, elevados níveis de proteína no LCR e aumento da excreção urinária de álcoois biliares e da excreção fecal de ácidos gordos e colesterol (Smithard *et al.*, 2007; Bel *et al.*, 2001; Dubrac *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007).

Há estudos que indicam que um doente homozigótico para CTX tem um aumento na biossíntese de colesterol, por aumento da actividade da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coA reductase (HMGR), uma vez que uma deficiência homozigótica em *CYP27A1* provoca uma desregulação dos mecanismos de regulação do metabolismo hepático do colesterol (Dubrac *et al.*, 2005).

No estudo de Bhattacharyya *et al.* (2007), observou-se que a absorção intestinal de colestanol também se encontra aumentada nos doentes com CTX.

Estudos recentes demonstram que para além de elevados níveis de colestanol no soro, os doentes com CTX apresentam concentrações elevadas no plasma de 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol (Burnett *et al.*, 2001), além disso, têm sido observados em alguns doentes com CTX, níveis baixos de 25-hidroxi vitamina D assim como de 1,25-hidroxi vitamina D (Burnett *et al.*, 2001).

O diagnóstico bioquímico de CTX é feito pela quantificação de colestanol no soro e pela determinação dos álcoois biliares excretados pela urina (Verrips *et al.*, 2000).

### **B.2.3. Estrutura do Gene e da Proteína**

A estrutura do gene *CYP27A1* humano foi elucidada por Leitersdorf *et al.* (Gallus *et al.*, 2006). O gene *CYP27A1* (citocromo P450, família 27, sub-família A, polipéptido 1) está localizado na porção distal do braço longo do cromossoma 2, locus 2q35, entre os marcadores D2S1371 e D2S424 (Bel *et al.*, 2001; Gallus *et al.*, 2006; Verrips *et al.*, 2000). O gene



*CYP27A1* é constituído por nove exões e oito intrões e estende-se ao longo de 18.6 kb (Verrips *et al.*, 2000). A região promotora do gene é rica em resíduos de guanina e citosina e contém três possíveis locais de ligação do factor de transcrição SP1 e um para o factor de transcrição hepático LF-B1 (Gallus *et al.*, 2006).

O transcrito tem um tamanho de 1966 pb e codifica uma proteína de 531 aminoácidos. A clonagem do cDNA humano da esterol 27-hidroxilase demonstrou que a proteína consiste numa enzima nativa com 498 aa e uma sequência mitocondrial de 33 aa. A enzima contém um local que liga adrenodoxina (resíduos 351–365) e um local que liga o grupo heme (resíduos 435–464). Estas regiões são a parte conservada do gene e interagem com dois cofactores da proteína, adrenodoxina e adrenodoxina reductase (Gallus *et al.*, 2006).

A enzima esterol 27-hidroxilase é expressa em diferentes tecidos como SNC, fígado, pulmões, duodeno e células endoteliais (Lange *et al.*, 2004). Esta enzima para além de catalisar os passos iniciais da oxidação da cadeia lateral do colesterol produzindo ácidos biliares, pode também hidrolisar uma variedade de substratos esteróis na posição C-27, como a 25-hidroxilação da vitamina D<sub>3</sub> (Gallus *et al.*, 2006; Burnett *et al.*, 2001).

#### **B.2.4. Mutações no gene CYP27A1**

Em 1991, foi descrita a primeira mutação no gene *CYP27A1* (Verrips *et al.*, 2000). Uma revisão da literatura mostrou que há 49 mutações diferentes descritas no gene *CYP27A1* em doentes CTX de diferentes origens étnicas. Encontram-se distribuídas ao longo dos 8 exões do gene *CYP27A1*, embora, cerca de 50% destas mutações estejam localizadas entre os exões 6–8. Das 49 mutações identificadas, 45% são mutações missense, 20% são mutações nonsense, 18% são mutações de splicing, 14% são deleções e 2% são inserções (Gallus *et al.*, 2006).

Algumas destas mutações têm uma frequência relativamente alta em alguns grupos étnicos como T339M nos doentes com CTX Holandeses, R474 (Q-W) nos doentes Japoneses e A216P em doentes Italianos (Gallus *et al.*, 2006).

Não foi observada qualquer correlação genótipo fenótipo, o que indica a presença de outros factores que modificam o fenótipo (Lorincz *et al.*, 2005).

### **B.2.5. Incidência**

Na maioria dos grupos étnicos, a CTX é considerada uma doença rara, contudo, nos judeus de origem marroquina a CTX têm uma incidência de 1:108 (Lorincz *et al.*, 2005). No entanto, tendo em conta que a mutação mais comum no *CYP27A1* é R362C e tendo em conta estudos que referem que 25% dos indivíduos que desenvolvem CTX são homozigóticos para a mutação e considerando que possam existir outros tipos de mutações no *CYP27A1*, isto indica que CTX é mais comum do que diagnosticada. Assim, a prevalência estimada de CTX é de 3 a 5 por 100.000, o que prevê que nos Estados Unidos (população > 280 milhões) existam 8400 a 14.000 indivíduos com CTX (Lorincz *et al.*, 2005), e em Portugal provavelmente 5 novos casos ano.

Até ao momento estão publicados cerca de 200 casos clínicos (Smithard *et al.*, 2007).

**Tabela B.2.2.** Levantamento de casos descritos de doentes portugueses com CTX.

Doentes	Hospitais	Idade (anos)	Sexo	Sinais clínicos	Níveis de colestanol no soro (µg/ml)	Genótipo	Referências
1	Hospital Santa Maria, Lisboa	47	♂	Cataratas Bilaterais; Marcha atáxica; Xantomas nos tendões de Aquiles; Perda de memória; Diminuição da iniciativa motora e verbal; Sinais piramidais; Espasticidade nos membros inferiores; Hipostesia táctil e dolorosa nos dedos dos pés; Polineuropatia sensivo-motora, axonal; Desmielinização corticoespinal.	32	[T339M] + [R395C]	(Geraldes e Carvalho, 2004)
2	Hospital Santa Maria, Lisboa	39	♀	Cataratas Bilaterais; Quedas esporádicas; Xantomas no Tendão de Aquiles.	-	ND	(Geraldes e Carvalho, 2004)
3	Hospitais da Universidade de Coimbra	66	♂	Sinais Piramidais Bilaterais; Marcha atáxica; Xantomas nos tendões de Aquiles; Deterioração cognitiva; Enfarte que provocou a morte.	-	ND	(Matos <i>et al.</i> , 2004)
4	Hospital Geral de Santo António, Porto	43	♀	Défice cognitivo ligeiro; Cataratas bilaterais; Xantomas nos Tendões de Aquiles, tendões da rótula, nas mãos e nas pálpebras; Dificuldade progressiva de marcha; Debilidade ligeira; Défice Visual; Síndrome Tetrapiramidal.	-	ND	(Dias <i>et al.</i> , 2005)
5	Universidade Nova de Lisboa	23	♀	Xantomas no Tendão de Aquiles; Diarreia Crónica; Cataratas bilaterais; Marcha atáxica; Espasticidade; Sinais piramidais; Mioclonias da face; Alterações na zona do cerebelo.	-	ND	(Viana-Baptista <i>et al.</i> , 2002)
6	Universidade Nova de Lisboa	27	♀	Xantomas no Tendão de Aquiles; Cataratas bilaterais; Alterações no equilíbrio; Apatia; Lentificação do raciocínio; Queixas depressivas; Marcha atáxica; Espasticidade; Sinais piramidais; alterações na zona do cerebelo.	-	ND	(Viana-Baptista <i>et al.</i> , 2002)

**Legenda:** ♀ Mulher; ♂ Homem.

## B.2.6. Tratamento

A CTX é uma doença tratável com suplementos orais de ácido quenodesoxicólico (CDCA), o que permite controlar a evolução da doença e conduz a recuperação neurológica

significativa (Bel *et al.*, 2001). Estudos indicam que a associação de suplementos orais de CDCA com inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coA reductase (pravastatina e simvastatina) é mais eficiente na redução dos níveis de colestanol sérico, sugerindo um efeito sinérgico desta combinação (Gerald *et al.*, 2007; Burnett *et al.*, 2001).

A CTX é uma doença progressiva havendo um agravamento com a idade, devido à maior deposição de colestanol nos tecidos e por serem os danos físicos e neurológicos mais graves, daí a importância de um diagnóstico precoce para o início atempado do tratamento (Bhattacharyya *et al.*, 2007). Contudo, o reconhecimento de CTX é difícil dada a heterogeneidade clínica e porque os sinais clássicos de CTX (cataratas juvenis e xantomas nos tendões) podem estar ausentes ou aparecerem somente após os sinais neurológicos (Lorincz *et al.*, 2005). Desta forma, o diagnóstico de CTX deve ser considerado em jovens adultos com xantomas no tendão, cataratas, dificuldades cognitivas e alterações no cerebelo (Burnett *et al.*, 2001).

### **B.3. Material e Métodos**

#### **B.3.1. Metodologia**

O método cromatográfico de fase reversa HPLC-DAD desenvolvido e previamente aferido para a identificação e quantificação de esteróis, foi aplicado à quantificação dos níveis de colestanol em amostras biológicas (soro).

As condições para a detecção e quantificação de colestanol pelo HPLC-DAD não variaram muito das condições optimizadas, excepto no volume de injeção que neste caso foi de 200 µl.

#### **B.3.2. Amostras**

- ✓ Soros e misturas de soros de vários indivíduos com suspeitas clínicas de síndromes metabólicas não confirmados.
- ✓ Amostra de soro controlo normal (fornecido por mim).

### **B.3.3. Material e equipamento**

#### ➤ **Material**

- ✓ Adaptadores de pequeno volume, “insert”;
- ✓ Filtros *millipore*® de 4mm (0.45µm) (*Millex*®-LH, ref. SLLHR04NL) e 2mm (0.22µm) (*Millex*®-LH, ref. SLLHR04NL);
- ✓ Micropipetas de 100, 200 e 1000µl;
- ✓ Pipetas de vidro;
- ✓ Tetinas;
- ✓ Recipiente para gelo;
- ✓ Seringas de 2ml com agulha;
- ✓ Suportes;
- ✓ Tubos de vidro de 10ml com rolha para extracção de lípidos;
- ✓ Tubos de vidro de 10ml de fundo cónico;
- ✓ “Vials” (frascos de colocação da amostra no injector automático).

#### ➤ **Equipamento**

- ✓ Agitador automático (*Multi Tube Vortexer* , modelo VX-2500);
- ✓ Banho de água (*Memmert*, modelo WNB 7-45);
- ✓ Centrífuga (*Heraeus Instruments*, Labofuge 400e);
- ✓ Coluna *Lichrospher*® RP-18, 250/4 cm, 5µm;
- ✓ Evaporador com fluxo de azoto (*Techne*, modelo FSC 4000);
- ✓ Aparelho HPLC (*Lachrom*, *Merck Hitashi*) e computador com software de controlo (*HSM-system 1*);
- ✓ Detector “diode-array” (DAD) (*Hitachi*, modelo L-7455);
- ✓ Sistema de filtragem da fase móvel (*E.M.G.*, modelo 63/2);
- ✓ Vortex (*Heidolph*, modelo Deax 2000).

### **B.3.4. Reagentes e soluções**

- ✓ Etanol absoluto (*Panreac*, ref. 121086.1212): fornecido em frascos de 2.5L;
- ✓ Etanol 96%: mediu-se 4mL de H<sub>2</sub>O destilada e adicionou-se 96mL de etanol absoluto, de modo a fazer um volume final de 100mL;
- ✓ KOH (*Merck*, ref. 6498): fornecido em pastilhas e em frasco de 1kg;

- ✓ Solução 0.6M de KOH em etanol a 90%: Pesou-se 3.37g de KOH e dissolveu-se em 10mL de H<sub>2</sub>O destilada, sob agitação. Adicionou-se lentamente e em volumes reduzidos etanol a 90% até se perfazer o volume final de 100mL;
- ✓ n-Hexano (*Merck*, ref. 1.04367): fornecido em frascos de 1L;
- ✓ Metanol para HPLC (*VWR*, ref.0502679) (*J. T. Baker*, ref. 8404): fornecido em frascos de 2,5L;
- ✓ H<sub>2</sub>O destilada;
- ✓ H<sub>2</sub>O para HPLC (*VWR*, ref. 0604270): fornecida em frascos de 2.5L;
- ✓ Brassicasterol (*Sigma*, ref. B4936): fornecido em frascos de 5mg e armazenado a 2-8°C;
- ✓ Solução de Brassicasterol 500µM: adicionou-se 1.99mg de brassicasterol a um volume de 10ml de etanol a 96% e deixou-se a agitar lentamente até dissolver. Armazenar a -20°C;
- ✓ Colestanol (Dihidrocolesterol) (*Sigma*, ref. D-6128): fornecido em frascos de 10g e armazenado à temperatura ambiente;
- ✓ Solução de Colestanol 1mM: adicionou-se 38.9mg de colestanol a um volume de 100ml de etanol a 90% e deixou-se a agitar lentamente até dissolver. Armazenar a -20°C;
- ✓ Fase móvel 100:4 de metanol/H<sub>2</sub>O (filtrada e desgaseificada).

#### **B.3.4.1. Preparação dos padrões**

Com a solução de colestanol de concentração 1mM, preparam-se padrões de concentrações de 500, 200, 100, 50, 25 e 12.5µM para a curva de calibração e para os ensaios de determinação da sensibilidade do método. Com a solução de brassicasterol de 500µM, prepararam-se padrões de 50 e 25µM, para serem utilizados como padrão interno.

#### **B.3.5. Procedimento**

O procedimento para a identificação e quantificação de colestanol no soro pode ser dividido em 4 fases:

1. Hidrólise, extração de lípidos e obtenção de extracto seco;
2. Preparação das amostras e padrões;
3. Análise por HPLC.

### **B.3.5.1. Hidrólise, extração de lípidos e obtenção de extracto seco**

- 1) Descongelaram-se os soros à temperatura ambiente (T.A.)
- 2) Com a ajuda de uma micropipeta adicionaram-se 1000µl de soro a cada tubo de extração de lípidos (tubos de fundo redondo com rolha).
- 3) A cada tubo de extração de lípidos foram também adicionados 1000µl de KOH 0.6M e 100µl de padrão interno (brassicasterol 25µM).
- 4) Os tubos foram colocados no banho de água durante 30 min. a 55°C, de forma a promover o corte das ligações éster.
- 5) Retiraram-se os tubos e colocaram-se a arrefecer à T.A.
- 6) A cada tubo adicionou-se 4ml de n-hexano e 1ml de H<sub>2</sub>O destilada.
- 7) Os tubos de extracção foram colocados num agitador automático durante 10 minutos.
- 8) Depois foram centrifugados durante 5 minutos a 3500 rpm.
- 9) Com a ajuda de uma pipeta de vidro, transferiu-se o sobrenadante (fase orgânica) de cada tubo de extracção para tubos de fundo cónico (sem tocar na interfase). A fase aquosa foi rejeitada.
- 10) A fase orgânica foi levada à secura total em corrente de azoto.

### **B.3.5.2. Preparação das amostras e padrões**

- 1) O extracto seco foi retomado com 600µl de fase móvel filtrada e dissolvido por agitação no vórtex.
- 2) Seguidamente, foram filtradas directamente para um “insert”, utilizando filtros de reduzido volume morto (0.22 e 0.45µm). De modo a minorar as perdas de amostra durante a filtração, montou-se um sistema composto por uma seringa, uma ponta de micropipetas, um filtro e um “insert”.
- 3) Quando às amostras é adicionada sobrecarga de um padrão de colestanol, pipeta-se para um “insert” 150µl de amostra filtrada e 150µl de padrão de colestanol.
- 4) O “insert” foi colocado num vial, foi rolhado e colocado no prato do injector automático do HPLC.
- 5) Os padrões de colestanol, para as diferentes concentrações, foram filtrados directamente para um “insert”, utilizando filtros de reduzido volume morto (0.45µm). O “insert” foi colocado num vial, foi rolhado e colocado no prato do injector automático do HPLC.

### **B.3.5.3. Análise por HPLC**

Antes de efectuar uma análise por HPLC, a coluna C-18, 5  $\mu\text{m}$ , foi deixada a equilibrar com fase móvel de um dia para o outro.

A análise foi efectuada com as seguintes condições de detecção:

- Eluição isocrática (fase móvel de metanol/água 100:4);
- Tempo de corrida 40 minutos;
- Temperatura 30°C;
- Taxa de fluxo: 1 ml/min.;
- Volume de injeção da amostra: 200 $\mu\text{l}$ ;
- Detector DAD com variação do comprimento de onda entre 200-400nm e com comprimento de onda fixo nos 210nm.

A série de análises iniciou-se quando se registou estabilidade na linha de base. Foi feita uma lista de injeção no menu correspondente do Software HSM-system 1 e dada ordem de arranque. Os cromatogramas obtidos foram analisados recorrendo-se à integração manual e automática do Software, para se determinar as áreas dos picos cromatográficos.

### **B.3.6. Plano de trabalho**

As amostras de soro foram sujeitas a diferentes condições de análise. A tabela seguinte sumaria as várias estratégias de trabalho.



**Tabela B.3.1.** Tabela com o plano de trabalho de todos os ensaios com amostras de soro realizados (ensaios efectuados em duplicado).

<b>Ensaio</b>	<b>Amostras</b>
<b>1</b>	Extracções da amostra A*, com e sem a sobrecarga.
<b>2</b>	2 Extracções das amostras A* e B**, com sobrecarga.
<b>3</b>	Extracção de 2 amostras A*, com e sem sobrecarga.
<b>4</b>	Extracção de 2 amostras B** com sobrecarga.
<b>5</b>	5 Extracções para a amostra A*, com e sem a sobrecarga.
<b>6</b>	10 Extracções para a amostra A*. As primeiras 5 extracções foram feitas com sobrecarga e as últimas 5 sem sobrecarga.
<b>7</b>	3 Extracções para a amostra A*. Amostras filtradas com filtro de 0.22 µm e com sobrecarga.
<b>8</b>	4 Extracções para a amostra C <sup>#</sup> , com sobrecarga.
<b>9</b>	Repetição do ensaio 8.

**Nota:** Para a sobrecarga é utilizado um padrão de colestanol de 100µM.

**Legenda:** A\* - “Pool” de soros controlo negativo para défices da biossíntese de colesterol;

B\*\* - “Pool” de soros controlo negativo para CDT;

C<sup>#</sup> - Soro fornecido por mim.

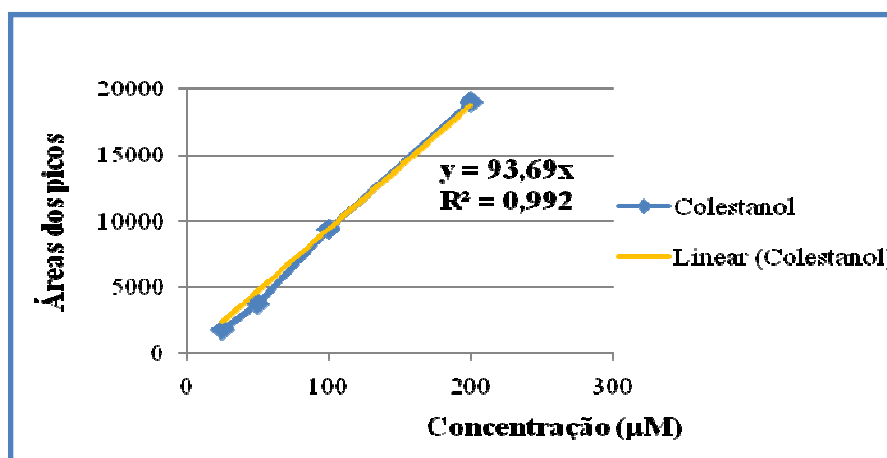
## **B.4. Resultados e Discussão dos Resultados**

### **B.4.1. Linearidade do método**

Foi feita uma curva de calibração para o colestanol, de forma a verificar a linearidade do método.

**Tabela B.4.1.** Áreas dos picos cromatográficos para as diferentes concentrações do padrão de colestanol.

Padrão de Colestanol	
Concentração (µM)	Área
200	19023
100	9411
50	3740
25	1790



**Figura B.4.1.** Recta de Calibração do colestanol. A linha em azul corresponde aos resultados obtidos com a solução padrão de colestanol e a linha amarela corresponde à linha de tendência. A equação da recta é  $y = 93,69 \cdot x$  e o  $R^2 = 0,992$ .

A curva de calibração do padrão de colestanol apresentou um valor de  $R^2$  muito próximo de um ( $R^2=0,992$ ), pelo que a recta de calibração é linear como se comprova pela linha de tendência. Desta forma, pode-se concluir que o método é linear e variação da concentração segue um padrão linear.

#### **B.4.2. Repetibilidade do método**

A determinação da repetibilidade foi feita repetindo 10 vezes o doseamento da mesma “amostra” (padrão de colestanol com concentração de 100µM), no mesmo dia e sob as mesmas condições de ensaio. Para avaliar a repetibilidade calculou-se o coeficiente de variação (%) intra-série.

$$\text{Coeficiente de variação (\%)} = (\text{desvio padrão/média}) \times 100$$

Nota: quanto menor for o valor do coeficiente de variação em %, maior é a reprodutibilidade.

O cálculo das concentrações do padrão de colestanol foi feito por interpolação à recta de calibração, utilizando a respectiva equação. Dado a linearidade do método, pode-se determinar a concentração dos compostos, utilizando uma fórmula e fazendo sempre correr em cada série o padrão de colestanol com concentração conhecida.

Fórmula para o cálculo das concentrações do composto:

$$\text{Concentração } (\mu\text{M}) = \frac{\text{Área amostra}}{\text{Área do Padrão}} \times \text{Concentração do padrão } (\mu\text{M})$$

Os valores para a determinação da repetibilidade do método estão apresentados na tabela B.4.2.

**Tabela B.4.2.** Valores obtidos no ensaio do próprio dia.

Repetições	Área dos picos	Concentrações calculadas
1	10004	106.78
2	9258	98.82
3	9257	98.80
4	9062	96.72
5	9159	97.76
6	9760	104.17
7	9062	96.72
8	9194	98.13
9	9437	100.73
10	9681	103.33
Parâmetros		
<b>Média</b>	<b>9387</b>	<b>100.20</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>323</b>	<b>3.45</b>
<b>Coef. Variação (%)</b>	<b>-</b>	<b>3.44</b>

**Legenda:** Coef. Variação = Coeficiente de Variação.

O coeficiente de variação apresenta um valor de 3.44%, valor este aceitável para a validação de um método, tendo o método apresentado uma boa repetibilidade.

### B.4.3. Quantificação dos níveis de colestanol no soro

Foram analisados por HPLC-DAD, soros e “pools” de soros de vários controlos e uma amostra de soro fornecida por mim.

O objectivo é quantificar os níveis de colestanol em diferentes soros, calculando as respectivas concentrações, através da integração dos valores das áreas dos picos de colestanol identificados nas amostras e pela curva de calibração do colestanol. As quantidades de colestanol detectadas nos soros são depois comparadas com os valores de referência descritos na literatura e determinados por diferentes métodos (tabela B.4.3.).

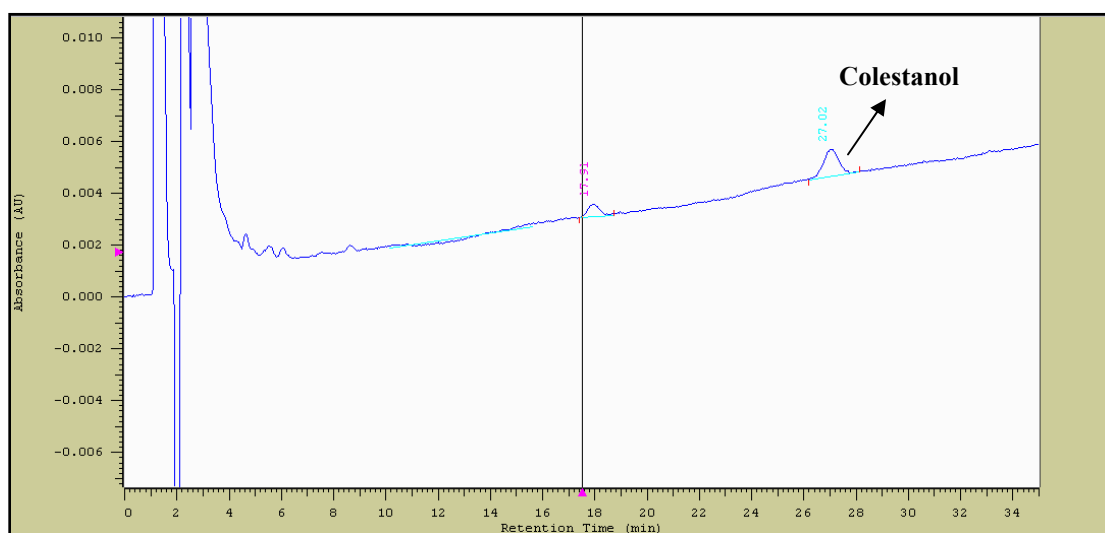
**Tabela B.4.3.** Levantamento bibliográfico de valores de referência dos níveis de colestanol no soro descritos em doentes com Xantomatose Cerebrotendinosa e grupos controlo.

Metodologia	Valores de referência do Colestanol		Concentração de Colestanol em Doentes CTX		Referências
	( $\mu\text{M}$ )	( $\mu\text{g/ml}$ )	( $\mu\text{M}$ )	( $\mu\text{g/ml}$ )	
HPLC (com o uso de um reagente fluorescente)	2.52 – 23.8	1.37 – 9.28			(Tsuruta <i>et al.</i> , 1993)
-	3.3 – 12.5	1.28 – 4.86	5 doentes: 1.º 61 2.º 19 3.º 46 4.º 63 5.º 100	5 doentes: 1.º 23.7 2.º 7.38 3.º 17.9 4.º 24.48 5.º 38.9	(Verrips <i>et al.</i> , 1999)
HPLC – UV	3.86 – 14.7	1.5 – 5.7	-	-	(Halperin <i>et al.</i> , 2000)
-	3.3 – 12.5	1.28 – 4.86	54 doentes CTX de 30 famílias varia entre: 19 - 311	54 doentes CTX de 30 famílias varia entre: 7.38 – 120.86	(Verrips <i>et al.</i> , 2000)
GC-MS	15	5.8	82.35	32	(Burnett <i>et al.</i> , 2001)
-	-	-	2 doentes: 1.º 102.42 2.º 111.17	2 doentes: 1.º 39.8 2.º 43.2	(Lorincz <i>et al.</i> , 2005)
HPLC-MS	8.03 – 32.37	3.12 – 12.58			(Nagy <i>et al.</i> , 2006)
-	2.57 – 12.8	1.0 – 5.0	60.73	23.6	(Siman-Tov <i>et al.</i> , 2006)
Gas liquid chromatography (GLC)	5.14 – 15.43	2.0 – 6.0	2 doentes: 1.º 90.01 $\pm$ 0.15 2.º 92.64 $\pm$ 1.29	2 doentes: 1.º 35 $\pm$ 0.06 2.º 36 $\pm$ 0.5	(Bhattacharyya <i>et al.</i> , 2007)

-	-	-	22.9	8.9	(Okuma <i>et al.</i> , 2007)
-	< 17	< 6.6	82.35	32	(Gerald <i>et al.</i> , 2007)
-	-	-	33.45 – 128.67	13 - 150	(Panzenboeck <i>et al.</i> , 2007)

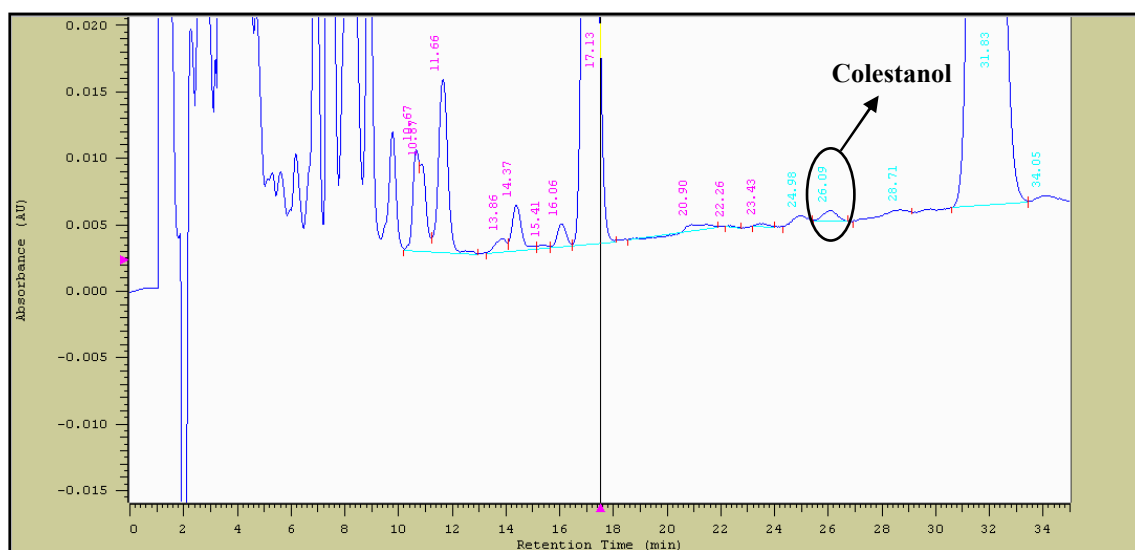
### B.4.3.1. Cromatogramas

A análise por HPLC de um padrão de colestanol de 100µM permite obter o seguinte cromatograma:



**Figura B.4.2.** Cromatograma obtido por análise HPLC com detector DAD de um padrão de colestanol com concentração de 100µM. O tempo de retenção do colestanol é de 27.02 minutos.

Os cromatogramas obtidos com as amostras de soro com sobrecarga de um padrão de colestanol de 100µM, permitem uma melhor visualização e identificação dos picos de colestanol em cada análise (fig. B.4.3.), do que sem sobrecarga (pico de colestanol muito pequeno). O uso da sobrecarga permite a confirmação de que o pico identificado no cromatograma corresponde ao de colestanol.



**Figura B.4.3.** Cromatograma de HPLC de uma amostra de soro com sobrecarga de um padrão de colestanol com concentração de 100  $\mu\text{M}$ . O tempo de retenção do colestanol é de 26,09 minutos.

#### **B.4.3.2. Quantificação do colestanol**

Recorrendo à fórmula empírica e à integração das áreas dos picos de colestanol identificados, foram determinadas as concentrações de colestanol nas diferentes amostras, embora, estas também possam ser determinadas por integração das áreas na equação da recta de calibração, quando o método é linear.

A concentração dada pela fórmula para o cálculo das concentrações do composto (secção B.4.2.) apenas fornece a concentração de colestanol nos 200 $\mu\text{l}$  de extracto injectado no aparelho e o que se pretende, é o valor da concentração de colestanol no soro adicionado inicialmente. Há que atender a que depois da secura total em azoto os extractos são retomadas com 600 $\mu\text{l}$  de fase móvel filtrada (correspondendo à quantidade existente em 1 ml de soro submetido a análise), pelo que, à fórmula anteriormente proposta, é adicionado o factor de diluição 0.6, que corresponde à diluição de 600/1000 da retoma da amostra. A fórmula toma assim a seguinte estrutura:

$$\text{Concentração } (\mu\text{M}) = \frac{\text{Área amostra}}{\text{Área do Padrão}} \times \text{Concentração do padrão } (\mu\text{M}) \times \text{factor de diluição}_{\text{retoma}}$$

Em que o factor de diluição é de 0.6, a área do padrão corresponde à área do padrão de colestanol de 100 $\mu\text{M}$  e a concentração padrão é de 100 $\mu\text{M}$ .

No caso, das amostras com sobrecarga de um padrão de colestanol de 100µM, a fórmula toma outra configuração:

$$\text{Concentração } (\mu\text{M}) = \frac{((\text{Área}_{\text{amostra+sobrecarga}} - \text{Área}_{\text{padrão } 50 \mu\text{M}}) \times 2)}{\text{Área do Padrão}} \times \text{Concentração do padrão } (\mu\text{M}) \times \text{factor diluição}_{\text{retoma}}$$

Em que a Área amostra = (Área<sub>amostra+sobrecarga</sub> - Área<sub>padrão 50 µM</sub>) x factor diluição, onde o factor de diluição é 2, uma vez que a diluição foi de 1/2.

O factor de diluição da retoma é de 0.6, a área do padrão corresponde à área do padrão de colestanol de 100µM e a concentração padrão é de 100µM.

A área do padrão da sobrecarga de colestanol na forma diluída corresponde à área do padrão de colestanol de 50µM, uma vez que, com a adição do padrão de 100µM à amostra, a sua concentração é diluída para 50µM.

A tabela B.4.4. que se segue sumaria os resultados das concentrações de colestanol obtidas nas diferentes amostras de soro, submetidas a várias condições de análise.

**Tabela B.4.4.** Concentrações de colestanol determinadas nas diferentes amostras de soro utilizadas nos diferentes ensaios.

Ensaio	Amostras	Concentração (µM) de Colestanol nas amostras		
		Média dos ensaios	Desvio padrão	Intervalo
1	Amostra A* (n= 4)	79.89	11.29	68.6 – 91.18
2	Amostra A* (n= 4)	109.74	2.76	106.98 – 112.50
	Amostra B** (n= 4)	90.01	3.56	86.45 – 93.57
3	1.º Amostra A* (n= 4)	51.9	11.55	40.35 – 63.45
	2.º Amostra A* (n= 4)	41.61	9.96	31.65 – 51.57
4	1.º Amostra B** (n= 4)	32.01	3.75	28.26 – 35.76
	2.º Amostra B** (n= 4)	25.53	8.90	16.63 – 34.43
5	Amostra A* (n= 10)	87.71	16.84	70.87 – 104.55
6	Amostra A* (n= 20)	125.22	11.56	113.66 – 136.78
7	Amostra A* (n=6)	115.86	12.66	103.20 – 128.52
8	Amostra C <sup>#</sup> (n=8)	171.53	6.29	165.24 – 177.82
9	Amostra C <sup>#</sup> (n=8)	139.55	10.66	128.89 – 150.21

**Legenda:**A\* - Soros controlo negativo para défices da biossíntese de colesterol;

B\*\* - Soros controlo negativo para CDT;

C<sup>#</sup> - Soro fornecido por mim.

As concentrações de colestanol obtidas nestas amostras são muito superiores às dos valores de referência descritos na literatura, determinados por diferentes métodos. Além disso, as concentrações de colestanol nos diferentes ensaios oscilam de grandeza, mesmo quando é utilizada a mesma amostra de origem. Esta observação sugere que possa existir uma interferência, com o tempo de retenção idêntico ao do colestanol, nomeadamente, outro esterol presente na amostra com peso molecular idêntico ou próximo ao do colestanol e que esteja a migrar e a ser identificado e quantificado no mesmo pico que o do colestanol. Esteróis com pequenas diferenças na composição química, mais especificamente, no peso molecular, podem interferir com o tempo de retenção dos compostos, o que influencia a quantificação dos picos, o que no nosso caso, pode provocar valores anormais de colestanol (que é o caso, exageradamente elevados) em amostras de indivíduos normais.

Do ensaio 6 para o ensaio 7, mudou-se a marca de metanol utilizado na preparação da fase móvel, para descartar possíveis influências que a fase móvel teria nos resultados, contudo, como se comprova com os resultados obtidos, as concentrações de colestanol determinadas nos dois ensaios não variaram significativamente.

Observando o cromatograma de uma das amostras de soro (fig. B.4.3.), verifica-se que ao lado e com tempos de retenção muito próximos ao do pico do colestanol, aparecem outros picos de compostos ainda não identificados, que podem estar a ter alguma interferência na quantificação do pico de colestanol, pois estão a sobrepor-se ao pico ou a alterar a linha de base do cromatograma, alterando o valor da área.

Uma das alternativas ou solução para evitar a interferência de outros compostos na identificação e quantificação de colestanol no soro, por este método, seria otimizar o método para outras condições, variando a temperatura, a pressão e a constituição da fase móvel ou alterar a preparação das amostras, fazendo uma derivatização para rejeitar outros compostos contidos na amostra. No entanto, estas possíveis soluções apenas aqui são sugeridas, uma vez que até à data, ainda não foram possíveis de ser praticadas face ao pouco tempo disponível para as realizar, à sobrecarga do aparelho em termos de utilizações diversas e face aos custos de material que estas experiências acarretariam.

Embora se tenha determinado a linearidade e repetibilidade deste método não foi feito o ensaio da reprodutibilidade, dada a falta de especificidade do método, para a quantificação do colestanol em amostras de soro, tal como explicado anteriormente.



## **B.5. Conclusão**

Este método HPLC-DAD apesar de ser bastante linear e repetível, não apresenta sensibilidade e especificidade suficiente para a quantificação dos níveis de colestanol em amostras de soro, embora se tenha mostrado bastante sensível na quantificação de outros esteróis.

Assim, o objectivo de utilizar o método HPLC-DAD, previamente optimizado, na análise do colestanol em amostras de soros controlos e doentes com CTX, não foi atingido. Contudo, esta experiência tem aspectos positivos, nomeadamente em termos de prática laboratorial e no conhecimento adquirido, na elaboração de hipóteses e sua eliminação e em procurar soluções alternativas.

## **B.6. Bibliografia**

**Bahr**, S.; Movin, T.; Papadogiannakis, N.; Pikuleva, I.; Ronnow, P.; Diczfalusy, U.; Bjorkhem, I. (2002). "Mechanism of Accumulation of Cholesterol and Cholestanol in Tendons and the Role of Sterol 27-hydroxylase (CYP27A1)." *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*; 22: 1129-1135.

**Bel**, S.; García-Patos, V.; Rodríguez, L.; Selva, A.; Díaz, P.; Wolthers, B.G.; Castells, A. (2001). "Cerebrotendinous Xanthomatosis." *J. Am. Acad. Dermatol.*; 45: 292-295.

**Bhattacharyya**, A.K.; Lin, D.S.; Connor, W.E. (2007). "Cholestanol metabolism in patients with Cerebrotendinous Xanthomatosis: absorption, turnover, and tissue deposition." *Journal of Lipid Research*; 48: 185-192.

**Burnett**, J.R.; Moses, E.A.; Croft, K.D.; Brown, A.J.; Grainger, K.; Vasikaran, S.D.; Leitersdorf, E.; Watts, G.F. (2001). "Clinical and biochemical features, molecular diagnosis and long-term management of a case of Cerebrotendinous Xanthomatosis." *Clinica Chimica Acta*; 306: 63-69.

**Dias, D.;** Almeida, I.; Magalhães, M. (2005). “Xantomatose Cerebrotendinosa: evolução clínica e achados neurorradiológicos.” *Sinapse*; 5 (2): 77.

**Dubrac, S.;** Lear, S.R.; Ananthanarayanan, M.; Balasubramanian, N.; Bollinemi, J.; Shefer, S.; Hyogo, H.; Cohen, D.E.; Blanche, P.J.; Kraunss, R.M.; Batta, A.K.; Salen, G.; Suchy, F.J.; Maeda, N.; Erickson, S.K. (2005). “Role of CYP27A in cholesterol and bile acid metabolism.” *Journal of Lipid Research*; 46: 76-85.

**Gallus, G.N.;** Dotti, M.T.; Federico, A. (2006). “Clinical and molecular diagnosis of Cerebrotendinous Xanthomatosis with a review of the mutations in the CYP27A1 gene.” *Neurol. Sci.*; 27: 143-149.

**Geraldes, R.;** Carvalho, M. (2004). “Xantomatose Cerebrotendinosa (CTX): aspectos clínicos, genéticos e electrofisiológicos.” *Sinapse*; 4 (2): 92.

**Geraldes, R.;** Santos-Bento, M; Carvalho, M. (2007). “Cerebrotendinous Xanthomatosis: No involvement of the autonomic nervous system in a case with severe neuropathy.” *Clinical Neurophysiology*; 37:47-49.

**Halperin, G.;** Elisaf, M.; Leitersdorf, E.; Harats, D. (2000). “A new method for determination of serum cholestanol by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection.” *J. Chromatography B*; 742: 345-352.

**Lange, M.C.;** Zétola, V.F.; Teive, H.A.G.; Scola, R.H.; Trentin, A.P.; Zavala, J.A.; Pereira, E.R.; Raskin, S.; Werneck, L.C.; Siermans, E.A. (2004). “Cerebrotendinous Xanthomatosis. Report of two Brazilian brothers.” *Arq. Neuropsiquiatr.*; 62: 1085-1089.

**Lorincz, M.T.;** Rainier, S.; Thomas, D. (2005). “Cerebrotendinous Xanthomatosis. Possible Higher Prevalence Than Previously Recognized.” *Arch. Neurol.*; 62: 1459-1463.

**Matos, A.;** Matias, F.; Rebelo, O. (2004). “Xantomatose Cerebro-Tendinosa: um caso anatomo-clínico.” *Sinapse*; 4 (1): 95.

**Moghadasian**, M.H.; Salen, G.; Frohlich, J.J.; Scudamore, C.H. (2002). "Cerebrotendinous Xanthomatosis. A Rare Disease with Diverse Manifestations." *Arch. Neurol.*; 59: 527-529.

**Nagy**, K.; Jakab, A.; Pollreisz, F.; Bongiorno, D.; Ceraulo, L.; Averna, M.R.; Noto, D.; Vékey, K. (2006). "Analysis of sterols by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry combined with chemometrics." *Rapid Commun. Mass Spectrom.*; 20: 2433-2440.

**Okuma**, H.; Kitagawa, Y.; Tokuoka, K.; Takagi, S. (2007). "Cerebrotendinous Xanthomatosis with Cerebellar Ataxia as the Chief Symptom." *Internal Medicine*; 1259-1261.

**Panzenboeck**, U.; Andersson, U.; Hansson, M.; Sattler, W.; Meaney, S.; Bjorklem, I. (2007). "On the mechanism of cerebral accumulation of cholestanol in patients with Cerebrotendinous Xanthomatosis." *Journal of Lipid Research*; 48: 1167-1174.

**Siman-Tov**, T.; Meiner, V.; Gadoth, N. (2006). "Could steroids mask the diagnosis of Cerebrotendinous Xanthomatosis?" *Journal of Neurological Sciences*; 243: 83-86.

**Smithard**, A.; Lamymann, M.J.; McCarthy, C.L.; Gibbons, C.L.M.H.; Cooke, P.J.; Athanasou, N. (2007). "Cerebrotendinous Xanthomatosis presenting with bilateral Achilles tendon xanthomata." *Skeletal Radiol.*; 36: 171-175.

**Tsuruta**, Y.; Teranishi, T.; Date, Y.; Kohashi, K. (1993). "Simultaneous determination of cholesterol and cholestanol in human serum by high-performance liquid chromatography using 3-(5,6-methylenedioxy-2-phthalimidyl)benzoyl azide as precolumn fluorescent labelling reagent." *J. Chromatogr.*; 617: 213-220.

**Verrips**, A.; Nijeholt, G.J.L.; Barkhof, F.; Engelen, B.G.M.V.; Wesseling, P.; Luyten, J.A.F.M.; Wevers, R.A.; Stam, J.; Wokke, J.H.J.; Heuvel, L.P.W.J.; Keyser, A.; Gabreels, F.J.M. (1999). "Spinal xanthomatosis: a variant of Cerebrotendinous Xanthomatosis." *Brain*; 122: 1589-1595.

**Verrips, A.;** Hoefsloot, L.H.; Steenbergen, G.C.H.; Theelen, J.P.; Wevers, R.A.; Gabreels, F.J.M.; Engelen, B.G.M.; Heuvel, L.P.W.J. (2000). “Clinical and molecular genetic characteristics of patients with Cerebrotendinous Xanthomatosis.” *Brain*; 123: 908-919.

**Viana-Baptista, M.;** Barreto, J.; Medeiros, E.; Morais, M.G. (2002). “Xantomatose Cerebro-Tendinosa: estudo clínico e laboratorial de uma família Portuguesa.” *Sinapse*; 2 (2): 78.

**Wang, Z.;** Yuan, Y.; Zhang, W.; Zhang, Y.; Feng, L. (2007). “Cerebrotendinous Xanthomatosis with a compound heterozygote mutation and severe polyneuropathy.” *Neuropathology*; 27: 62-66.