

# INVESTIGACIÓN TERAPÉUTICA: REACTIVACIÓN DEL GEN FMR1 CAUSANTE DEL SÍNDROME X FRÁGIL

**Resumen.** El síndrome X frágil representa la forma más común de discapacidad intelectual hereditaria en el mundo. Pertenece a un grupo enorme de más de 200 tipos de retrasos mentales que están causados por mutaciones en genes localizados en el cromosoma X, y que tienen como frecuencia colectiva 1 de cada 1.000 individuos. Este síndrome es también excepcional porque representó la primera enfermedad genética causada por la expansión de una zona inestable de tripletes CGG, por lo que se ha tomado como el prototipo de una lista creciente de enfermedades hereditarias causadas por mutaciones dinámicas, debidas a inestabilidad de repeticiones de tripletes. Diez años después de clonar el gen FMR1, causante del síndrome X frágil, todavía no sabemos todos los sucesos moleculares que tienen lugar para permitir la desestabilización de las repeticiones CGG, localizadas muy cerca de la isla CpG que regula la transcripción del gen FMR1. Sin embargo, encontrar que existe un efecto fundador en este síndrome indica que los cromosomas mutados actuales proceden de un número reducido de cromosomas ancestrales que sufrieron la inestabilidad y que han ido pasando de una generación a la siguiente. La expansión de los tripletes induce una metilación e inactivación del gen FMR1, lo que provoca la ausencia del producto proteico que codifica, la proteína FMRP, en las células de los pacientes afectados. Por ello, investigamos la forma de reactivar el gen FMR1 en las células de los pacientes para conseguir la producción de la proteína, y estudiar si se puede revertir el fenotipo a la normalidad. La reactivación se podría conseguir demetilando la zona reguladora de la transcripción; se observa transcripción del gen FMR1 al tratar las células de pacientes en cultivo, con agentes químicos demetilantes, así como traducción de la proteína. Al estudiar la reactivación de mutaciones completas en células de pacientes intentamos aprender más sobre la inactivación y esperamos que una posible manera de prevenir o revertir la afectación en los pacientes con el síndrome. [REV NEUROL 2001; 33 (Supl 1): S62-5]

**Palabras clave.** Investigación. Modelos celulares. Reactivación genética. Síndrome X frágil. Tratamiento.

# INVESTIGAÇÃO TERAPÊUTICA: REATIVAÇÃO DO GENE FMR1, CAUSA DA SÍNDROMA X FRÁGIL

**Resumo.** A síndrome X frágil representa a forma de incapacidade intelectual hereditária mais comum no mundo. Pertence a um grande grupo de mais de 200 tipos de atrasos mentais causados por mutações em genes localizados no cromossoma X, e que têm como frequência colectiva 1 em cada 1.000 indivíduos. Esta síndrome é excepcional também porque foi a primeira doença genética causada pela expansão de uma zona instável de tripletes CGG, pelo que se tornou como no protótipo de uma lista crescente de doenças hereditárias causadas por mutações dinâmicas, devidas à instabilidade de repetições de tripletes. Dez anos depois de clonar o gene FMR1 causador da síndrome X frágil, ainda não conhecemos todos os sucessos moleculares que têm lugar para permitir a desestabilização das repetições CGG, localizadas muito próximas da ilha CpG que regula a transcrição do gene FMR1. Contudo, encontrar que existe um efeito fundador nesta síndrome, indica que os cromossomas mutados actuais procedem de um número reduzido de cromossomas ancestrais que sofreram a instabilidade e que foram passando de geração em geração. A expansão dos tripletes induz uma metilação e inactivação do gene FMR1, o que provoca a ausência do produto proteico que codifica a proteína FMRP, nas células dos pacientes afectados. Por isso, investigámos a forma de reactivar o gene FMR1 nas células dos doentes para conseguir a produção da proteína, e estudar se é possível reverter o fenotipo para a normalidade. Poder-se-ia conseguir a reactivação desmetilando a zona reguladora da transcrição; observa-se transcrição do gene FMR1 ao tratar culturas de células de doentes, com agentes químicos desmetilantes, assim como tradução da proteína. Ao estudar a reactivação de mutações completas em células de doentes, tentámos aprender mais sobre a inactivação e, esperamos, uma possível maneira de prevenir ou reverter o envolvimento nos doentes com a síndrome. [REV NEUROL 2001; 33 (Supl 1): S62-5]

**Palavras chave.** Investigação. Modelos celulares. Reactivação genética. Síndrome X frágil. Tratamento.

## El tratamiento con L-acetilcarnitina del comportamiento hiperactivo de pacientes con el síndrome X frágil

M. Calvani<sup>a</sup>, S. D'Iddio<sup>a</sup>, A. de Gaetano<sup>b</sup>, P. Mariotti<sup>c</sup>, L. Mosconi<sup>a</sup>, M.G. Pomponi<sup>d</sup>, E. Tabolacci<sup>d</sup>, M.G. Torrioli<sup>c</sup>, S. Vernacotola<sup>c</sup>, G. Neri<sup>d</sup>

### L-ACETYL CARNITINE TREATMENT ON FRAGILE X PATIENTS HYPERACTIVE BEHAVIOUR

**Summary.** Hyperactivity is a significant problem for almost all young males affected by fragile X syndrome (FXS), the most common inherited disease causing mental retardation. Therapeutical approaches are actually based on Central Nervous System (CNS) stimulants lacking a well defined rationale and efficacy while they further decrease the patient's limited attention span. A pilot study on 17 fragile X male treated with L-acetylcarnitine (LAC) over one year, showed a significant reduction of their hyperactivity behaviour tested by the Conners Abbreviated Parent-Teacher Questionnaire. LAC use in FXS patients derives from the hypothesis that the biochemical and physiological properties this substance has may preserve brain activity. LAC is a small, hydrosoluble molecule that easily diffuses in the extracellular space and enters any cell in the nervous system through specific transporters. Different cerebral areas use this molecule differently to metabolize glucose and lipids to provide for ATP and neurotransmitters synthesis. The acetyl group LAC carriers represents a key metabolic signaling element possibly mediating its effect in the CNS. The exogenous administration of LAC may affect brain activity in FXS by: I) modulation of fuel partitioning for energy production, which at the mitochondrial level is associated with the Krebs's cycle metabolic role in neurotransmitter synthesis; II) remodelling of lipid membrane in terms of LAC actively determining the production of polyunsaturated fatty acids; III) preferential effect on the attention component of the cholinergic system which relies on its peculiar modality of communication in the CNS. Based on the above premises an explorative, double-blind, placebo controlled, multicenter study is ongoing. A total population of 160 children from nine European centers will be enrolled. The objective of this study is to determine the effect of LAC on the hyperactive behaviour of FXS children as evaluated by the administration of the Conners Abbreviated Parent Questionnaire. [REV NEUROL 2001; 33 (Supl 1): S 65-70]

**Key words.** Hyperactive behaviour. L-acetylcarnitine. Fragile X syndrome.

Recibido: 03.10.01. Aceptado: 08.10.01.

<sup>a</sup> Departamento Científico. Sigma-Tau S.p.A. <sup>b</sup> Laboratorio de Biomatemáticas. CNR. <sup>c</sup> Departamento de Neuropsiquiatría Infantil. Universidad Católica. <sup>d</sup> Instituto de Genética. Universidad Católica. Roma, Italia

Correspondencia: Dr. Menotti Calvani. Scientific Department. Sigma-Tau S.p.A. Via Pontina, km 30, 400. 00040 Pomezia, Roma, Italia.

© 2001, REVISTA DENEUROLOGÍA

## INTRODUCCIÓN

El síndrome X frágil (SXF) o de Martin Bell es una de las causas más comunes de retraso mental hereditario en el ser humano. Es más frecuente y cursa con más gravedad y características clínicas diferentes entre varones que entre mujeres, con una prevalencia general de 1:5.000, y es el resultado de un defecto en el cromosoma X en un extremo de su brazo largo (Xq27.3).

La expresión citogenética del sitio frágil en Xq27.3 se observa en aquellos pacientes que poseen una mutación completa del gen *FMR1* (en inglés, *Fragile X Mental Retardation 1*), que se clonó en 1991 [1].

En los individuos con SXF, un defecto en *FMR1*—mutación completa—inhibe la expresión del gen, el cual deja de producir la proteína que normalmente genera. Otros individuos son portadores: tienen un defecto menor en *FMR1*—premutación—y generalmente no presentan síntomas de X frágil.

La función probable de la proteína FMR1 (FMRP) es la de asistir en la formación de conexiones neuronales que subyacen a los procesos de aprendizaje y memoria. Una hipótesis, de alguna manera confirmada por los experimentos en el ratón *knockout* de X frágil, es que la FMRP influye directamente en la maduración de las sinapsis [2].

El trastorno se relaciona con el tamaño de las repeticiones del trinucleótido CGG (citosina-citosina-guanina), que se encuentra en la región promotora, se pasa de generación en generación y normalmente se halla en el margen entre 20 y 40 repeticiones.

La longitud de la repetición puede incrementarse lentamente en su paso por varias generaciones y se vuelve progresivamente más inestable. Una elongación de unas 54 repeticiones puede repentinamente expandirse hasta más de 200 en una generación. Este gran cambio—o mutación completa—se acompaña de metilación de las citosinas del promotor y de la misma secuencia CCG, y produce el bloqueo de la región promotora y la consiguiente falta de producción de FMRP. Ambos sexos pueden tener pequeñas expansiones o premutaciones de 54 a 200 repeticiones.

El SXF representa cerca de un tercio de los retrasos mentales ligados al cromosoma X y es la segunda causa de trastorno mental 'genético' en frecuencia después de la trisomía del cromosoma 21. Se presenta como una combinación de características físicas, conductuales y cognitivas.

El fenotipo del SXF incluye signos físicos como macroorquidismo, grandes orejas y mandíbula prominente. También se observan anomalías del tejido conjuntivo, que incluyen hipermovilidad de articulaciones digitales e inestabilidad de otras articulaciones [3,4].

De un 15 a 20% de los individuos con SXF exhiben algún tipo de comportamiento autista, como contacto visual pobre, aleteo de manos, movimientos y gestos raros, morderse las manos y capacidades sensoriales limitadas. Los problemas conductuales y el retraso en el lenguaje y el habla también son comunes en el SXF.

En los varones con SXF, los trastornos cognitivos y conductuales incluyen retraso mental—que puede ir de agudo a leve—, trastornos conductuales y afectivos, y trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) [5].

Casi todos los varones jóvenes con SXF y aproximadamente un tercio de las niñas afectadas tienen problemas de atención normalmente asociados a hiperactividad [6], cuyo tratamiento es un tema de gran importancia para muchas familias.

Aunque no existe actualmente una curación del SXF, sí hay medicamentos que pueden utilizarse para mejorar el cuadro clí-

nico del SXF. La medicación puede ayudar a mejorar problemas de comportamiento como hiperactividad, comportamiento impulsivo, cambios de humor, crisis agresivas, ansiedad y conductas obsesivo-compulsivas (en Hagerman R. Medication intervention. URL: <http://www.fragilex.org>). La medicación estimulante (por ejemplo, metilfenidato, dextroanfetamina, pemolina) de los sistemas de neurotransmisores de dopamina y norepinefrina mejoran la atención y la coordinación visuomotora y reducen la hiperactividad. La medicación estimulante ayuda a un 60 a 70% de pacientes con SXF en edad escolar. Es menos efectiva entre adolescentes o preescolares y tiene efectos secundarios, como incremento de la presión arterial y del ritmo cardíaco, pérdida de apetito y problemas de sueño. La medicación estimulante también tiende a empeorar los tics motores preexistentes. La mayoría de los efectos secundarios empeoran con dosis más elevadas y la irritabilidad o las rabietas pueden empeorar cuando cesa la medicación.

La clonidina puede usarse como alternativa apropiada a los estimulantes. Algunos estudios sugieren que la clonidina puede mejorar la estabilización del humor, aunque la sedación es un efecto secundario significativo. La clonidina puede usarse con éxito en niños preescolares de 3 o más años de edad. También puede utilizarse conjuntamente con metilfenidato u otros estimulantes.

Los cambios de humor y las crisis son problemas que afectan a muchos niños con SXF. Son particularmente comunes en varones adolescentes y adultos jóvenes. Las crisis pueden caracterizarse por verbalización agresiva o crisis físicas con bofeteados, patadas o mordiscos. En el pasado, la medicación antipsicótica—tranquilizantes mayores—frecuentemente se ha administrado cuando la modificación del entorno no ha resultado eficaz. Sin embargo, los antipsicóticos tienen efectos secundarios significativos y de larga duración, como discinesia de inicio tardío. Por tanto, una medicación más segura debe utilizarse siempre que sea posible, a no ser que el comportamiento psicótico complique la agresividad. La medicación que estabiliza el humor, como los anticonvulsivos—carbameceptina o ácido valproico—, pueden ayudar a mejorar el comportamiento y reducir las crisis en individuos, tengan o no ataques o EEG anormales.

El antidepresivo fluoxetina, un inhibidor de la entrada de serotonina, se ha demostrado que ayuda a reducir la agresión o crisis de comportamiento en aproximadamente un 70% de varones con SXF. Otros agentes de la serotonina, como el sertralino, también pueden ser de ayuda, según informaciones anecdóticas.

Otro problema común en el SXF es la ansiedad, como puede observarse en nuevas situaciones, e incluso en estos pacientes pueden darse ataques de pánico. El tratamiento relevante consiste en varias medicaciones (en Hagerman R. Medication intervention. URL: <http://www.fragilex.org>). Las benzodiacepinas son efectivas en la ansiedad, pero son adictivas y sedantes (paradójicamente, aumentan la hiperactividad) y los síntomas de abstinencia resultan problemáticos en casi todos los pacientes. Si se utiliza sólo intermitentemente o en dosis bajas causa menos problemas. La buspirona, un bloqueador de la entrada de serotonina del receptor 5HT<sub>1A</sub>, no es adictivo ni sedante, aunque sí menos efectivo para el tratamiento de ataques de pánico que las benzodiacepinas. La fluoxetina y la setralina—esta última también un bloqueador de la entrada de la serotonina—pueden ser de utilidad en el tratamiento de la ansiedad. La imipramina y la clonidina pueden mejorar la ansiedad, aunque los mayores beneficios se observan en el comportamiento hiperactivo.

Otro enfoque terapéutico del comportamiento hiperactivo

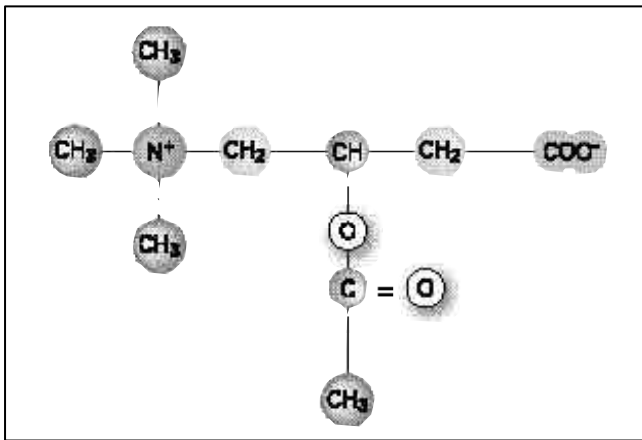


Figura. Estructura de la L-acetilcarnitina.

en pacientes con SXF se basa en la L-acetilcarnitina, un fármaco con propiedades biológicas diferentes.

### L-ACETILCARNITINA: UN NUEVO ENFOQUE TERAPÉUTICO

La estructura de la L-acetilcarnitina (LAC) –Figura– muestra una parte pequeña de la molécula soluble en agua de la familia de la metilamina. La LAC se produce naturalmente y de forma ubicua en fluidos corporales en concentraciones específicas. Es parte del sistema de la carnitina, que se compone de carnitina libre y ésteres de carnitina llamados acilcarnitinas (por ejemplo, acetilcarnitina). Las acilcarnitinas se forman durante procesos metabólicos que engloban una familia de aciltransferasas de carnitina unidas a membrana (CPT) y localizadas en orgánulos unidos a membrana, como mitocondrias, peroxisomas y el retículo endoplásmico [7]. Las enzimas CPT también se han encontrado en la membrana nuclear [8].

El sistema de la carnitina satisface dos requisitos celulares: el control de las concentraciones de éster de coenzima A –rápido y energéticamente económico– y la permeabilidad de grupo acil a través de membranas –que de otra manera no son permeables– sin la necesidad de volver a gastar energía [7]. Este papel fisiológico y la compartimentación de las enzimas carnitina son la base de las diferentes funciones metabólicas identificadas para el sistema carnitina: la oxidación beta de cadenas largas de ácidos grasos en las mitocondrias, la modulación del cociente acetil-CoA/CoA libre (CoASH), la estimulación del metabolismo oxidativo del piruvato y de las ramificaciones aminoácidas, la oxidación beta de largas cadenas de ácidos grasos en peroxisomas, la transferencia de acetil y otras cadenas cortas de grupos acil desde peroxisomas a mitocondrias, el sistema de *scavenging* de grupos acil, el provisionamiento de grupos acil para la síntesis de triacilglicerol y la elongación de ácidos grasos poliinsaturados en el retículo endoplásmico [8-10].

Estas actividades del sistema de la carnitina, que incluyen a los grupos acilo de cadenas de longitudes diferentes, contribuyen al mantenimiento del cociente CoA libre/acil-CoA citosólico y de orgánulos, un punto clave en la señalización intracelular y en la intervención de la regulación celular, que incluyen a la estructura de la membrana y a la transducción de señales [11,12].

Los recientemente identificados transportadores, el de carnitina dependiente de  $\text{Na}^+$  –OCTN2 (en inglés, *Organic Cation*

*Transporter N2*)–, de alta afinidad, y el transportador de carnitina independiente de  $\text{Na}^+$  –OCTN1–, de baja afinidad, también son parte del sistema de la carnitina [13].

Los sistemas de la carnitina obtienen especificidad tisular por variables, como la concentración de la carnitina libre, ésteres de carnitina, su cociente, las propiedades cinéticas de la enzima, las isoformas enzimáticas, los transportadores de carnitina y la regulación específica de órgano para la expresión de los genes que codifican enzimas de la carnitina.

En el cerebro, la LAC se transporta por la OCTN2 [14], pero se están estudiando otros transportadores [15]. Una vez la LAC está dentro de la célula, se transporta a las mitocondrias por la translocasa carnitina/acilcarnitina (en la cara interna de la membrana mitocondrial), donde se metaboliza por la enzima acetiltransferasa de la carnitina de la cara interna de la matriz de la membrana mitocondrial interna. El acetil-CoA y la carnitina son el resultado de la reacción; el primero es un metabolito crucial para el tránsito entre neuronas y glía [16]. Los efectos farmacológicos de la LAC sobre el sistema nervioso central (SNC) se relacionan más con el grupo acetato activo que compone la molécula. Se ha demostrado que el acetil-CoA derivado de la LAC entra en el ciclo de Krebs para producción de energía, siguiendo las rutas de síntesis de neurotransmisores y ácidos grasos poliinsaturados [9, 17-19]. En particular, algunas evidencias demuestran que el acetato derivado de la LAC tiene un destino distinto del derivado de la glucosa. El grupo acetil de la glucosa (la mayor fuente de AcetilCoA en el cerebro) es un precursor de ácidos grasos saturados (85%) y monosaturados (15%), pero no de los poliinsaturados, mientras que el grupo acetil de la LAC se incorpora no sólo en los ácidos grasos saturados (60%) y monosaturados (15%), sino también en los poliinsaturados (25%) [9].

La entrada de LAC al cerebro (LAC radioactivo) se ha estudiado en macacos Rhesus [20]. Los resultados evidencian que el grupo acetil se separa de la LAC inmediatamente después de la entrada al cerebro y el grupo carnitina se elimina rápidamente de éste, lo que confirma que la LAC endógena en suero desempeña un papel en la aportación de un grupo acetil al cerebro. El mismo estudio demostró que la entrada de LAC es más elevada en el córtex cerebral que en otras áreas del cerebro.

Las concentraciones fisiológicas en plasma y líquido cefalorraquídeo (LCR) no difieren significativamente: 5-18 nmoles/ml y ~2 nmoles/ml en plasma y CSF, respectivamente [21]. En el tejido cerebral, la LAC está presente en concentraciones más elevadas que en plasma, 45 nmoles/g (tejido hidratado) [22].

Los diferentes tipos de mitocondria cerebral con una maquinaria metabólica distinta (microheterogeneidad energética) implican que la LAC podría participar diferencialmente en la función cerebral (por ejemplo, en la síntesis de neurotransmisores, de lípidos o en el metabolismo de la glucosa). De hecho, la administración *in vivo* de LAC ha confirmado las diferencias de sensibilidad mitocondrial al tratamiento con LAC [23,24].

Son de interés dos artículos [25, 26] relativos al papel desempeñado por el sistema carnitina en la producción de cuerpos de cetonas en astrocitos en cultivos. Se puede formular la hipótesis de que la LAC participa en la síntesis de los cuerpos de cetonas, que son importantes sustratos energéticos en las neuronas durante la hipoxia-isquemia.

Los ensayos preclínicos apoyan la oportunidad de explotar las propiedades biológicas de la LAC en funciones cerebrales, específicamente en la atención, el aprendizaje y la memoria, con modelos diferentes que ayudan a entender su influencia sobre los sistemas colinérgico [19, 27-29] y glutamatérgico [30].

Se ha demostrado que la LAC puede inducir un aumento de la amplitud y una reducción de la latencia de ondas P300 (componentes endógenos de potenciales evocados parecidos a P300 en seres humanos) en estudios con monos cinomolgus [31]. Los estudios de potenciales de *spike action* demuestran que la aplicación de LAC cortical tiene una acción excitadora en las células excitadas por la acetilcolina y por cambios en los potenciales evocados visuales (PEV), de forma consistente con la activación colinérgica [32]. La aplicación de LAC a las neuronas reticulares del tronco cerebral de la rata, que contienen receptores muscarínicos y nicotínico colinérgicos, induce un aumento del 'disparo' o generación de señales y una potenciación de la transmisión colinérgica y serotoninérgica [33].

La LAC aumentó en un 140-150% la pendiente de los potenciales de excitabilidad postsináptica registrados de cortes del hipocampo del *stratum radiatum* de la región CA1 (modelo de potenciación a largo plazo que reproduce algunos aspectos del aprendizaje y la memoria) [34].

Celularmente, los estudios farmacológicos que usan cultivos primarios de neuronas demuestran que la LAC previene la neurotoxicidad del glutamato [35, 36]. Es interesante subrayar que ambos, los antagonistas de receptores metabotrópicos y los antagonistas de receptores muscarínicos, previenen el efecto protector de la LAC contra cualquier neurotoxicidad del glutamato [35].

Cuando se usa el modelo de rata vieja para la pérdida gradual de memoria y animal adulto, el tratamiento con LAC también mejora el aprendizaje y la memoria, y las funciones sensitivo-motoras en varias tareas conductuales [37-41]. En el animal viejo, la LAC contrarresta la reducción de las neuronas dependiente de la edad animal, [42] y la acumulación de lipofusina dentro del citoplasma o neuronas piramidales de la rata vieja [43]; también mantiene la plasticidad sináptica [44], aumenta la densidad y afinidad de los receptores D2 e incrementa la afinidad de los receptores D1 del ganglio basal de las ratas viejas [45]. Finalmente, el efecto de la LAC sobre déficit conductual debido a anoxia neonatal consiste en una mejora pronunciada de la memoria espacial en los tests del laberinto y una reducción significativa del aumento transitorio de husmeo, marcha atrás y actividad locomotora de la rata anóxica. [46].

Los ensayos clínicos han confirmado la actividad de LAC en funciones cognitivas. En pacientes con la enfermedad de Alzheimer, el tratamiento con LAC ha mostrado beneficios en términos del aplazamiento de la progresión de la enfermedad y, más específicamente, sobre el componente de atención de la función cognitiva [47-51].

### Tratamiento con LAC de pacientes con SXF

Un estudio reciente doble ciego ha demostrado la eficacia de la LAC en la mejora de la actividad de niños varones con SXF [52].

La LAC en dosis de 50 mg/kg/día o placebo se asignó aleatoriamente a 17 pacientes varones con SXF durante un año (ocho, LAC, y nueve, placebo), de edades comprendidas entre 6 y 13 años.

Los pacientes fueron examinados por un psicólogo antes del tratamiento y a uno, seis y 12 meses después del inicio del tratamiento usando tests neuropsicológicos: escala de inteligencia de

Wechsler revisada para niños (WISC-R), test de Bender Gestalt y cuestionario abreviado padre-profesor de Conners (1973).

La terapia con LAC se toleró bien y no se observaron efectos secundarios.

Los resultados de los tests WISC-R mostraron que los coeficientes intelectuales (CI) de los pacientes, de acuerdo con los datos de la literatura [5], variaron de < 30 a 69, sin cambios después del tratamiento (< 30 a 71, a los 12 meses).

El test de Bender Gestalt mostró funciones perceptivo-visuales y gráficas relacionadas con el nivel de retraso mental y unas diferencias estadísticamente no significativas entre pacientes tratados y sin tratar.

El cuestionario abreviado padre-profesor de Conners, cumplimentado por los padres, mostró una reducción significativa ( $p=0,0065$ ) de sintomatología de hiperactividad en los tests realizados 12 meses después del tratamiento, comparados con los efectuados antes del tratamiento en sujetos tratados con LAC. Los sujetos con placebo aumentaron ( $+0,244 \pm 0,164$ ) y los sujetos tratados disminuyeron ( $-0,325 \pm 0,098$ ) sus valores durante el período de un año. No se observaron modificaciones en el test intermedio (después de uno y seis meses de tratamiento).

El cuestionario de Conners cumplimentado por los profesores no mostró diferencias significativas entre los sujetos tratados y los no tratados.

Los resultados discordantes entre los cuestionarios rellenos por los padres y por los profesores pueden deberse al hecho de que, en Italia, los profesores de apoyo se encargan de los alumnos con retraso mental y se conoce que el comportamiento hiperactivo puede ser mínimo o ausente en una relación estricta uno a uno (DSM-IV, 1994).

Con base en estos resultados se está llevando a cabo un ensayo clínico para evaluar la eficacia de la LAC en un mayor número de pacientes con SXF. El objetivo principal de este estudio de fase II—aleatorizado, doble ciego, placebo control, paralelo y multicéntrico de ámbito europeo—es verificar el efecto de la LAC en el comportamiento hiperactivo de 160 niños varones con SXF. El período de doble ciego durará 12 meses, durante los cuales una preparación oral de LAC y el correspondiente placebo se administrarán a los niños en dosis diaria de 500 mg, dos veces al día (2 saquitos/día), en el desayuno y en la merienda: la única medicación concomitante admitida con acción sobre el SNC son los fármacos antiepilépticos. No se permitirá cualquier otro fármaco que actúe sobre el SNC, como estimulantes, tranquilizantes o hipnóticos.

Para poder ser candidato de elección en este protocolo, los pacientes deben satisfacer los siguientes criterios: edad entre 6 (inclusive) y 13 años (exclusive), diagnóstico molecular de SXF y diagnóstico de hiperactividad según DSM IV.

La eficacia del estudio se evaluará administrando a los pacientes o a sus padres y profesores los tests neuropsicológicos: WISC-R, test de Bender Gestalt, índice global de Conners (padre-profesor), *Vineland Adaptive Behavior Scale-Survey*, y test de Bells revisado. La seguridad y la tolerancia a la LAC se evaluarán en el estudio.

Se esperan resultados para finales del año 2002.

### BIBLIOGRAFÍA

1. National Center for Biotechnology Information, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIMTM), 309550. Fragile site mental retardation 1 (FMR1). June 22, 2001. [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>].
2. Kooy RF, Willemsen R, Oostra BA. Fragile X syndrome at the turn of the century. *Mol Med Today* 2000; 6: 193-8.
3. Meryash DL, Cronk CE, Sachs B, Gerald PS. An anthropometric study of males with the fragile-X syndrome. Cited in National Center for Biotechnology Information, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIMTM) [1].
4. Davids JR, Hagerman RJ, Eilert RE. Orthopaedic aspects of fragile-X syndrome. Cited in National Center for Biotechnology Information, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIMTM) [1].

5. Cianchetti C, Sannio-Fancello G, Fratta AL, Manconi F, Orano A, Pischedda MP, et al. Neuropsychological, psychiatric and physical manifestation in 149 members from 18 fragile X families. *Am J Med Genet* 1991; 40: 234-43.
6. Hangerman RJ, Silverman AC. *Fragile X syndrome. Diagnosis, treatment and research*. Baltimore (Maryland): Johns Hopkins University Press; 1991.
7. Zammit VA. Carnitine acyltransferase: functional significance of subcellular distribution and membrane topology. *Progress Lipid Res* 1999; 38: 199-224.
8. Murthy MSR, Pande SV. Molecular biology of carnitine palmitoyltransferases and role of carnitine in gene transcription. In De Simone C, Famularo G, eds. *Carnitine today*. Heidelberg: Springer-Verlag; 1997. p. 39-70.
9. Ricciolini R, Scalibastri M, Kelleher JK, Carminati P, Calvani M, Arduini A. Role of acetyl-L-carnitine in rat brain lipogenesis: implications for polyunsaturated fatty acids biosynthesis. *J Neurochem* 1998; 71: 2510-7.
10. Bremer J. The role of carnitine in cell metabolism. In De Simone C, Famularo G, eds. *Carnitine today*. Heidelberg: Springer-Verlag; 1997. p. 1-37.
11. Kim KH. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Ann Rev Nutr* 1997; 17: 77-99.
12. Hannun YA, Luberto C, Argraves KM. Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry* 2001; 40: 4893-903.
13. Tamai I, Ohashi R, Nezu J, Yabuuchi H, Oku A, Shimane M, et al. Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J Biol Chem* 1998; 273: 20378-82.
14. Kim CS, Roe CR, Ambrose WW. L-carnitine prevents mitochondrial damage induced by octanoic acid in the rat choroid plexus. *Brain Res* 1990; 536: 335-8.
15. Mroczkowska JE, Roux FS, Nalecz MJ, Nalecz KA. Blood-brain barrier controls carnitine level in the brain: a study on a model system with RBE4 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267: 433-7.
16. Sonnewald U, Westergaard N, Hassel B, Muller TB, Usgard G, Fonnum F, et al. NMR spectroscopic studies of <sup>13</sup>C acetate and <sup>13</sup>C glucose metabolism in neocortical astrocytes: evidence for mitochondrial heterogeneity. *Dev Neurosci* 1993; 15: 351-8.
17. Infante JP, Huszagh VA. Analysis of the putative role of 24-carbon polyunsaturated fatty acids in the biosynthesis of docosapentaenoic (22:5n-6) and docosahexaenoic (22:6n-3) acids. *FEBS* 1998; 431: 1-6.
18. Fariello RG, Ferraro TN, Golden GT, Demattei M. Systemic acetyl-L-carnitine elevates nigral levels of glutathione and GABA. *Life Sci* 1988; 43: 289-92.
19. Dolezal V, Tucek S. Utilization of citrate, acetylcarnitine, acetate, pyruvate and glucose for the synthesis of acetylcholine in rat brain slices. *J Neurochem* 1981; 36: 1323-30.
20. Kuratsune H, Watanabe Y, Yamaguti K, Jacobson G, Takahashi M, Machii T, et al. High uptake of (2-<sup>11</sup>C)acetyl-L-carnitine into the brain: a pet study. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 231: 488-93.
21. Rubio JC, de Bustos F, Molina JA, Jiménez-Jiménez FJ, Benito-León J, Martín MA, et al. Cerebrospinal fluid carnitine levels in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1998; 155: 192-5.
22. Hoppel C. The physiological role of carnitine. In Ferrari R, DiMauro S, Sherrwood G, eds. *L-carnitine and its role in medicine: from function to therapy*. Academic Press; 1992. p. 5-19.
23. Gorini A, D'Angelo A, Villa RF. Action of L-acetylcarnitine on different cerebral mitochondrial populations from cerebral cortex. *Neurochem Res* 1998; 23: 1485-91.
24. Gorini A, D'Angelo A, Villa RF. Energy metabolism of synaptosomal subpopulations from different neuronal systems of rat hippocampus: effect of L-acetylcarnitine administration in vivo. *Neurochem Res* 1999; 24: 617-24.
25. Blázquez C, Sánchez C, Daza A, Galve-Roperh I, Guzmán M. The stimulation of ketogenesis by cannabinoids in cultured astrocytes defines carnitine palmitoyltransferase I as a new ceramide-activated enzyme. *J Neurochem* 1999; 72: 1759-68.
26. Guzmán M, Blázquez C. Is there an astrocyte-neuron ketone body shuttle? *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12: 169-73.
27. Gibson GE, Shimada M. Studies on the metabolic pathway of the acetyl group for acetylcholine synthesis. *Biochem Pharmacol* 1980; 29: 167-74.
28. White HL, Scates PW. Acetyl-L-carnitine as a precursor of acetylcholine. *Neurochem Res* 1990; 15: 597-601.
29. Imperato A, Ramacci MT, Angelucci L. Acetyl-L-carnitine enhances acetylcholine release in the striatum and hippocampus of awake freely moving rats. *Neurosci Lett* 1989; 107: 251-5.
30. Tancredi V, Lo Giudice P, D'Arcangelo G, Siniscalchi A, Pacifici L, Ramacci MT. Acetyl-L-carnitine affects synaptic transmission in aged rats. 22nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Anaheim, California, USA, October 25-30, 1992 [abstract]. *Soc Neurosci* 1992; 18: 639.
31. Onofri M, Ghilardi MF, Faricelli A, Bodis-Wollner I, Calvani M. Effect of levo-acetylcarnitine on P300-like potentials of the normal monkey. *Drugs Exp Clin Res* 1987; 13: 407-15.
32. Onofri M, Bodis-Wollner I, Pola P, Calvani M. Central cholinergic effects of levo-acetylcarnitine. *Drugs Exp Clin Res* 1983; 9: 161-9.
33. Tempesta E, Janiri L, Salera P. The effects of microiontophoretically applied D-L, acetylcarnitine on single neurones in the rat brainstem. *Neuropharmacology* 1982; 21: 1207-10.
34. Lo Giudice P, Tancredi V, D'Arcangelo G, Bongiorno Borbone L, Siniscalchi A, Pacifici L, et al. Acetyl-L-carnitine and synaptic transmission in hippocampal slices. 23rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Washington DC, USA. November 7-12, 1993 [abstract]. *Soc Neurosci* 1993; 19: 1-3.
35. Miñana MD, Hermenegildo C, Llansola M, Montoliu C, Grisolia S, Felipe V. Carnitine and choline derivatives containing a trimethylamine group prevent ammonia toxicity in mice and glutamate toxicity in primary cultures of neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 279: 194-9.
36. Forloni G, Angeretti N, Smiraldi S. Neuroprotective activity of acetyl-L-carnitine: studies in vitro. *J Neurosci Res* 1994; 37: 92-6.
37. Ghilardi O, Milano S, Ramacci MT, Angelucci L. Effect of acetyl-L-carnitine chronic treatment on discrimination models in aged rats. *Physiol Behav* 1988; 44: 769-73.
38. Ghilardi O, Milano S, Ramacci MT, Angelucci L. Long-term acetyl-L-carnitine preserves spatial learning in the senescent rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1989; 13: 237-45.
39. Ghilardi O, Giuliani A, Caprioli A, Ramacci MT, Angelucci L. Spatial memory in aged rats: population heterogeneity and effect of levocarnitine. *J Neurosci Res* 1992; 31: 375-9.
40. Caprioli A, Markowska AL, Olton DS. Acetyl-L-carnitine: chronic treatment improves spatial acquisition in a new environment in aged rats. *J Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci* 1995; 50: B232-6.
41. Tagliatela G, Caprioli A, Giuliani A, Ghilardi O. Spatial memory and NGF levels in aged rats: natural variability and effects of acetyl-L-carnitine treatment. *Exp Gerontol* 1996; 31: 577-87.
42. Napoleone P, Ferrante F, Ghilardi O, Ramacci MT, Amenta F. Age-dependent nerve cell loss in the brain of Sprague-Dawley rats: effect of long term acetyl-L-carnitine treatment. *Arch Gerontol Geriatr* 1990; 10: 173-85.
43. Amenta F, Ferrante F, Lucarelli R, Ricci A, Ramacci MT. Reduced lipofuscin accumulation in senescent rat brain by long-term acetyl-L-carnitine treatment. *Arch Gerontol Geriatr* 1989; 9: 147-53.
44. Bertoni-Freddari C, Fattoretti P, Casoli T, Spagna C, Casell U. Dynamic morphology of the synaptic junctional areas during aging: the effect of chronic acetyl-L-carnitine administration. *Brain Res* 1994; 656: 359-66.
45. Giardinò L, Zanni M, Toschi L, Ramacci MT, Calzà L. Autoradiographic and in-situ hybridization study of dopamine-receptors in the basal ganglia of adult and old rats after chronic treatment with L-acetyl-carnitine. *Neuropsychopharmacology* 1993; 9: 146.
46. Dell'Anna E, Iuvone L, Calzolari S, Geloso MC. Effect of acetyl-L-carnitine on hyperactivity and spatial memory deficits of rats exposed to neonatal anoxia. *Neurosci Lett* 1997; 223: 201-5.
47. Thal LJ, Carta A, Clarke WR, Ferris SH, Friedland RP, Petersen RC, et al. A 1-year multicenter placebo-controlled study of acetyl-L-carnitine in patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 1996; 47: 705-11.
48. Mantero AA, Barbero G, Giannini R, Grosso VG, Tomasina C, Iannuccelli M. Acetyl-L-carnitine as a therapeutic agent for mental deterioration in geriatric patients (double-blind placebo controlled study). *New Trends Clin Neuropharmacol* 1989; 3: 172-4.
49. Sano M, Seil K, Cote L, Dooneef G, Lawton A, Legler L, et al. Double-blind parallel design pilot study of acetyl levocarnitine in patients with Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 1992; 49: 1137-41.
50. Testa G, Giaretta D, Pellegrini A, Chemello R, Fredro L, Angelini C. Preliminary study on the use of acetylcarnitine in patients with mental deterioration. *Riv Neurol* 1982; 52: 185-97.
51. Spagnoli A, Lucca U, Menasce G, Bandera L, Cizza G, Forloni G, et al. Long-term acetyl-L-carnitine treatment in Alzheimer's disease. *Neurology* 1991; 4: 1726-32.
52. Torrioli MG, Vernacola S, Mariotti P, Bianchi E, Calvani M, De Gaetano A, et al. Study of the evaluation of the acetyl-L-carnitine treatment in fra(X) male children. *Am J Med Genet* 1999; 87: 366-8.

# EL TRATAMIENTO CON L-ACETILCARNITINA DEL COMPORTAMIENTO HIPERACTIVO DE PACIENTES CON EL SÍNDROME X FRÁGIL

**Resumen.** Introducción. La hiperactividad es un problema significativo en casi todos los varones afectados por el síndrome X frágil (SXF), la enfermedad hereditaria más frecuente de retraso mental. Los enfoques terapéuticos se basan actualmente en estimulantes del sistema nervioso

# OTRATAMENTO DO COMPORTAMENTO HIPERACTIVO EM DOENTES COM A SÍNDROMA X FRÁGIL COM L-ACETILCARNITINA

**Resumo.** Introdução. A hiperatividade é um problema significativo em quase todos os homens afectados pela síndrome X frágil (SXF), a doença hereditária mais frequente de atraso mental. As abordagens terapêuticas baseiam-se actualmente em estimulantes do sistema nervoso

central (SNC), cuyos mecanismos de funcionamiento y su eficacia no están claramente definidos, a la vez que reducen el limitado tiempo de atención del paciente. Desarrollo. Un estudio piloto con 17 varones con SXF tratados con L-acetilcarnitina (LAC) durante un año demostró una reducción significativa en el comportamiento hiperactivo evaluado con el cuestionario Conners de padres y profesores. El uso de LAC en pacientes con SXF se deriva de la hipótesis que las propiedades bioquímicas y fisiológicas de esta sustancia pueden preservar la actividad cerebral. La LAC es una molécula pequeña hidrosoluble que se difunde fácilmente en el espacio extracelular y entra en cualquier célula del sistema nervioso por medio de un transportador específico. Las diferentes áreas del cerebro utilizan de forma diferente esta molécula para metabolizar la glucosa y lípidos para abastecer de ATP y la síntesis de neurotransmisores. El grupo acetilo presente en la LAC representa un elemento de señalización metabólica de gran importancia, posiblemente mediando su efecto en el SNC. La administración exógena de LAC puede afectar la actividad cerebral en el SXF por: modulación o administración de carburante para la producción de energía, que a nivel mitocondrial se asocia con el papel metabólico de la síntesis de neurotransmisores del ciclo de Krebs; remodelación de la membrana lipídica en función de la determinación activa, por parte de la LAC, de la producción de ácidos grasos polinsaturados, y efecto preferencial en el componente de atención del sistema colinérgico que depende de su peculiar modalidad de comunicación en el SNC. Un estudio explorativo, doblemente ciego, controlado con placebo y multicéntrico, se está llevando a cabo en función de estas premisas. Se incluirá una población total de 160 niños de nueve centros europeos. El objetivo del estudio es determinar el efecto de la LAC en el comportamiento hiperactivo de los niños con SXF de acuerdo con la evaluación del cuestionario Conners de padres y profesores. [REV NEUROL 2001; 33 (Supl 1): S65-70]

**Palabras clave.** Comportamiento hiperactivo. L-acetilcarnitina. Síndrome X frágil.

central (SNC), cujos mecanismos de acção e eficácia não estão esclarecidos, ao passo que reduzem o limitado tempo de atenção do doente. Desenvolvimento. Um estudo piloto com 187 homens com SXF tratados com L-acetilcarnitina (LAC) durante um ano demonstrou uma redução significativa do comportamento hiperactivo, avaliado com o questionário O'Connors de pais e professores. O uso de LAC em doentes com SXF deriva da hipótese que as propriedades bioquímicas e fisiológicas desta substância podem preservar a actividade cerebral. A LAC é uma pequena molécula hidrossolúvel que se difunde facilmente no espaço extra?celular e entra em qualquer célula do sistema nervoso por intermédio de um transportador específico. As diferentes áreas do cérebro utilizam de forma diferente esta molécula para metabolizar glucose e lípidos e para renovar o ATP e a síntese de neurotransmisores. O grupo acetilo presente nos LAC representa um elemento de sinalização metabólica de grande importância, possivelmente mediando o seu efeito no SNC. A administração exógena de LAC pode afectar a actividade cerebral no SXF por: modulação ou administração de carburante para a produção de energia, que a nível mitocondrial se associa ao papel metabólico da síntese de neurotransmisores do ciclo de Krebs; remodelação da membrana lipídica em função da determinação activa, por parte da LAC, da produção de ácidos gordos polinsaturados, e efeito preferencial no componente da atenção do sistema colinérgico, que depende da sua peculiar modalidade de comunicação com o SNC. Actualmente, com base nestas premissas, está a ser conduzido um estudo explorativo, em dupla ocultação e multicêntrico, controlado com placebo. Será incluída uma população total de 160 crianças de nove centros europeus. O objectivo do estudo consiste em determinar o efeito da LAC no comportamento hiperactivo das crianças com SXF de acordo com a avaliação do questionário Conners de pais e professores. [REV NEUROL 2001; 33 (Supl 1): S65-70]

**Palavras chave.** Comportamento hiperactivo. L-acetilcarnitina. Síndrome X-frágil.