

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

DEFICIÊNCIA DA DESIDROGENASE DAS ACILCOA DOS ÁCIDOS  
GRAXOS DE CADEIA MÉDIA NO SUL DO BRASIL: UMA  
ABORDAGEM MOLECULAR

*Cristina Brinkmann Oliveira Netto*

**Orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani**  
**Co-orientadora: Dra. Maria Luiza Pereira**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas-Bioquímica, como requisito parcial para obtenção do título de  
Mestre em Bioquímica**

**Porto Alegre**  
**1997**

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Roberto Giugliani, pela confiança, oportunidade e amizade.

À Dra. Maria Luiza Pereira pela co-orientação, sempre incansável e presente, e acima de tudo pela infinita amizade.

Ao Grupo do Laboratório de Biologia Molecular, em especial à Cris Pedron, à Ursula, ao Tiago, à Liliana e o sempre amigo, Eduardo Lewis, pela colaboração e carinho.

À colega e amiga Cristina Pedron, pela colaboração em vários experimentos e pelas longas conversas de laboratório.

À Ursula Matte e à Nice Arteni pela imensa colaboração na confecção das figuras deste trabalho.

Ao Dr. Salmo Raskin, pelo estímulo e colaboração no início deste trabalho.

A todos os bolsistas, funcionários, professores, contratados e amigos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial à Dra. Maria Teresa Sanseverino, pela amizade sempre presente e a palavra certa nas horas difíceis.

À Clarice Alho, por ter me ensinado as primeiras técnicas utilizadas neste trabalho.

Ao Grupo de Miopatias do Departamento de Biologia da USP, pelo carinho e ensinamentos quando do meu estágio naquele serviço.

Ao Prof. Moacir Wajner, pela amizade e sábias palavras nas horas difíceis.

A todos os professores, alunos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, pelo carinho desde os tempos da iniciação científica.

Ao Dr. Vitor Chamoles, pela gentileza em fornecer os indivíduos controles positivos para este estudo.

Ao Prof. Ivan Izquierdo, por ter me iniciado na vida científica, e ser este grande exemplo para todos que tem o privilégio de conviver com ele.

Aos meus pais, irmãos e demais familiares, pelo apoio, confiança e compreensão sempre presentes.

Ao Alexandre, meu marido, amigo, companheiro, orientador e eterno amor, pelo auxílio na correção, compreensão nos momentos difíceis, orientação nos momentos fundamentais, paciência nos momentos de cansaço, conselhos nos momentos de dúvida, o carinho sempre presente, e por estar comigo nesta caminhada desde os tempos da iniciação científica.

As minhas filhas, Isadora e Alice, que desde antes de nascerem já estavam participando deste trabalho, por serem a luz da minha vida.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>iii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>iv</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>v</b>
<b>RESUMO</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
1.1 - Erros Inatos do metabolismo	02
1.2 - A $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos	05
1.2.1 - Introdução	05
1.2.2 - A rota metabólica da $\beta$ -oxidação mitocondrial dos ácidos graxos	06
1.2.3 - Importância Clínica	12
1.3 - Deficiência da desidrogenase das acil-CoA dos ácidos graxos de cadeia média	13
1.3.1 - Histórico	13
1.3.2 - Manifestações Clínicas	14
1.3.3 - Aspectos Bioquímicos	18
1.3.4 - Diagnóstico	19
1.3.5 - Aspectos Genéticos e Moleculares	21
1.3.6 - Tratamento	28
1.4 - Justificativa	29
1.5 - Objetivos	30
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>31</b>
2.1 - Material	32
2.1.1- População estudada	32
2.1.2- Controles Positivos	32
2.1.3- Coleta e armazenamento das amostras	32
2.1.4- Reagentes Químicos	32
2.1.5- Nucleotídeos	34

2.1.6- Enzimas	34
2.1.7- Marcadores de peso molecular	34
2.1.8- Oligonucleotídeos	34
2.1.9- Equipamentos	35
2.1.10- Soluções	35
2.2 - Métodos	37
2.2.1 - Protocolo laboratorial empregado	37
2.2.2 - Extração de DNA genômico a partir de sangue total fresco	37
2.2.3 - Amplificação do DNA genômico	39
2.2.4 - Purificação do fragmento de amplificação	40
2.2.5 - Digestão com endonuclease de restrição	40
2.2.6 - Fundamentação do protocolo laboratorial empregado	41
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>43</b>
3.1 - Extração de DNA	44
3.2 - Otimização da reação de PCR	44
3.3 - Detecção da mutação K329E	49
<b>4. DISCUSSÃO</b>	<b>51</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>58</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>60</b>
<b>7. ANEXO</b>	<b>70</b>

## **LISTA DE TABELAS**

1.1 - Classificação dos EIM de acordo com a área do metabolismo envolvida	04
1.2 - Mutações no gene da MCAD	25
1.3 - Frequências estimadas da mutação K329E em diferentes estudos realizados	26
2.1 - Relação de reagentes químicos utilizados neste estudo	33
2.2 - Composição das soluções utilizadas nos procedimentos laboratoriais	36

## LISTA DE FIGURAS

1.1 - Papel da carnitina no transporte dos AG de cadeia longa através da membrana mitocondrial	08
1.2 - Rota da $\beta$ -oxidação mitocondrial dos ácidos graxos	09
1.3 - Especificidade das acil-CoA desidrogenases	11
1.4 - Resposta ao jejum em pacientes com Deficiência da MCAD	16
1.5 - Idade de início dos sintomas e mortalidade entre 104 crianças com Deficiência da MCAD em 94 famílias	17
1.6 - Estrutura do gene da MCAD e localização da mutação	23
2.1 - Protocolo laboratorial empregado	38
2.2 - Fundamentação do protocolo	42
3.1 - Amplificação de DNA na condição 1	45
3.2 - Amplificação de DNA na condição 2	47
3.3 - Amplificação de DNA na condição 4	48
3.4 - Digestão do fragmento de DNA amplificado com endonuclease de restrição	50

## ABREVIATURAS

$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
$\omega$	ômega
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
$\mu\text{g}$	micrograma
$\mu\text{g/ml}$	micrograma por mililitro
$\mu\text{l}$	microlitro
$\text{pmol}/\mu$	picomoles por microlitro
AG	ácidos graxos
AGL	ácidos graxos livres
ATP	adenosina trifosfato
BHB	$\beta$ -hidroxibutirato
CC	corpos cetônicos
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CK	ciclo de Krebs
CoA	coenzima A
$\text{CO}_2$	dióxido de carbono
CPT	carnitina palmitoil transferase
del	deleção
dATP	2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	2'-deoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato
dTTP	2'-deoxitimidina 5'-trifosfato
dNTP	desoxinucleotídeos trifosfatos
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EIM	erros inatos do metabolismo
FAB/MS-MS	bombardeamento atômico rápido-espectrometria de massa em seqüência ( <i>fast atom bombardment-mass spectrometry in tandem</i> )
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
$\text{FADH}_2$	flavina adenina dinucleotídeo reduzido
GC-MS	cromatografia gasosa-espetrometria de massa ( <i>gas chromatography-mass spectrometry</i> )
HMGCoA	3-hidróxi 3-metilglutaril-coenzima A
$\text{H}_2\text{O}_2$	peróxido de hidrogênio
kb	quilobase
kDa	quilodalton
LCAD	desidrogenase das acilCoA dos ácidos graxos de cadeia longa ( <i>long chain acil-CoA dehydrogenase</i> )
l	litro
M	molaridade
MCAD	desidrogenase das acilCoA dos ácidos graxos de cadeia média ( <i>medium chain acil-CoA dehydrogenase</i> )
MCT	triglicerídeos de cadeia média ( <i>medium chain triglycerides</i> )

mg	miligrama
mg/ml	miligramas por mililitro
min	minutos
ml	mililitro
mM	milimolar
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato reduzido
ng	nanograma
pb	pares de base
p/v	peso / volume
PCR	reação em cadeia da polimerase ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PM	peso molecular
RE	retículo endoplasmático
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
RFLP	polimorfismo dos tamanhos de fragmento de restrição ( <i>restriction fragment length polymorphism</i> )
SCAD	desidrogenase das acilCoA dos ácidos graxos de cadeia curta ( <i>short chain acyl-CoA dehydrogenase</i> )
SDS	dodecil sulfato de sódio
SIDS	síndrome da morte súbita no recém-nascido ( <i>sudden infant death syndrome</i> )
SNC	sistema nervoso central
TA	temperatura ambiente
TBE	tris/ácido bórico/EDTA
TE	tris-EDTA
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
U/ $\mu$ l	unidades por microlitro
U/ml	unidades por mililitro
v/v	volume/volume
V	volts
VLCFA	ácidos graxos de cadeia muito longa ( <i>very long chain fatty acid</i> )
VLCAD	desidrogenase das acilCoA dos ácidos graxos de cadeia muito longa ( <i>very long chain acyl-CoA dehydrogenase</i> )

## RESUMO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são distúrbios genéticos decorrentes da alteração de uma proteína, geralmente enzimática, trazendo modificações para o metabolismo do indivíduo. Compreendem um grupo grande e heterogêneo de distúrbios que afetam as diversas áreas do metabolismo. Os EIM da  $\beta$ -oxidação mitocondrial dos ácidos graxos (AG) começaram a ser considerados como um grupo dentro dos EIM dos ácidos orgânicos a partir de 1989. Dentro deste grupo, a deficiência da desidrogenase das acilCoA dos ácidos graxos de cadeia média (MCAD), um distúrbio autossômico recessivo, é o mais comum deles. Essa deficiência enzimática se manifesta somente em períodos de estresse do sistema de oxidação dos AG, em geral durante a abstinência alimentar prolongada em conexão com febre. Como nestes períodos os pacientes com deficiência da MCAD não conseguem utilizar os AG como fonte de energia, eles apresentam quadros recorrentes de hipoglicemia e letargia, frequentemente seguidos de coma, podendo mesmo ser letais. Entre os episódios de crise os pacientes permanecem assintomáticos. O gene da MCAD localiza-se no braço curto do cromossomo 1, tendo sido clonado e sequenciado em 1987 por diversos grupos. A alta frequência deste EIM, principalmente entre indivíduos caucasóides do norte Europeu, tem atraído muita atenção nos últimos anos, e o fato de apenas uma mutação (K329E) ser responsável por cerca de 89 % dos alelos tem facilitado seu diagnóstico e mesmo um programa de triagem de neonatal.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia de um protocolo para detecção da mutação K329E no gene da MCAD e estimar a frequência de heterozigotos para esta mutação em nosso meio, inferindo desta maneira a frequência de homozigotos em nossa população.

O estabelecimento do protocolo foi bem sucedido e a detecção por análise genética-molecular da mutação K329E se mostrou perfeitamente viável de ser realizada no nosso meio.

Foram testados 243 indivíduos (486 alelos) e nenhum deles apresentou a mutação K329E, sugerindo que a frequência desta mutação em nosso meio seja inferior a descrita em estudos realizados em outros países, e indicando que o estudo de um número maior de indivíduos é necessária para se inferir a frequência da doença em nossa população.

## ABSTRACT

The inborn errors of metabolism (IEM) is a group of diseases caused by the alteration of a protein, generally an enzyme, bringing modifications to individual metabolism. They consist of a large and heterogeneous group of diseases that affect different aspects of metabolism. The IEM of the mitochondrial oxidation of fatty acids began to be considered as a separate group in the IEM of organic acids only in 1989. In this group, the medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency, an autosomic recessive disturbance, is the most common. The enzymatic deficiency manifests only during stress of the fatty acid oxidation system, generally during fasting associated with fever. In such periods, patients with MCAD deficiency are unable to use fatty acids as an energy source, they show recurrent episodes of hypoglicemia and lethargy, frequently leading to coma and death. In the interval of the episodes the patients are assintomatic. The high frequency of this IEM, mostly in populations of North European Caucasian origin, has attracted considerable attention in recent years, and the fact that one single disease causing mutation (K329E) is responsible for 89 % of the alleles has facilitated both diagnosis and neonatal screening programs.

This work was carried out to evaluate the efficiency of a specific protocol for the detection of the K329E mutation and to estimate the frequency of the hetezygous for the mutation in our region.

The protocol was well established and is feasible to be applicated in our laboratory.

We tested 243 individuals (486 alleles) and no K329E mutation was found, suggesting that a large number of individuals should be tested and that the frequency of the mutation may be lower in our population.

# **1 - INTRODUÇÃO**

## 1.1 - ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) formam um grupo heterogêneo de patologias originadas a partir de uma alteração no material genético, o que determina diminuição ou ausência de uma proteína e o conseqüente prejuízo da função por ela exercida. Essa função pode ser, principalmente, estrutural, enzimática ou de transporte (Cohn & Roth, 1983).

O termo EIM foi usado pela primeira vez por Sir Archibald Garrod, em 1908, a partir de estudos sobre alcaptonúria. Garrod observou que esta doença apresentava uma distribuição familiar e que, freqüentemente, um ou mais indivíduos na mesma família eram afetados, embora outros familiares fossem normais. Outro fato que chamou sua atenção foi a maior incidência de consaguinidade entre os pais destes pacientes. Relacionando com as então redescobertas leis de Mendel, Garrod sugeriu que estes defeitos poderiam ser herdados como condições recessivas (Beaudet *et al*, 1995).

Além de observar pacientes com alcaptonúria, Garrod também estudou outros distúrbios como a cistinúria, o albinismo e a pentosúria, e desenvolveu o conceito de que esses EIM eram devidos à deficiência total ou parcial de uma proteína que catalisa uma determinada reação em uma rota metabólica. Ele observou, por exemplo, que o acúmulo de ácido homogentísico na urina de pacientes com alcaptonúria demonstrava que essa substância era um metabólito normal da degradação da tirosina e que seu acúmulo era devido a uma falha na sua conversão até fumarato e acetoacetato. Gradativamente novas descobertas foram sendo realizadas, tendo sido identificados os processos metabólicos cuja deficiência era responsável pelo acúmulo das substâncias na urina dos pacientes investigados por Garrod.

Em 1945, Beadle e Tatum sugeriram o conceito de que cada gene é responsável pela síntese de uma enzima, o que permitia explicar que os EIM seriam causados por mutações em genes que codificam enzimas. Posteriormente, este conceito foi redefinido e ampliado para poder cobrir outras proteínas além das enzimas, e o princípio “um gene - uma enzima” foi melhor definido como “um gene - uma cadeia polipeptídica”. Assim, alterações genéticas resultam na síntese qualitativa ou quantitativamente anormal de uma proteína, enzimática ou não (Beaudet *et al*, 1995).

Quando a cadeia polipeptídica afetada faz parte de uma enzima, a deficiência total ou parcial da atividade enzimática resulta no bloqueio de uma rota metabólica, o que pode levar a duas conseqüências distintas. Por um lado, ao acúmulo de seu substrato, precursores e derivados anteriores ao bloqueio, que podem ter efeitos tóxicos. Por outro, a falta de substâncias posteriores ao bloqueio que podem ser essenciais ao organismo (Giugliani, 1988).

Foram descritos, até o momento, mais de 300 EIM (McKusick, 1996), a maioria deles envolvendo processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Benson & Fenson, 1985). A frequência conjunta dos EIM é de, aproximadamente, 1 caso para cada 1000 recém-nascidos (Lubs, 1977), em sua maioria herdados de forma autossômica recessiva. A mortalidade, em muitas dessas desordens, é alta e os pacientes afetados podem apresentar um grau variável de retardo físico e/ou mental. Em outras, a instalação do quadro clínico é lenta, levando, em muitos casos, a disfunção neurológica (como retardo mental e convulsões) ou disfunção de outros órgãos. Assim sendo, o estudo destas doenças tem sido de grande importância, pois a elucidação da etiopatogenia de algumas destas patologias tem contribuído para um tratamento mais eficaz. Muitos destes tratamentos têm se baseado em terapêuticas dietéticas e medicamentosas com a finalidade de prevenir e/ou amenizar o quadro clínico. Em alguns casos, o estudo a nível bioquímico-molecular dessas patologias levou à elucidação de rotas metabólicas até então desconhecidas.

Os EIM podem ser classificados de acordo com a área do metabolismo envolvida (tabela 1.1).

Os EIM da  $\beta$ -oxidação mitocondrial começaram a ser considerados como um sub-grupo dentro dos EIM dos ácidos orgânicos em 1989 (Scriver *et al*, 1989). A partir de 1995 (Scriver *et al*, 1995) estas alterações metabólicas já são reconhecidas como um grupo distinto de patologias.

**Tabela 1.1 - Classificação dos EIM de acordo com a área do metabolismo envolvida.**

<b>CLASSIFICAÇÃO</b>	<b>EXEMPLO</b>
EIM dos carboidratos	galactosemia
EIM dos aminoácidos	fenilcetonúria
EIM dos ácidos orgânicos	doença da urina do xarope do bordo
EIM das purinas e pirimidinas	doença de Lesch-Nyhan
EIM dos lipídios e lipoproteínas	hipercolesterolemia familiar
EIM das porfirias e do heme	porfíria
EIM dos metais	hemocromatose
EIM dos peroxissomos	adrenoleucodistrofia
EIM dos lisossomos	doença de Hurler
EIM das vitaminas	deficiência de biotinidase
EIM do sangue e tecidos formadores de sangue	hemofilia
EIM dos sistemas de transportes de membranas	cistinúria
EIM dos mecanismos de defesa e imunológicos	ataxia telangectasia

## 1.2 - A $\beta$ -OXIDAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

### 1.2.1 - Introdução

A energia necessária para o nosso corpo é fornecida por carboidratos, lipídios e proteínas. Em períodos de estresse, como no abstinência alimentar prolongada prolongado, devido a diminuição dos depósitos de carboidratos, os ácidos graxos (AG) passam a ser o principal substrato para produção de energia, sendo sua rota de degradação estimulada, principalmente no fígado, musculatura cardíaca e esquelética (Gregersen *et al*, 1994a; Roe & Cotes, 1995).

Os AG que servem como substrato do catabolismo oxidativo no homem têm duas origens: uma fonte exógena e outra fonte endógena. A dieta se constitui na fonte exógena de obtenção dos mesmos, enquanto que, endogenamente, os AG são produzidos pelos estoques de tecido adiposo ou pela síntese *de novo* (Vianey-Liaud *et al*, 1987).

Knoop, em 1904, fez uma importante contribuição para a elucidação da oxidação dos ácidos graxos, submetendo cães a uma dieta especial e observando os metabólitos eliminados na urina destes animais. Desta forma, ele demonstrou que os AG são degradados pela oxidação do carbono  $\beta$  destes compostos ( $\alpha$  e  $\beta$  referindo-se a posição da hidroxila do carbono anômero, se estiver à direita é  $\alpha$  e se estiver à esquerda é  $\beta$ ), por isto o nome  $\beta$ -oxidação (Angelini *et al*, 1992; Stryer, 1996).

A  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos pode ocorrer tanto na mitocôndria como nos peroxissomos, que são dois tipos de organelas celulares.

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas responsáveis pela respiração celular e pela produção da maioria do ATP (adenosina trifosfato) necessário para as atividades celulares. Elas contêm um grande número de enzimas, que podem variar de acordo com o tipo de célula, refletindo seu papel central em vários aspectos do metabolismo. Na mitocôndria se encontram as enzimas responsáveis pela  $\beta$ -oxidação dos AG (Sabatini & Adesnik, 1995).

Já os peroxissomos são pequenas organelas, descobertas por Duve em 1960, que estão ligadas à membrana. Eles são responsáveis por reações oxidativas que geram peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o qual é posteriormente metabolizado pela catalase. Os peroxissomos também contêm um grande número de enzimas que variam com a espécie e

o tipo de tecido (eles são encontrados basicamente nos hepatócitos e tecido tubular renal). Algumas destas enzimas estão envolvidas na  $\beta$ -oxidação dos AG (Vianey-Liaud *et al*, 1987).

Acredita-se que o sistema de  $\beta$ -oxidação peroxissômica seja responsável pela oxidação dos AG de cadeia muito longa (VLCFA - *very long chain fatty acids*) e que os produtos menores gerados sejam eficientemente degradados na mitocôndria. Enzimas que degradam VLCFA, como o C24:0 e o C26:0, estão presentes nos peroxissomos mas não são encontradas na mitocôndria. Em resumo, os sistemas de  $\beta$ -oxidação mitocondrial e peroxissômica são responsáveis por reações bioquímicas similares mas utilizam diferentes componentes enzimáticos (Sabatini & Adesnik, 1995).

A partir de agora quando nos referirmos à  $\beta$ -oxidação, será sempre a mitocondrial, pois o EIM a que este trabalho se refere ocorre por defeito em enzima desta organela.

### **1.2.2 - A rota metabólica da $\beta$ -oxidação mitocondrial dos AG**

Os AG são transportados no sangue como ácidos graxos livres (AGL), que se refere aos AG em seu estado não esterificado. No plasma, os AGL de cadeia longa encontram-se combinados com albumina e, na célula, eles estão acoplados a proteínas de ligação, ou proteínas Z (Mayes, 1996). Além disso, os AGL também podem circular no sangue sob a forma de triglicerídeos incorporados em lipoproteínas (Wannmacher e Dias, 1986).

Em 1949, Kennedy e Lehninger demonstraram que os AG eram oxidados na mitocôndria (Stryer, 1996). Para entrarem nesta organela os mesmos devem ser ativados a um estado intermediário, passo este que requer consumo de energia. A nível da membrana mitocondrial externa, na presença de ATP e da coenzima A (CoA) ocorre a conversão de AG a ácidos graxos ativos, as acilCoA, pela ação da acilCoA sintetase, a qual também pode ser encontrada no retículo endoplasmático (RE) e na membrana peroxissômica (Angelini *et al*, 1992). Várias acilCoA sintetases já foram descritas, cada uma agindo sobre um substrato específico dependendo do tamanho do AG envolvido.

Uma vez ativados, os AG devem entrar na matriz mitocondrial sob a forma de acilas, para que estas sejam oxidadas. As acilCoA de cadeia longa, as quais apresentam

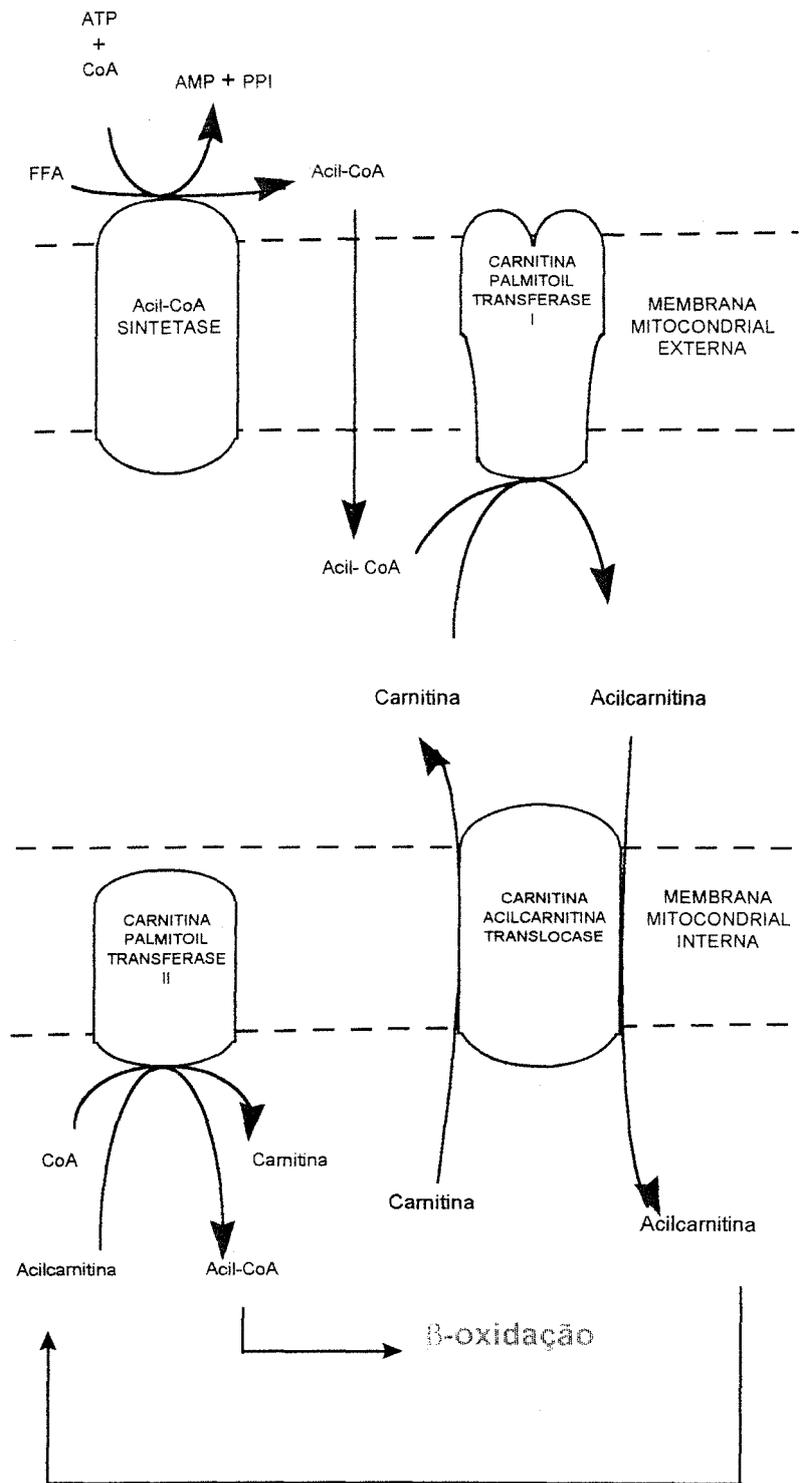
de 16 a 18 carbonos, não atravessam livremente a membrana mitocondrial interna, sendo transferidas com o auxílio da carnitina. Já os AG de cadeia curta (4 a 6 carbonos) e cadeia média (8 a 10 carbonos) não requerem a presença de carnitina para atravessar a membrana.

A carnitina é amplamente distribuída no organismo sendo particularmente abundante no músculo. A enzima carnitina palmitoiltransferase I (CPT I), que está presente na membrana mitocondrial externa, converte as acilCoA de cadeia longa em acilcarnitinas, as quais penetram na membrana mitocondrial para ter acesso ao sistema de  $\beta$ -oxidação. A acilcarnitina é então transportada através da membrana mitocondrial interna por uma translocase, onde o grupamento acila é transferido de volta a CoA no lado interno da membrana. Essa reação é catalisada pela carnitina palmitoiltransferase II (CPT II). Finalmente, a carnitina é devolvida ao lado citossólico pela ação da translocase, em troca de uma acilcarnitina (Angelini *et al*, 1992). A figura 1.1 mostra o papel da carnitina no transporte dos AG de cadeia longa através da membrana mitocondrial.

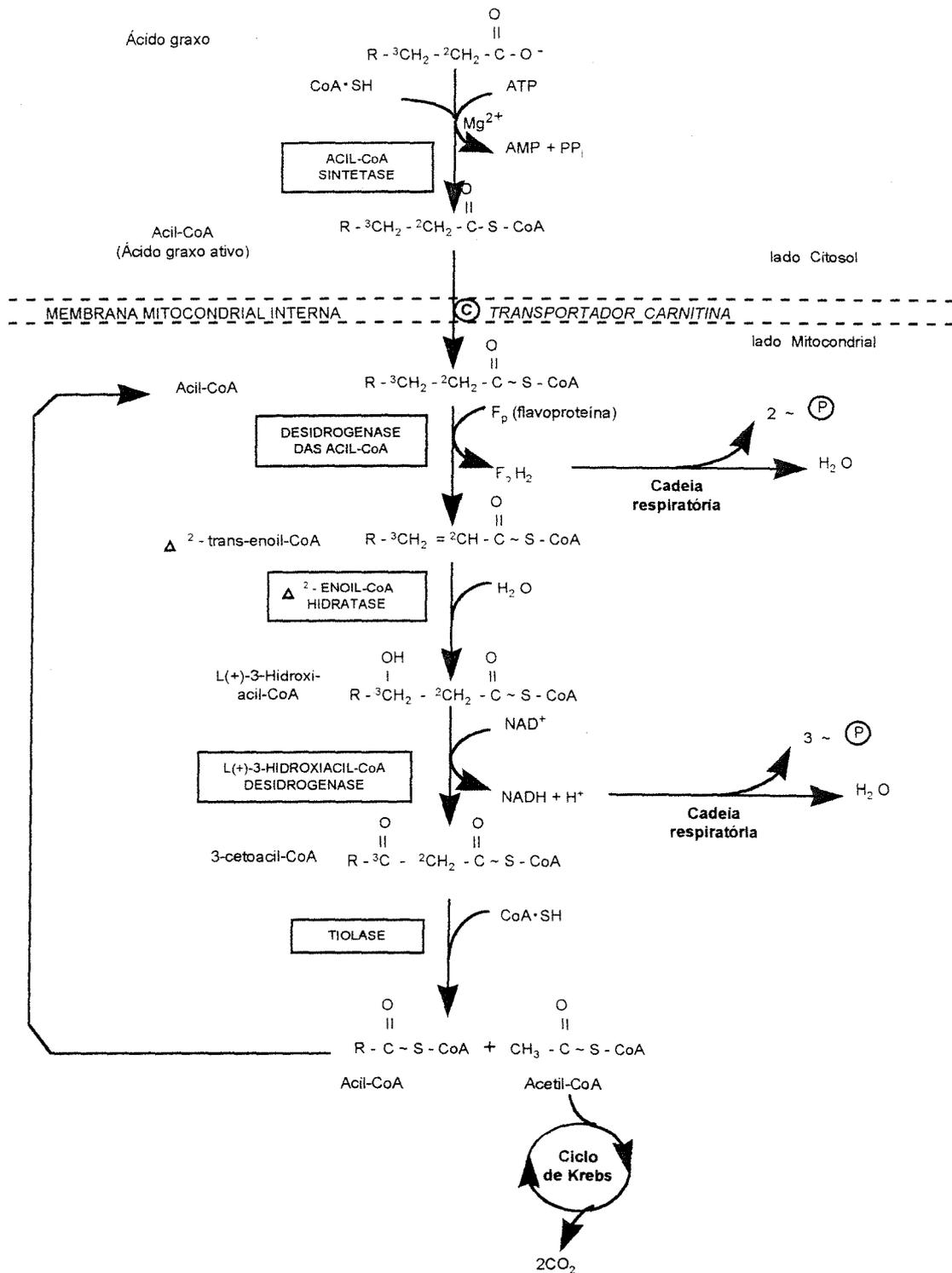
São os ésteres de acilCoA que vão entrar na rota da  $\beta$ -oxidação. Cada acilCoA saturada (que só tem ligações simples) e com número par de carbonos é degradada por uma seqüência de 4 reações, as quais envolvem quatro enzimas e cofatores: 1) oxidação pelo FAD [desidrogenases das acilCoA]; 2) hidratação [2-enoil-CoA hidratase]; 3) oxidação pelo NAD [L-3-hidroxidesidrogenase das acilCoA] e 4) tiólise por CoA [3-cetoacilCoA tiolase]. A cada ciclo, a cadeia de AG é reduzida em dois carbonos, os quais são liberados na forma de acetilCoA, e são produzidos  $FADH_2$  (flavina-adenina dinucleotídeo reduzido) e NADH (nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido) (Vianey-Liaud *et al*, 1987). Os nucleotídeos reduzidos ( $FADH_2$  e NADH) são reoxidados através da cadeia respiratória, sendo utilizados para a produção de ATP.

A figura 1.2 mostra a rota de oxidação mitocondrial dos AG, com os substratos, enzimas e cofatores envolvidos nas reações.

Nos tecidos extra-hepáticos, as acetilCoA são oxidadas no Ciclo de Krebs (CK) com a participação da cadeia respiratória, visando a produção de energia (ATP). No fígado, além deste destino, elas também podem sair da mitocôndria sob a forma de citrato para a biossíntese de colesterol e esteróides. Além destas duas finalidades, as acetilCoA dos AG são utilizadas pelo hepatócito para a biossíntese de corpos cetônicos (cetogênese), nos períodos de abstinência alimentar prolongada. A  $\beta$ -oxidação é a principal fonte de acetilCoA para a cetogênese .



**Figura 1.1 - Papel da carnitina no transporte dos ácidos graxos de cadeia longa através da membrana mitocondrial (adaptado de Mayes, 1996).**



**Figura 1.2 - Rota da *β*-oxidação mitocondrial dos ácidos graxos** (adaptado de Mayes, 1996)

Na cetogênese duas moléculas de acetilCoA se condensam para formar acetoacetilCoA em reação catalisada pela tiolase. A acetoacetilCoA reage então com outra acetilCoA para formar hidroximetilglutaril-coenzima A (HMGCoA), reação mediada pela HMGCoA sintetase. A HMGCoA é clivada, por ação da HMGCoA liase, para formar acetilCoA e acetoacetato. O acetoacetato pode sofrer ação da  $\beta$ -hidroxibutirato desidrogenase para formar  $\beta$ -hidroxibutirato ( $\beta$ HB). O acetoacetato e o  $\beta$ -hidroxibutirato são os principais corpos cetônicos (CC) e são eles que irão fornecer energia nos períodos de abstinência alimentar prolongada.

No abstinência alimentar prolongada, o CK está bloqueado, pois não há aporte de glicose para produção de oxalacetato (iniciador do CK). Desta maneira, as acetilCoA liberadas pela  $\beta$ -oxidação são dirigidas primariamente para a produção de CC, que servirão de fonte de energia para diversos tecidos.

A regulação da oxidação dos AG se dá por ação de hormônios, substratos competidores, cofatores e dieta. Na transição do estado alimentado para o estado de abstinência alimentar prolongada, o fígado converte de captação de glicose e síntese de AG para a produção de glicose, oxidação de AG e cetogênese (Roe & Cotes, 1995).

Os AG com número ímpar de carbonos são raros. Eles são oxidados da mesma maneira que os ácidos graxos com número par de carbonos mas, no último ciclo da rota, são produzidos propionil-CoA e acetilCoA, em vez de duas moléculas de acetilCoA. A propionil-CoA é convertida a succinil-CoA, e entra no CK.

Os AG insaturados (possuem ligações simples e duplas) são oxidados através de várias reações, muitas das quais são iguais a dos AG saturados, mas para sua completa oxidação são necessárias duas enzimas adicionais: uma isomerase e uma epimerase (Wannmacher e Dias, 1986).

Três tipos diferentes de desidrogenase das acilCoA já foram identificadas. A figura 1.3 ilustra suas diferentes especificidades de acordo com o tamanho da cadeia

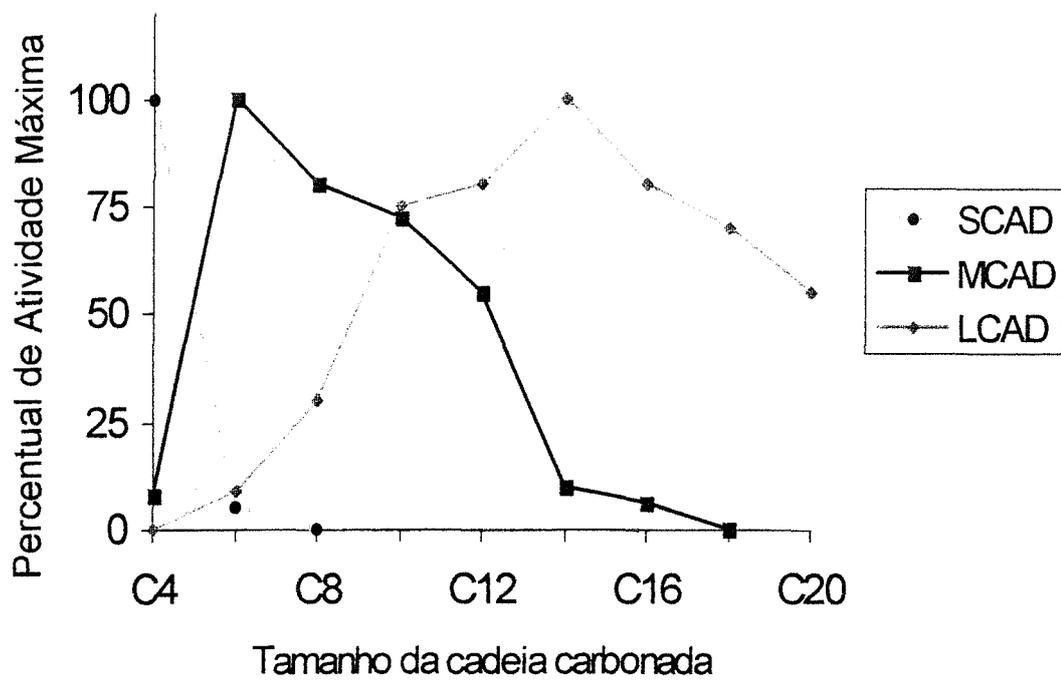


Figura 1.3 - *Especificidade das desidrogenases das acil-CoA. Experimento realizado em ratos* (adaptado de Vianey-Liaud *et al*, 1987).

carbonada e suas atividades sobrepostas. Cada uma das desidrogenases é um tetrâmero com subunidades idênticas, com um peso molecular (PM) variando de 41 a 45 quilodaltons (kDa), que pode apresentar especificidade para cadeia longa (LCAD - *long chain acyl-CoA dehydrogenase*), média (MCAD - *medium chain acyl-CoA dehydrogenase*) ou curta (SCAD - *short chain acyl-CoA dehydrogenase*), dependendo do número de carbonos da acilCoA. A LCAD atua sobre AG que apresentam de 18 a 12 carbonos, a MCAD quando o AG a ser degradado apresenta de 12 a 4 carbonos, e a SCAD atua sobre aquelas que apresentam entre 6 e 4 carbonos (Angelini *et al*, 1992).

### **1.2.3 - Importância Clínica**

A oxidação dos AG é a principal fonte de energia para a síntese de ATP em humanos, portanto a oxidação completa de todos os substratos desta rota é fundamental para o metabolismo normal do indivíduo.

A deficiência de qualquer uma das enzimas nesta rota metabólica ocasiona diferentes distúrbios, com conseqüências clínicas diversas.

A deficiência da desidrogenase das acilCoA dos ácidos graxos de cadeia média (MCAD) tem sido o modelo de investigação dos defeitos de oxidação dos AG, por se tratar do defeito mais freqüente e mais amplamente estudado. O delineamento a nível clínico, metabólico e molecular tem servido de instrumento para a compreensão tanto da oxidação normal como anormal dos AG (Coates, 1994).

A deficiência da MCAD é o tema desta dissertação, e é nele que nos deteremos.

## 1.3 - DEFICIÊNCIA DA MCAD

### 1.3.1 - Histórico

Os principais marcos históricos relacionados com a deficiência da MCAD são os seguintes:

- 1976 Descrição do primeiro paciente com acidúria dicarboxílica (Gregersen *et al*, 1976)
- 1982 Descrição dos primeiros casos de deficiência da MCAD (Kolvraa *et al*, 1982; Rhead *et al*, 1983; Stanley *et al*, 1983).
- 1986 Localização do gene da deficiência da MCAD no cromossomo 1p31 (Matsubara *et al*, 1986).
- 1987 Clonagem e seqüenciamento do cDNA da MCAD (Kelly *et al*, 1987) e caracterização da enzima (Ikeda *et al*, 1987; Matsubara *et al*, 1987).
- 1990 Descrição das bases moleculares da deficiência da MCAD (Kelly *et al*, 1990; Matsubara *et al*, 1990a; Yokota *et al*, 1990a; Gregersen *et al*, 1991)
- 1992 Caracterização e organização do gene (Zhang *et al*, 1992).

A deficiência da MCAD (EC 1.3.99.3 - McKusick 201450), propriamente dita, foi descrita pela primeira vez em 1982 por três grupos diferentes, e o defeito enzimático responsável pela doença foi caracterizado em 1982 por Kolvraa e colaboradores (Andresen, 1993; Vianay-Liaud *et al*, 1987).

Em poucos anos de estudo ficou claro que a deficiência da MCAD era um EIM comum, tendo muitos pacientes ficado sem diagnóstico pelas dificuldades laboratoriais para confirmação diagnóstica e por falta de suspeita clínica (Tanaka *et al*, 1992). Com a introdução da cromatografia gasosa e da espectrometria de massa (GC-MS, *gas chromatography-mass spectrometry*), a partir dos anos 70, foi possível a melhor identificação destas patologias (Roe & Coates, 1995).

Atualmente, com a introdução das técnicas de biologia molecular, em muitos países a deficiência da MCAD já faz parte de programas da triagem neonatal, possibilitando o diagnóstico precoce de famílias em risco (McCabe, 1994).

Hoje, mais de 200 pacientes já foram identificados em todo o mundo, com uma prevalência maior entre brancos de origem Anglo-Saxônica (DiDonato, 1997).

### 1.3.2 - Manifestações Clínicas

Existe muita variação na apresentação clínica de pacientes com deficiência da MCAD, compreendendo desde indivíduos clinicamente assintomáticos até relatos de morte súbita na infância. No entanto, alguns sinais e sintomas podem ser encontrados com frequência, conforme discutiremos abaixo (Heptinstall *et al*, 1995).

A criança com deficiência da MCAD tem história de uma ou mais crises metabólicas, sendo que a primeira ocorre, geralmente entre o 4º e 15º meses de vida, podendo ocorrer ainda no período neonatal (Wilcken *et al*, 1993). Esta crise em geral é associada a um episódio infeccioso seguido de vômito, diarreia e diminuição da ingestão oral. O curso clínico é sempre o mesmo, com distúrbio da consciência, letargia e coma. Na chegada ao hospital, a criança pode estar comatosa, hipoglicêmica e, frequentemente, não há CC na urina ou seus níveis estão muito baixos. Entretanto, alguns autores já relataram presença de quantidades elevadas de CC, mostrando que o diagnóstico não deve ser excluído quando em presença de níveis altos de CC (Patel & Leonard, 1995; Christodoulou *et al*, 1995). A amônia plasmática é normal, assim como as transaminases. A acidose metabólica é moderada e, em geral, compensada. A ausência de cetonúria é altamente sugestiva de um defeito na oxidação dos AG. Esta criança geralmente é assintomática entre as crises, e episódios futuros podem ser prevenidos com aporte calórico adequado (Roe & Coates, 1995; Vianay-Liaud *et al*, 1987). Ao exame clínico, a criança com deficiência da MCAD pode apresentar hepatomegalia e convulsões (Angelini *et al*, 1992). Pacientes adultos já foram descritos com episódios de rabdomiólise, dores musculares, encefalopatia e cardiopatia (Ruitenbeek *et al*, 1995). A figura 1.4 mostra graficamente a resposta de um paciente com deficiência da MCAD em relação aos níveis plasmáticos de AGL, glicose e BHB.

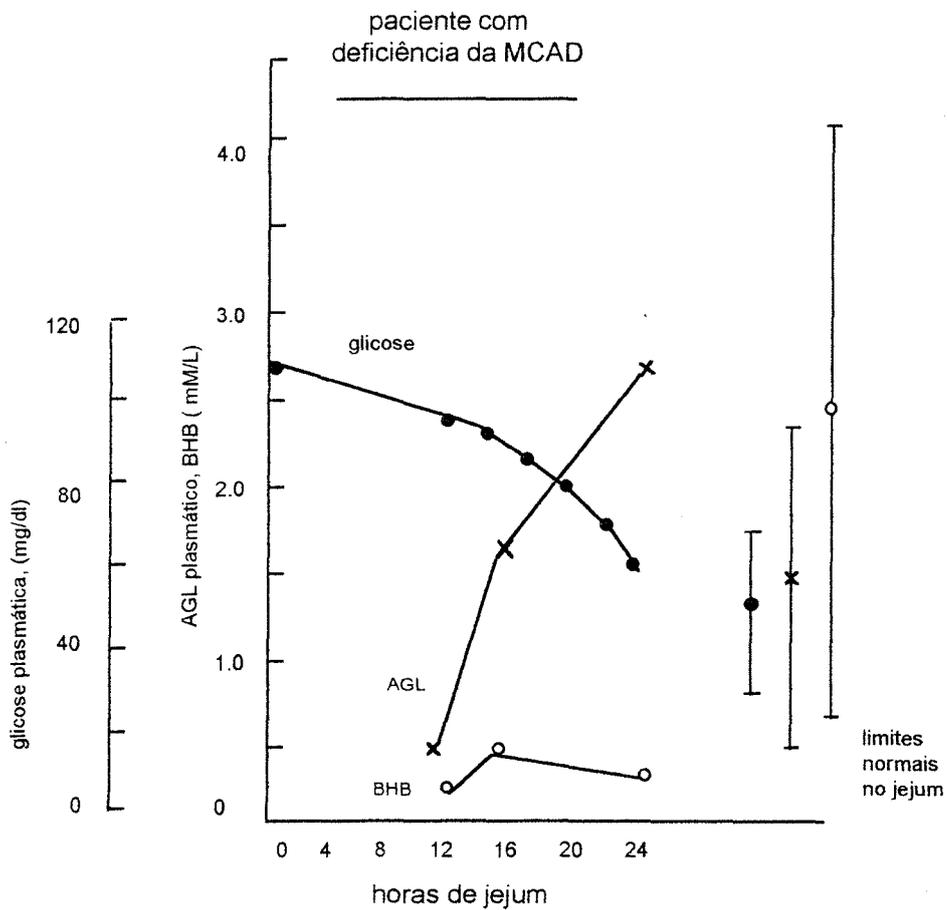
A deficiência da MCAD já foi apontada como uma das responsáveis pela síndrome da morte súbita na infância (SIDS - *sudden infant death syndrome*), bem como confundida com a Síndrome de Reye, pela semelhança dos sintomas. Apesar de vários estudos realizados não conseguirem provar estas associações, ainda se considera prudente investigar estas famílias para a deficiência da MCAD (Howat *et al*, 1985; Emery *et al*, 1988; Ding *et al*, 1991; Dundar *et al*, 1993; Gregersen *et al*, 1994b; Rupar *et al*, 1995).

SIDS é a morte súbita de uma criança (normalmente lactente), em geral durante à noite, que é inesperada dada a história clínica da mesma, onde uma causa para o falecimento pode não ser encontrada mesmo após os achados de necrópsia. Há muitos anos tem se correlacionado SIDS com distúrbios metabólicos, principalmente distúrbios do ciclo da uréia e dos ácidos orgânicos (Bradburn & Shapiro, 1990; RebuAGLt *et al*, 1991; Holton *et al*, 1991)

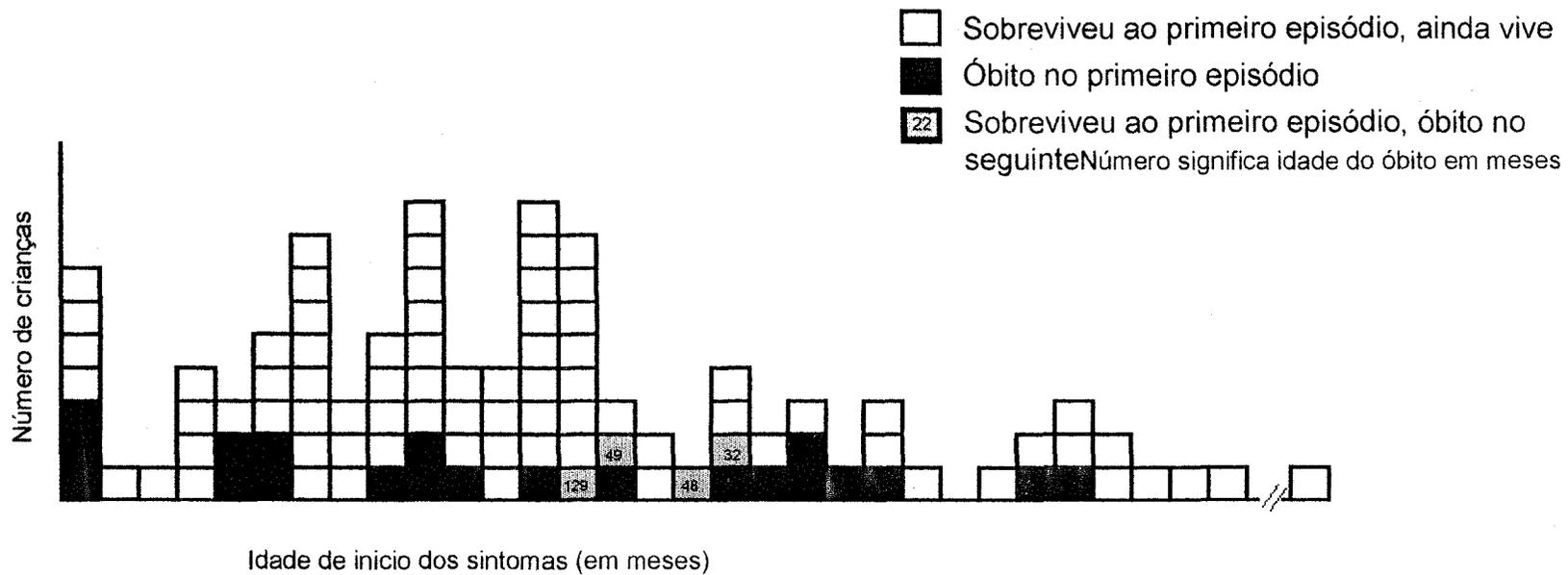
Síndrome de Reye é uma desordem aguda, rara e grave, a qual se desenvolve na infância e se apresenta com episódios de vômito seguido por coma, após uma infecção viral simples. A síndrome de Reye é tida como uma desorganização aguda e aparentemente auto-limitada da mitocôndria hepática, com alterações tanto estruturais como funcionais. A lesão mitocondrial se deve provavelmente à uma interação com o vírus infectante, talvez dependente da bagagem genética do hospedeiro ou de uma modificação por fatores exógenos, como, por exemplo, o salicilato (Mowat, 1983).

A figura 1.5 ilustra claramente que, após estabelecido o diagnóstico da deficiência da MCAD, em geral, não há óbito por esta patologia. A demonstração destes achados tem sido uma justificativa para se inserir a pesquisa da deficiência da MCAD nos programas de triagem neonatal.

O óbito, porém, não é a única consequência nesta patologia. Estes pacientes podem mostrar déficits de desenvolvimento, problemas comportamentais, atraso na fala e linguagem e déficits de atenção. Sintomas crônicos também já foram relatados, como fraqueza muscular proximal, convulsões, paralisia cerebral, retardo do crescimento. A demora em reconhecer



**Figura 1.4 - Resposta ao jejum em pacientes com deficiência da MCAD.** A figura mostra os níveis plasmáticos de glicose, AGL e B-hidroxiacetato (BHB) em um paciente e a média e a sua variação em crianças normais sob jejum de 24 horas. O paciente começa a apresentar sintomas como letargia, náusea e vômito com 14-16 horas de jejum. (adaptado de Stanley *et al*, 1990).



**Figura 1.5 - Idade de início dos sintomas e mortalidade entre 104 crianças com Deficiência da MCAD em 94 famílias. Cada quadrado representa um paciente. (adaptado de Roe & Cotes, 1995).**

a doença e iniciar o tratamento adequado parece colocar estes pacientes em risco para deficiências a longo prazo (Roe & Cotes, 1995). Estima-se que cerca de 80% dos casos de deficiência da MCAD permanecem sem diagnóstico (Gregersen *et al*, 1994a; Kirk *et al*, 1996).

### 1.3.3 - Aspectos Bioquímicos

Uma das principais conseqüências da deficiência da MCAD é a incapacidade de oxidar AG em quantidade suficiente para suprir a demanda de energia sob condições de abstinência alimentar prolongada e/ou estresse.

Com o aumento dos AGL durante o abstinência alimentar prolongada, não há um aumento nas cetonas plasmáticas, como era de se esperar. A hipoglicemia se desenvolve provavelmente como resultado da exaustão da produção de glicose, pois os AG e as cetonas não estão disponíveis para substituir a glicose como fonte de energia.

A outra conseqüência é o acúmulo de intermediários de acilCoA de cadeia média (C8-C12) dentro da mitocôndria, às custas da acetilCoA. As CoA livres, que são trocadas entre mitocôndria e citosol, também estão comprometidas. Assim, um aumento na produção de acilCoA leva a uma diminuição dos níveis de CoA para outras reações mitocondriais. A relação acilCoA/CoA na mitocôndria exerce um controle regulador sobre a piruvato desidrogenase e  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase (enzimas do CK). Quando esta relação está aumentada, ambas as enzimas estão diminuídas, resultando na diminuição da conversão de piruvato a acetilCoA e reduzindo o fluxo destes substratos para o CK, pois a síntese de citrato e fluxo do  $\alpha$ -cetoglutarato para succinil-CoA está impedido. A succinil-CoA ligase também está inibida pelo octanoato, assim como por outros intermediários da acilCoA. Quando estes intermediários acumulam, a  $\beta$ -oxidação é inibida, e o resultado esperado é a incorporação de AG em triglicerídeos, demonstrado pelo acúmulo de gordura encontrado no fígado destes pacientes (Roe & Cotes, 1995).

A produção inadequada de acetilCoA tem efeitos secundários significantes no CK, na regulação da oxidação dos AG na mitocôndria e na eficiência da gliconeogênese. AcetilCoA, junto com oxalacetato, é um substrato para reação de síntese de citrato. A inibição da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase por uma elevada relação acilCoA/CoA, reduz o fluxo no CK e diminui a síntese de oxalacetato. Além disso, como o

citrato serve para transportar acetilCoA para o citosol, níveis baixos deste substrato influenciam a regulação da oxidação dos AG e a gliconeogênese. Quando há um aporte adequado de citrato, ele é transportado para o citosol e convertido pela citrato liase em acetilCoA e oxalacetato. A acetilCoA é um substrato para acetilCoA carboxilase e para a síntese de malonilCoA, o principal regulador da CPT I; e o oxalacetato é convertido em malato ou fosfoenolpiruvato e, posteriormente, a glicose (Mayes, 1996).

O citrato não é só a fonte de substrato para a acetilCoA carboxilase, mas também seu principal ativador. A diminuição na acetilCoA mitocondrial limita a quantidade de citrato citoplasmático disponível tanto para ativar como para prover substrato para acetilCoA carboxilase.

Níveis diminuídos de malonilCoA permitem a entrada aleatória de AG na mitocôndria e, na deficiência da MCAD, causa um aumento ainda maior dos intermediários de acilCoA de cadeia média.

Quantidades inadequadas de acetilCoA também afetam a piruvato carboxilase. A acetilCoA é o principal ativador desta enzima, que converte piruvato em oxalacetato e é essencial para a gliconeogênese. A propionil-CoA também ativa a piruvato carboxilase, mas compostos longos, como octanoilCoA, não. O oxalacetato é convertido em malato, levado para o citosol onde é revertido a oxalacetato. Este por sua vez, é sustrato para a fosfoenolpiruvato carboxiquinase, produzindo fosfoenolpiruvato e, posteriormente, glicose. Um comprometimento nesta etapa leva à hipoglicemia (Roe & Cotes, 1995).

Como podemos ver, o déficit de acetilCoA interfere em várias rotas metabólicas, devido a sua grande importância em nosso metabolismo.

#### **1.3.4 - Diagnóstico**

O diagnóstico da deficiência da MCAD pode ser estabelecido a partir dos principais achados laboratoriais em pacientes, os quais estão descritos a seguir.

1) hipoglicemia - normalmente a hipoglicemia está presente, mas níveis séricos normais ou levemente alterados de glicose já foram observados em pacientes sintomáticos, demonstrando que as manifestações do SNC (sistema nervoso central) não

ocorrem somente devido à hipoglicemia apresentada pelo paciente. Assim, o diagnóstico da MCAD não deve ser excluído baseado apenas na ausência de hipoglicemia.

2) níveis de amônia - em geral os níveis de amônia sérica estão apenas levemente aumentados, embora níveis muito altos já tenham sido observados.

3) níveis das transaminases - da mesma maneira que a amônia, os níveis séricos das transaminases também podem estar levemente elevados.

4) perfil dos ácidos orgânicos - metabólitos anormais podem ser detectados no plasma, urina ou sangue coletado em papel filtro dos pacientes com deficiência da MCAD. Eles são determinados pela especificidade da enzima ao substrato, sendo que todos os metabólitos presentes são AG de cadeia média (C6-C12). Os principais compostos aumentados durante períodos de estresse e lipólise incluem os seguintes tioésteres de CoA: hexanoila (C6:0), octanoila (C8:0), decanoila (C10:0), 4-cis-decanoila (C10:1) e dodecanoila (C12:0). Estes metabólitos podem ser detectados por GC-MS, e o padrão de metabólitos reflete o papel das rotas alternativas, como a oxidação  $\omega$ . A oxidação  $\omega$  é um processo catalisado por enzimas do RE, que envolve hidroxilação dos átomos  $C_{\omega}$  dos AG pela citocromo  $P_{450}$ , a mono-oxigenase que utiliza NADPH e  $O_2$ . O grupo OH é oxidado a um grupo carboxil, convertido a um derivado de CoA em cada final e oxidado pela via da  $\beta$ -oxidação (Voet & Voet, 1995). A  $\beta$ -oxidação peroxissômica também contribui como rota alternativa, levando a produção de ácidos dicarboxílicos, como os ácidos adípico (C6:0), subérico (C8:0), deidrosubérico (C8:1), sebácico (C10:0), deidrosebácico (C10:1), dodecanodioico (C12:0). É importante enfatizar que o achado isolado de excreção de ácidos dicarboxílicos não é suficiente para o diagnóstico de deficiência da MCAD. Eles também são observados em outras situações, entre elas outras desordens da  $\beta$ -oxidação, em cetoacidose diabética e após a administração de triglicerídeos de cadeia média (MCT - *medium chain triglycerides*), em pacientes em terapia com Valproato (Divry *et al*, 1983; Rabier *et al*, 1995). Os ácidos orgânicos mais específicos em casos de deficiência da MCAD incluem conjugados da glicina, hexanoilglicina e suberiglicina, os quais estão elevados durante períodos de crise e são detectados pela análise de amostra colhida durante estes episódios por GC-MS (Morton & Kelley, 1990).

5) perfil das acilcarnitinas - as acilcarnitinas são detectadas no sangue (tanto plasma como papel filtro) e urina, através de bombardeamento atômico rápido-

espectrometria massa em seqüência (FAB-MS/MS - *fast atom bombardment-mass spectrometry in tandem*). Incluem C6:0, 4-cis e 5-cis-C8:0 e 4-cis-C10:1 acilcarnitinas. Elas podem ser quantificadas, mas o perfil plasmático é tão específico que não é necessário. Ao contrário do perfil de ácidos orgânicos urinários, o perfil das acilcarnitinas é diagnóstico tanto nos períodos de crise como quando o paciente está assintomático, e pode ser analisado em uma gota de sangue do mesmo cartão coletado para triagem neonatal (Millington *et al*, 1990).

6) diagnóstico enzimático - o defeito enzimático específico já foi demonstrado em fibroblastos, leucócitos mononucleares periféricos, fígado, coração, musculatura esquelética e amniócitos. Vários métodos já foram utilizados para medir a atividade da MCAD e outras desidrogenases de acilCoA. Na maioria dos ensaios, a atividade da MCAD, usando octanoil-CoA como substrato, em geral é menor que 10% do nível dos controles. Entretanto, já foram observados pacientes com atividade enzimática ao redor de 50% e, até mesmo, pacientes com atividade normal (Heptinstall *et al*, 1995). Não houve nenhuma relação entre a atividade residual e a gravidade dos sintomas, nem mesmo relação com genótipo, após análise molecular. As células dos pais dos pacientes geralmente apresentam um nível intermediário de atividade enzimática, variando de 35 a 67% dos níveis enzimáticos em amostras controles, o que é consistente com uma herança autossômica recessiva.

### 1.3.5 - Aspectos Genéticos e Moleculares

A deficiência da MCAD é um distúrbio transmitido de forma autossômica recessiva e sua penetrância não foi definida (Gregersen *et al*, 1993).

MCAD é uma flavoproteína da matriz mitocondrial, sendo que a enzima ativa “madura” é constituída por 4 subunidades idênticas, cada uma carregando uma molécula de FAD. MCAD é sintetizada no ribossomo citoplasmático como um PM aproximado de 45 kDa, e é transportada para o interior da matriz mitocondrial, onde a seqüência líder é clivada proteoliticamente para produzir o monômero maduro da MCAD (PM aproximado de 43 kDa) (Zhang *et al*, 1992).

O gene da MCAD foi localizado no braço curto do cromossomo 1, na região p31 por “Southern analysis” de células híbridas e por hibridização *in situ* (Matsubara *et al*,

1986). O locus mostrou-se altamente polimórfico, como foi demonstrado por análise de polimorfismo dos tamanhos de fragmento de restrição (RFLP-*restriction fragment length polymorphism*) (Kidd *et al*, 1990).

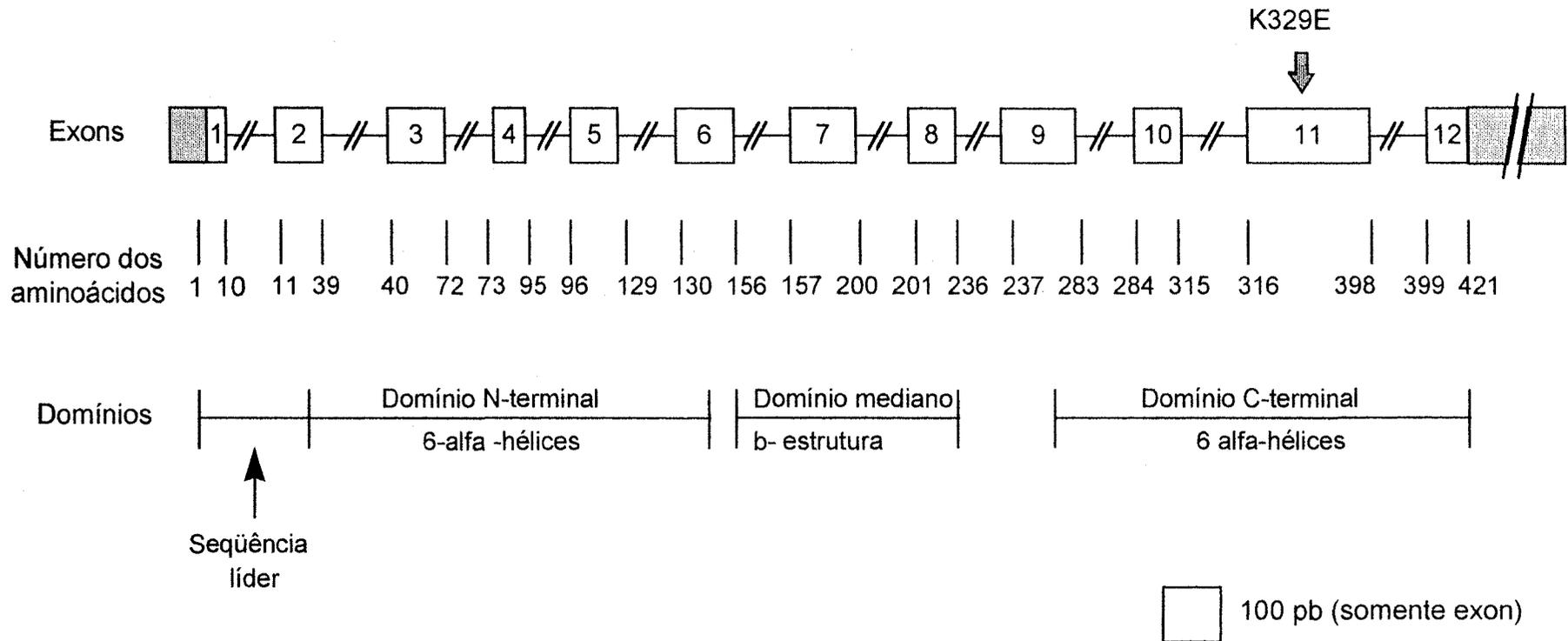
O RNA mensageiro (mRNA) da MCAD é expresso em diversos tecidos, embora o nível de expressão possa variar drasticamente de acordo com o tecido analisado, com os níveis mais altos presente nos tecidos com maior capacidade de oxidação dos AG (coração, glândula adrenal e musculatura esquelética) (Kelly *et al*, 1989). O nível de mRNA também depende do alelo mutante presente (Andresen *et al*, 1994a).

O DNA complementar (cDNA) que codifica para a MCAD foi isolado tanto de fígado de ratos e de humanos, mostrando-se altamente homólogo entre as duas espécies (Kelly *et al*, 1987; Matsubara *et al*, 1989). O cDNA possui 1263 pares de base (pb), que codificam 421 aminoácidos precursores (Kim & Wu, 1988; Matsubara *et al*, 1989).

O gene da MCAD se expande por 44 quilobases (kb) de DNA genômico, dividido em 12 exons, os quais variam de tamanho entre 70 e 140 pb (exons 1 a 10), ou 249 pb e 807 pb (exons 11 e 12, respectivamente), como ilustra a figura 1.6. As seqüências interventoras (íntrons) são longas, variando de 71pb a mais de 10,5 kb (Zhang *et al*, 1992).

Os primeiros estudos de imunoprecipitação realizados em cultura de fibroblastos de pacientes com deficiência da MCAD mostraram que o PM da proteína mutante era indistinguível do PM da enzima normal, sugerindo uma mutação de ponto no locus da MCAD (Matsubara *et al*, 1992). Estudos posteriores mostraram que MCAD imunorreativa não foi identificada nestas culturas por “western-blot”, que é capaz de detectar proteína em “steady-state level” (Yokota *et al*, 1990a). Esta observação sugeriu que a proteína mutante fosse instável e inábil de formar corretamente os tetrâmeros (Jensen *et al*, 1992), indicando que a mutação deveria interferir no sítio ativo da enzima (Bross *et al*, 1990).

Uma mutação de ponto responsável pela maior parte dos casos de deficiência da MCAD foi identificada por 4 grupos distintos após a clonagem do gene (Kelly *et al*, 1990; Matsubara *et al*, 1990b; Yokota *et al*, 1990b; Gregersen *et al*, 1991). Esta mutação foi localizada no exon 11, e caracterizada por uma transição de adenina para



**Figura 1.6 - Estrutura do gene da MCAD e localização da mutação. Os exons estão numerados de 1 a 12 e representados por quadrados (adaptado de Tanaka *et al.*, 1992)**

guanina, que resulta na substituição de lisina (K) por ácido glutâmico (E) na posição 329 (ou 304 na subunidade madura) da proteína (Matsubara *et al*, 1990a; Kelly *et al*, 1990; Matsubara *et al*, 1990b; Yokota *et al*, 1990a; Yokota *et al*, 1990b; Ding *et al*, 1990). O resíduo de lisina na posição 329 é altamente conservado através das espécies (Matsubara *et al*, 1990a), e está localizado na região da hélix-H da enzima, que participa do contato das intersubunidades. A substituição da lisina (um resíduo básico) por ácido glutâmico (um resíduo ácido), afeta a carga desta região e assim interfere com a formação normal do homotetrâmero. A proteína mutante, quando expressa em bactérias, provou ser instável e cataliticamente inativa (Kelly *et al*, 1990; Yokota *et al*, 1990a; Yokota *et al*, 1990b; Matsubara *et al*, 1992).

Quando a mutação K329E foi identificada em 1991, estimava-se que ela estaria presente em cerca de 90% dos pacientes com deficiência da MCAD e os outros 10% seriam mutações de ponto muito raras (Gregersen *et al*, 1991; Gregersen *et al*, 1993). Realmente, hoje já se sabe que a K329E é responsável por cerca de 89% dos alelos, sendo que 80% são homozigotos para esta mutação, e 18.2% são heterozigotos compostos (K329E/outra mutação) e 1.8% são heterozigotos compostos para outras mutações (Yokota *et al*, 1991; Lecoq *et al*, 1996). Até o momento, pelo menos outras 15 mutações já foram descritas (Roe & Coates, 1995), e elas encontram-se listadas na tabela 1.2. Não parece existir uma correlação genótipo-fenótipo óbvia (Kelly *et al*, 1990; Matsubara *et al*, 1990a; Yokota *et al*, 1990b; Gregersen *et al*, 1991; Andresen *et al*, 1997).

A distribuição étnica da mutação K329E é intrigante, sendo que a maioria dos pacientes descritos são de origem caucasóide (Coates *et al*, 1994), particularmente do Noroeste Europeu. Além destes, já foram relatados um paciente paquistanês, um americano negro e, casos isolados originários do sul da Europa e norte da África. Nenhum paciente foi identificado em estudos realizados no extremo oriente e nenhum heterozigoto foi achado num estudo realizado no Japão (Matsubara *et al*, 1991; Roe & Coates, 1995). Estes achados favorecem a hipótese do efeito fundador, onde a mutação K329E seria mais freqüente em populações caucasóides originárias do Noroeste Europeu, basicamente da Holanda, Irlanda, Inglaterra, Bélgica e Dinamarca (Gregersen *et al*, 1993).

Várias estimativas de freqüência de homozigotos já foram feitas, variando de 1/8930 a 1/25000 (Roe & Coates, 1995; Heptinstall *et al*, 1995; Ziadeh *et al*, 1995). A tabela 1.3 mostra as diferentes freqüências nas diferentes populações estudadas. A

**Tabela 1.2 - Mutações no gene da MCAD.**

Nome *	troca de nucleotídeo	exon	efeito na cadeia polipeptídica	referência
R53C	C→T na posição 157	3	Arg→Cys na posição 53 da proteína	Gregersen <i>et al</i> , 1992
ΔG91/ΔC92	deleção de 6 pb a partir da posição 343	5	proteína instável	Ziadeh <i>et al</i> , 1995
M149I	G→A na posição 447	6	Met →Ile na posição 149 da proteína	Yokota <i>et al</i> , 1991
G195R <sup>#</sup>	G→A na posição 583	8	Gly →Arg na posição 195 da proteína madura	Brackett <i>et al</i> , 1994
C244R	T→C na posição 730	9	Cys→Arg na posição 244 da proteína	Yokota <i>et al</i> , 1991
G267R	G→A na posição 799	10	Gly→Arg na posição 267 da proteína	Yokota <i>et al</i> , 1991
K329E	A→G na posição 985	11	Lis→Glu na posição 329 da proteína	Matsubara <i>et al</i> , 1990a
I375T	T→C na posição 1124	11	Ile→Thr na posição 357 da proteína	Yokota <i>et al</i> , 1991
1100 del 4	deleção de 4 pb na posição 1100	11	término prematuro da proteína na posição 385	Ding <i>et al</i> , 1991
999ins13	inserção de 13 pb na posição 1012	11	término prematuro da proteína na posição 337	Gregersen <i>et al</i> , 1992
M301T <sup>#</sup>	T→C na posição 977	11	Met→Thr na posição 301 da proteína madura	Andresen <i>et al</i> , 1994b
S311R <sup>#</sup>	T→A na posição 1008	11	Ser→Arg na posição 311 da proteína madura	Andresen <i>et al</i> , 1994b
R324X <sup>#</sup>	C→T na posição 1025	11	código de parada	Andresen <i>et al</i> , 1994b
E359X <sup>#</sup>	G→T na posição 1150	11	código de parada	Andresen <i>et al</i> , 1994b
V412V <sup>#</sup>	A→T na posição 1161	11	sem alteração	Andresen <i>et al</i> , 1994b
L307L <sup>#</sup>	C→T na posição 994	11	sem alteração	Andresen <i>et al</i> , 1994b

# nomenclatura levando em conta a proteína na forma madura

\* demais nomenclaturas segundo regras sugerida por Beadet & Tsui, 1993.

**Tabela 1.3 - Frequências estimadas da mutação K329E em diferentes estudos realizado.**

<b>local do estudo</b>	<b>frequência estimada de heterozigotos</b>	<b>número de indivíduos testados</b>	<b>referência</b>
Australia (Melbourne)	1/71	353	Matsubara <i>et al</i> , 1991
Dinamarca (Copenhagen)	1/101	910	Gregersen <i>et al</i> , 1993
Escócia (West)	1/276	552	Dundar <i>et al</i> , 1993
França (Caen)	1/118	2000	LeCoq <i>et al</i> , 1996
França (Lyon)	1/532	1064	Vianey-Saban <i>et al</i> , 1994
Itália (Piedmont)	1/333	1000	Gregersen <i>et al</i> , 1993
Japão (Sendai)	0	500	Matsubara <i>et al</i> , 1991
Rússia (St. Petersburg)	1/83	413	Levin <i>et al</i> , 1992
UK (Trent)	1/83	5157	Seddon <i>et al</i> , 1994
UK (Sheffield)	1/68	410	Blakemore <i>et al</i> , 1991
UK (Birmingham)	1/40	479	Matsubara <i>et al</i> , 1991
UK (West Midlands)	1/52	5014	Seddon <i>et al</i> , 1994
USA (Houston)	1/107	536	Matsubara <i>et al</i> , 1991

marcada heterogeneidade fenotípica observada mesmo entre pacientes da mesma família sugere que a variação dos sintomas clínicos na deficiência da MCAD não seja somente um reflexo da heterogeneidade genética (Duran & Wadman, 1987). A triagem para a mutação K329E em pacientes com diferentes apresentações clínicas revela que, de fato, a mutação não está associada com um fenótipo específico. Estas observações indicam que, a heterogeneidade clínica da deficiência da MCAD não é causada inteiramente pela heterogeneidade genética, mas possivelmente influenciada por outros fatores (Matsubara *et al*, 1992). Foi sugerido que a variação individual de rotas alternativas para detoxificação dos intermediários dos AG que se acumulam na deficiência da MCAD, possa determinar a heterogeneidade vista na apresentação clínica (Roe & Cotes, 1995), bem como as diferenças na taxa de lipólise e  $\beta$ -oxidação nas diferentes idades (Heales *et al*, 1994). Adicionalmente, o desenvolvimento dos sintomas deve ser influenciado pelo nível de estresse metabólico e pela combinação com outros fatores estressores, como infecção sobreposta ao abstinência alimentar prolongada (Matsubara *et al*, 1992).

Vários métodos para detecção da mutação K329E já foram descritos (Matsubara *et al*, 1990a; Gregersen *et al*, 1991; Yokota *et al*, 1991). Em 1992, Kelly descreveu a metodologia para estudos pós-morte, e em 1994, Ioloscon descreveu um método onde se poderia detectar 3 mutações simultaneamente (Kelly *et al*, 1992; Ioloscon *et al*, 1994).

Atualmente a deficiência da MCAD já faz parte da triagem neonatal em diversos países, isto porque ela preenche os seguintes critérios necessários:

- 1) é uma desordem que pode resultar numa condição clínica séria e fatal;
- 2) pacientes são assintomáticos ao nascimento e permanecem sadios até o primeiro episódio;
- 3) os sintomas da doença podem ser prevenidos com um simples manejo dietético e com suplementação com carnitina.

No Brasil, o teste para detecção da mutação K329E no gene da MCAD foi introduzido recentemente como parte dos exames realizados na triagem neonatal (teste do pezinho) oferecida pelo Centro de Triagem Neonatal, em Porto Alegre.

### 1.3.6 - Tratamento

O tratamento de casos com deficiência da MCAD visa a evitar o abstinência alimentar prolongada, prover adequado aporte calórico, e suporte agressivo durante episódios de infecção. A anorexia que geralmente acompanha as infecções e a febre, predispõe à mobilização dos depósitos de lipídios endógenos, produzindo intermediários tóxicos que podem levar a vômitos, letargia, coma e mesmo à morte. Embora algumas crianças suportem bem o abstinência alimentar prolongada na ausência de infecção, elas não o fazem durante um episódio infeccioso. O risco de morte e a frequência de outras seqüelas, não deixa dúvidas da importância do diagnóstico precoce e da introdução do tratamento adequado (Roe & Cotes, 1995).

A suplementação com L-carnitina tem sido largamente utilizada no tratamento de pacientes com deficiência da MCAD, bem como naqueles com deficiência primária ou secundária de carnitina (ex: deficiência primária de carnitina miopática e insuficiência renal crônica, respectivamente). Seu uso representa um coadjuvante na eliminação dos intermediários tóxicos que se acumulam, promovendo a remoção dos ácidos orgânicos das células e do sangue, uma vez que as acilcarnitinas são transportadas para fora da mitocôndria e para a circulação, mas não podem ser reabsorvidas pelos tubulos renais. Aparentemente não há efeitos tóxicos, exceto ocasionais períodos de fezes líquidas e a complicação social do odor característico de peixe nas crianças que recebem esta suplementação, a qual se deve a degradação bacteriana da carnitina no trato gastro intestinal. A dose tolerada fica em torno de 50 a 100mg/Kg (Marcus & Coulston, 1996).

A maioria dos investigadores observa que os pacientes em tratamento com L-carnitina suportam melhor o catabolismo imposto pelas infecções recorrentes ou mesmo cirurgias (Nyhan, 1991).

#### **1.4 - JUSTIFICATIVA**

A implantação de um protocolo laboratorial com técnicas de biologia molecular para a detecção da principal mutação associada à deficiência da MCAD se justifica pelas seguintes razões:

- 1- A deficiência da MCAD não apresenta quadro clínico característico que conduza ao diagnóstico, pode ter consequências graves e seu quadro clínico pode ser prevenido, desde que identificado precocemente;
- 2- Os métodos bioquímicos para a sua detecção são trabalhosos e/ou envolvem equipamentos de altíssimo custo;
- 3- Ao contrário da maior parte das doenças genéticas, a grande maioria dos estudos já realizados indica que cerca de 90 % se devem a uma única mutação, o que facilita a abordagem molecular do problema;
- 4- A deficiência da MCAD tem sido descrita com elevada frequência relativa em algumas populações caucasóides, que constituem cerca de 87 % da população do Rio Grande do Sul.

## **1.5 - OBJETIVOS**

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- 1 - Avaliar a eficácia de um protocolo para detecção da mutação K329E no gene da MCAD baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR);
- 2 - Estimar a frequência de heterozigotos para a mutação K329E no gene da MCAD em nosso meio e inferir, a partir destes dados, a frequência de homozigotos em nossa população.

## **2 - MATERIAL E MÉTODOS**

## **2.1 - MATERIAL**

### **2.1.1 - População estudada**

A população analisada no presente estudo foi composta por 243 indivíduos adultos que compareceram ao setor de coleta do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para a realização de exames laboratoriais de rotina, no período de agosto de 1994 a março de 1995.

Os indivíduos apresentavam várias origens étnicas, sendo 46% do sexo masculino e 54% do sexo feminino. A distribuição etária dos indivíduos variou de 7 a 88 anos.

Todos os indivíduos foram informados, de forma clara e detalhada, sobre o estudo e concordaram em participar do mesmo voluntariamente, assinando termo de consentimento pós-informação (anexo).

### **2.1.2 - Controles Positivos**

Amostras de DNA genômico de pacientes e heterozigotos para a deficiência de MCAD foram utilizadas como controles positivos para avaliação dos testes moleculares utilizados no presente estudo. Estes pacientes e heterozigotos foram diagnosticados e previamente estudados no laboratório do Dr. Nestor Chamoles (Buenos Aires - Argentina) e do Dr. Brage Andersen (Aarhus - Dinamarca).

### **2.1.3- Coleta e armazenamento das amostras**

O sangue para extração de DNA foi coletado por punção venosa na região cubital. Foram coletados 10 ml de sangue em 2 tubos de ensaio estéreis contendo EDTA (tipo vacutainer). O material foi devidamente identificado, sendo numerado de 1 a 243 segundo ordem de entrada, e armazenado a 4°C para posterior extração de DNA, a qual foi realizada no mesmo dia da coleta.

### **2.1.4 - Reagentes Químicos**

A tabela 2.1 mostra a relação de reagentes utilizados no preparo de soluções e a procedência dos mesmos.

**Tabela 2.1 - Relação de reagentes químicos utilizados neste estudo**

<b>SUBSTÂNCIA</b>	<b>PROCEDÊNCIA</b>
acetato de sódio ( $C_2H_3O_2Na$ )	Sigma
ácido bórico ( $H_3BO_3$ )	Sigma
agarose	Sigma
azul de bromofenol ( $C_{19}H_9Br_4O_5Na$ )	Sigma
bicarbonato de potássio ( $KHCO_3$ )	Merck
brometo de etídio ( $C_{21}H_{20}N_3Br$ )	Sigma
cloreto de amônia ( $NH_4Cl$ )	Merck
cloreto de sódio ( $NaCl$ )	Merck
ácido clorídrico ( $HCl$ )	Merck
dodecilsulfato de sódio (SDS)	Sigma
ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)	Sigma
etanol absoluto	Merck
espermidina ( $C_7H_{19}N_3$ )	Sigma
ficol	Pharmacia
hidróxido de sódio ( $NaOH$ )	Sigma
proteínase K	Sigma
persulfato de amônia ( $(NH_4)_2S_2O_8$ )	Merck
trizma - base ( $C_4H_{11}NO_3$ )	Sigma
trizma - HCl ( $C_4H_{11}NO_3.HCl$ )	Sigma
xileno cianol ( $C_{25}H_{27}N_2O_6S_2Na$ )	Sigma

### 2.1.5 - Nucleotídeos

Os seguintes nucleotídeos foram adquiridos da Gibco, Pharmacia e Sigma.

2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato	(dATP)
2'-deoxicitidina 5'-trifosfato	(dCTP)
2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato	(dGTP)
2'-deoxitimidina 5'-trifosfato	(dTTP)

### 2.1.6 - Enzimas

Endonuclease de restrição <i>Nco</i> I (5.000 U/ml)	Pharmacia
Endonuclease de restrição <i>Nco</i> I (12.000 U/ml)	Sigma
Endonuclease de restrição <i>Nco</i> I (10.000 U/ml)	Gibco
Proteinase K (200 µg/ml)	Sigma
<i>Taq</i> DNA polimerase (5 U/µl)	Cenbiot <sup>®</sup>

### 2.1.7 - Marcadores de peso molecular

DNA ladder 100 pb	Gibco
DNA ladder 50 pb	Gibco

### 2.1.8 - Oligonucleotídeos (“primers”)

Os oligonucleotídeos foram sintetizados de acordo com a seqüência do gene da MCAD (GenBank M 91431), conforme descrito por Gregersen e colaboradores (1991). A síntese foi realizada pela Gibco e a seqüência dos referidos primers encontram-se abaixo. As bases sublinhadas representam o local de despreamento dos primers em relação à seqüência do gene, os quais foram introduzidos para criar o sítio de reconhecimento para a endonuclease de restrição.

primer D: 5' TTT ATG CTG GCT GAA ATG GCC ATG 3'

primer E: 5' AGT TTT TCT ACA GGA TAT TCT GTA TTA AAT CCA TGG CCT C 3'

## 2.1.9 - Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram os seguintes:

<b>NOME</b>	<b>MARCA</b>	<b>MODELO</b>
cuba de eletroforese horizontal	Gibco	Horizon 11.14
fonte para eletroforese	Gibco	250
máquina fotográfica	Polaroid	MP 4
microcentrífuga	Eppendorf	5415C
termociclador	MJ Research	PTC 100
transiluminador	Fotodyne	

## 2.1.10 - Soluções

Ao longo deste estudo, várias soluções foram utilizadas em procedimentos específicos e as mesmas foram preparadas no laboratório usando água Milli-Q estéril, conforme a tabela 2.2.

**Tabela 2.2 - Composição das soluções utilizadas nos procedimentos laboratoriais.**

<b>SOLUÇÃO</b>	<b>COMPOSIÇÃO</b>
espermidina	espermidina 0,1 M
gel de agarose 1,5 % e 3 %	1,5 ou 3 g agarose 100 ml TBE 1X
solução de acetato de sódio	3 M acetato de sódio (pH7,0)
solução de dNTPs	dATP 5,0 mM dCTP 5,0 mM dGTP 5,0 mM dTTP 5,0 mM
solução de etanol 70% (v/v)	70 ml de etanol absoluto 30 ml de água
solução de cloreto de sódio	6 M cloreto de sódio
solução de brometo de etídio 10 mg/ml	10 mg brometo de etídio 1 ml água
SDS 10 % (p/v)	10 g SDS água até completar 100 ml
solução de proteinase K	200 mg proteinase K 10 ml água
tampão de corrida I (6X)	0,25 % (p/v) azul de bromofenol 15 % (p/v) ficol
tampão de corrida II (6X)	0,25 % (p/v) azul de bromofenol 0,25 % (p/v) xilenocianol 15 % (p/v) ficol
TBE	100 mM trizma base 90 mM ácido bórico 1 mM EDTA
TE	10 mM trizma base 1 mM EDTA
tampão de lise sanguíneo (sol. lise I)	1550 mM NH <sub>4</sub> Cl 100 mM KHCO <sub>3</sub> 10 mM EDTA pH 7,4
tampão de lise nuclear (sol. lise II)	100 mM Tris-HCl pH 8,0 4 M NaCl 20 mM EDTA pH 8,2
tampão de PCR	10 mM Tris-HCl pH 8,3 50 mM KCl 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
tampão de enzima (Nco I)	50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM NaCl

## **2.2 - MÉTODOS**

### **2.2.1 - Protocolo laboratorial empregado**

O esquema do protocolo utilizado está representado na figura 2.1. Uma amostra de sangue de cada indivíduo foi colhida e posteriormente utilizada para extração de DNA, o qual foi usado para amplificação de um fragmento no exon 11 do gene da MCAD. A detecção da mutação foi realizada por clivagem com endonuclease de restrição.

### **2.2.2 - Extração de DNA genômico a partir de sangue total fresco (Miller *et al*, 1988)**

1 - Uma amostra de 10 ml de sangue coletado em EDTA dos indivíduos a serem testados foi colocada em tubo plástico cônico com capacidade de 50 ml (tipo Falcon). Foram adicionados 40 ml de solução de lise I e a mistura permaneceu 30 minutos (min) no gelo, após as amostras foram centrifugadas por 15 min. a 1.800 rpm em temperatura ambiente (TA).

2 - O sobrenadante foi descartado e, ao precipitado, foi adicionado mais 10 ml da solução de lise I. As amostras foram centrifugadas novamente por 5 min. a 1.800 rpm em TA. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em 3 ml de solução de lise II seguido por homogenização.

3 - A esta solução foram adicionados 50 µl de solução de proteinase K e 300 µl de solução de SDS, e os tubos foram colocados a 37°C e mantidos por um período de 12 a 16 horas.

4 - Após este período, 1 ml de solução de NaCl 6M foi adicionado aos tubos e os mesmos foram homogenizados, seguidos por uma centrifugação durante 20 min. a 2.500 rpm em TA. O sobrenadante foi transferido para um outro tubo e centrifugado novamente por 15 min. a 2.500 rpm em TA.

5 - O novo sobrenadante foi então transferido para um outro tubo e, ao mesmo, foram adicionados 3 vezes o volume de etanol absoluto gelado. O frasco foi homogenizado por inversão e o DNA removido com uma alça de vidro estéril, e lavado em etanol 70% (v/v).

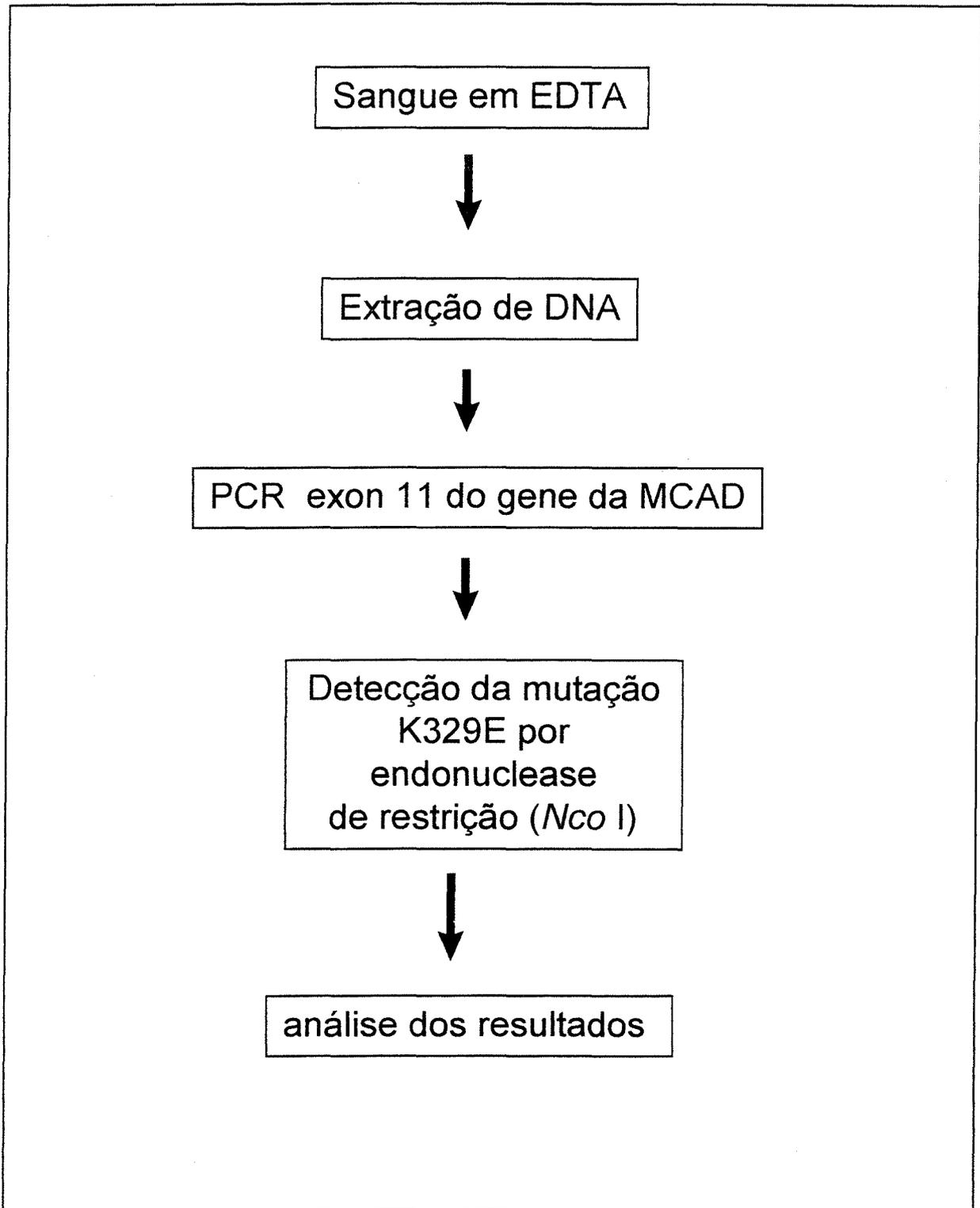


Figura 2.1 - *Protocolo laboratorial empregado no presente estudo*

6 - O DNA foi transferido para um tubo plástico cônico de 1,5 ml (tipo Eppendorf) e diluído em cerca de 300 µl de TE.

7 - Os tubos foram colocados em banho-maria a 65°C por 30 min.

8 - O DNA foi armazenado a - 20°C até o momento do uso.

### 2.2.3 - Amplificação de DNA genômico

1- Um premix foi preparado para cada reação de PCR, conforme:

5 µl 10X tampão de PCR

5 µl de solução de dNTPs

0,5 µl primer D (10 pmol/µl)

0,5 µl primer E (10 pmol/µl)

0,5 µl *Taq* DNA polimerase (5 U/µl)

4 µl de DNA (aproximadamente 100ng)

água Milli-Q até completar 50 µl

2 - Os parâmetros utilizados para amplificação foram:

Passo 1 (1 ciclo)	desnaturação inicial	94°C por 5 min
	denaturação	94°C por 1 min
Passo 2 (35 ciclos)	anelamento	60°C por 1 min
	extensão	74°C por 2 min
Passo 3 (1 ciclo)	extensão final	74°C por 7 min

3 - A amplificação foi verificada por eletroforese em gel horizontal de agarose a 1,5% (p/v). Uma alíquota (5 µl) do volume final de amplificação foi adicionado a 1 µl de tampão de corrida I, aplicada na canaleta do gel e o mesmo foi submetido à separação eletroforética a 100 V por 40 min. A visualização do fragmento foi realizada

pelo coramento do gel com solução de brometo de etídio e transiluminação com luz ultravioleta.

#### **2.2.4 - Purificação do fragmento de amplificação (Ausubel *et al*, 1997)**

1 - À solução de amplificação, foram adicionados 1/10 do volume inicial (em geral 4,5 µl) de solução de acetato de sódio e 3 vezes do volume inicial (em geral 135 µl) de etanol absoluto gelado. O material foi homogenizado por inversão e colocado no freezer a - 70°C e mantido por 30 min.

2 - Após este período, os tubos foram centrifugados por 10 min. a 14.000 rpm em TA. O sobrenadante foi descartado, o precipitado lavado com 200 µl de solução de etanol 70% (v/v) e centrifugado novamente por 5 min. a 14.000 rpm em TA.

3 - O sobrenadante foi descartado e o precipitado, onde se encontra o fragmento da amplificação, foi secado ao ar. O precipitado foi então diluído em 22 ou 23 µl de solução de TE.

#### **2.2.5 - Digestão com endonuclease de restrição (Gregersen *et al*, 1991)**

1 - A reação de digestão foi realizada em um volume final de 30 µl contendo os seguintes componentes:

22 ou 23 µl da solução do fragmento amplificado e purificado

3 µl 10X tampão de digestão

3 µl da solução de espermidina

10 U (1 ou 2 µl) da enzima de restrição (*Nco* I)

2 - O produto da digestão foi analisado por eletroforese em gel horizontal de agarose 3% (p/v). Uma alíquota (13 µl) do volume final de digestão foi adicionada a 2 µl do tampão de corrida I, aplicada na canaleta do gel e o mesmo foi submetido a separação eletroforética a 100 V por 80 min. A visualização do fragmento digerido foi realizada pelo coramento do gel com solução de brometo de etídio e transiluminação com luz ultravioleta.

### 2.2.6 - Fundamentação do protocolo laboratorial empregado

Este protocolo se baseia num primeiro momento, na amplificação de uma região de DNA genômico adjacente à mutação com primers específicos, onde um deles (primer D) apresenta um “mismatch” em relação à sequência normal do gene. Essa modificação no primer propicia a criação de um sítio de reconhecimento para a endonuclease de restrição *Nco* I apenas quando na presença da mutação. Desta forma, a detecção da mutação K329E pode ser feita através de uma reação de digestão.

Por outro lado, um controle interno desta digestão foi introduzido no primer E com a criação de um sítio adicional de reconhecimento para a endonuclease na outra extremidade do fragmento.

Desta maneira, após a reação de amplificação, obtemos um fragmento de 209 pb. Este produto da amplificação é submetido a reação de digestão e podem ser observados dois fragmentos de tamanho menor: um de 178 pb e outro de 158 pb. A presença de um fragmento de 178 pb identifica um indivíduo homocigoto para a sequência normal, pois a restrição ocorreu apenas no sítio controle. No caso de um indivíduo heterocigoto para a mutação, observamos dois fragmentos distintos (178 e 158 pb), um para cada alelo. E finalmente um homocigoto para a sequência mutante gera apenas um fragmento de 158 pb, pois houve a digestão nos dois sítios de reconhecimento nos dois alelos.

A figura 2.2 ilustra o princípio deste protocolo.

# DNA genômico

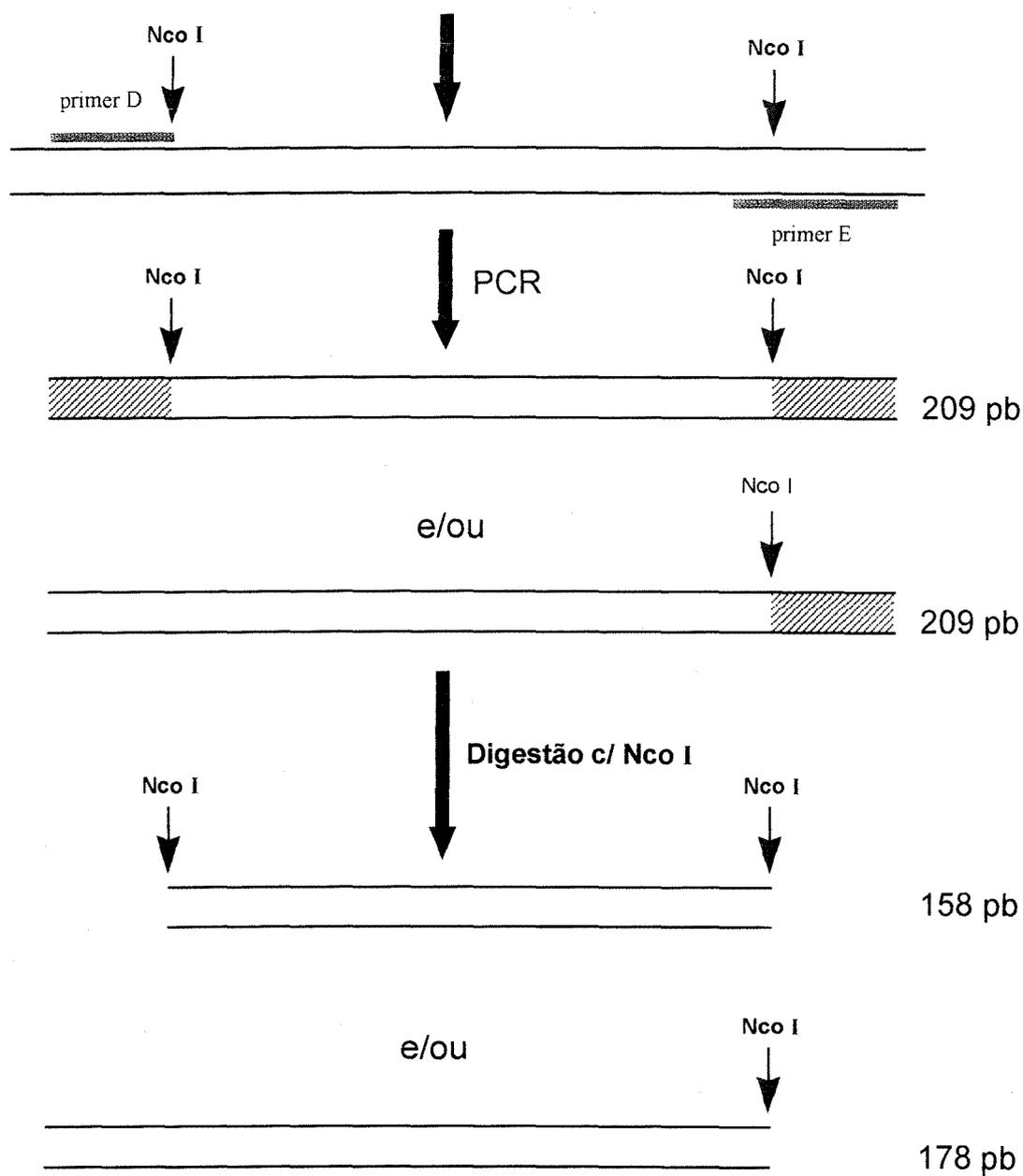


Figura 2.2 - Fundamentação do protocolo empregado

### **3 - RESULTADOS**

### **3.1 - Extração de DNA**

A extração de DNA a partir de sangue total humano foi realizada segundo o protocolo descrito no item 2.2.2. A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese de uma alíquota da solução em gel de agarose a 0,8% e a concentração das amostras foi estimada também por eletroforese tendo como padrão uma solução de DNA de concentração conhecida. Os DNAs foram diluídos em água Milli-Q estéril até uma concentração final de aproximadamente 100 ng/μl.

### **3.2 - Otimização da reação de PCR**

Nestes experimentos foram testadas diferentes condições até a completa otimização da reação, as quais são descritas abaixo.

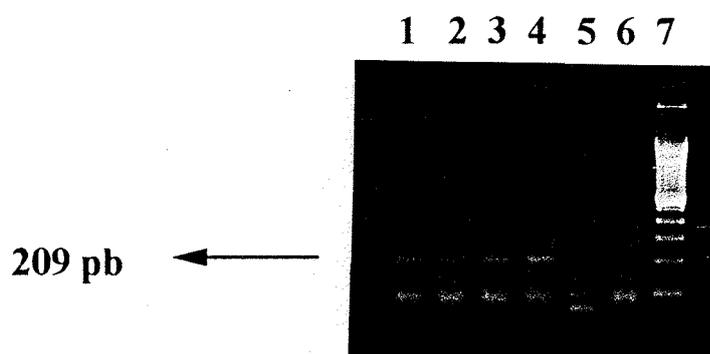
#### **3.2.1 - Condição 1**

Neste caso foram usados oligonucleotídeos na concentração de 20 pmoles cada. As concentrações dos demais componentes da reação, assim como as temperaturas de amplificação estão descritas no item 2.2.3 e foram baseadas em protocolos básicos para PCR.

Amostras de DNA de 5 indivíduos foram amplificadas por PCR e a análise eletroforética dos produtos obtidos podem ser observados na figura 3.1. A amplificação de um fragmento de DNA do tamanho esperado foi evidenciado nas canaletas 1, 2, 3 e 4; na canaleta 5 não houve amplificação, e na canaleta 6, controle negativo do PCR, também não houve amplificação. Além disto, pode-se verificar a presença de uma banda adicional em todas as canaletas, as quais possivelmente representam excesso de oligonucleotídeos na reação.

#### **3.2.2 - Condição 2**

Neste experimento, a concentração dos oligonucleotídeos foi diminuída para 5 pmoles cada, e foram mantidos os demais reagentes nas mesmas concentrações descritas acima (condição 1).



**Figura 3.1 - Amplificação de DNA na condição 1:** Análise eletroforética dos produtos de PCR em gel de agarose a 1,5% (p/v) corado com brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Canaletas 1, 2, 3, 4 e 5: amostras de DNAs de 5 indivíduos distintos analisados no presente estudo; canaleta 6: controle negativo (sem DNA); canaleta 7: marcador de peso molecular DNA ladder 100 pb.

Nestas condições de amplificação, a presença de um fragmento de DNA do tamanho esperado (209 pb) foi obtido nas canaletas 1, 2, 3, 4, 5 e 6, provenientes de amostras de DNA de indivíduos analisados no presente estudo. Na canaleta 7 não houve evidência de amplificação, pois este tubo de reação é o controle negativo do PCR, isto é, a amostra de DNA foi substituída por água Milli-Q estéril (figura 3.2).

### **3.2.3 - Condição 3**

Neste experimento, os oligonucleotídeos foram mantidos na concentração de 5 pmois cada, e a concentração da *Taq* polimerase foi diminuída para 2.5 U. Além disso, DMSO para uma concentração final de 9% (v/v) foi adicionado, com o objetivo de eliminar bandas inespecíficas.

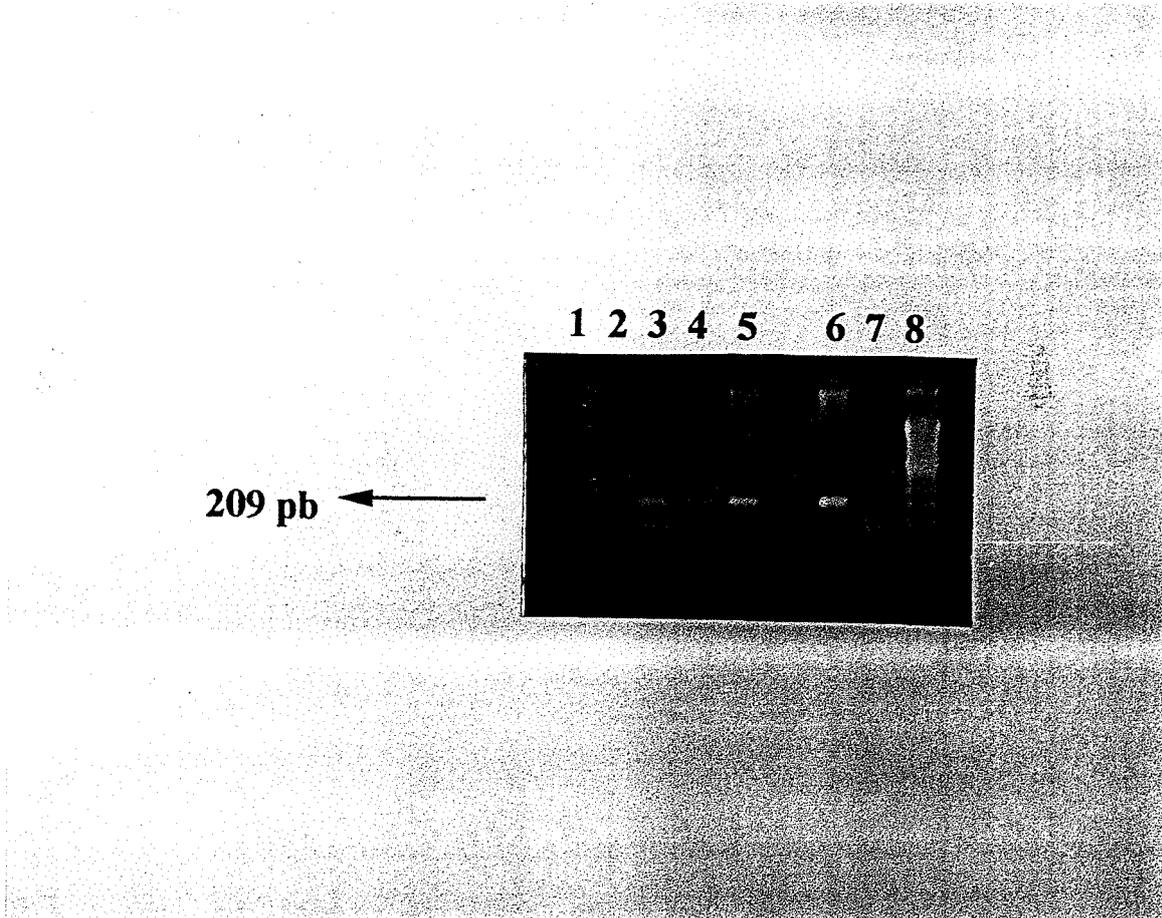
Não foi observada qualquer alteração na análise eletroforética dos fragmentos amplificados sob esta condição.

### **3.2.4 - Condição 4**

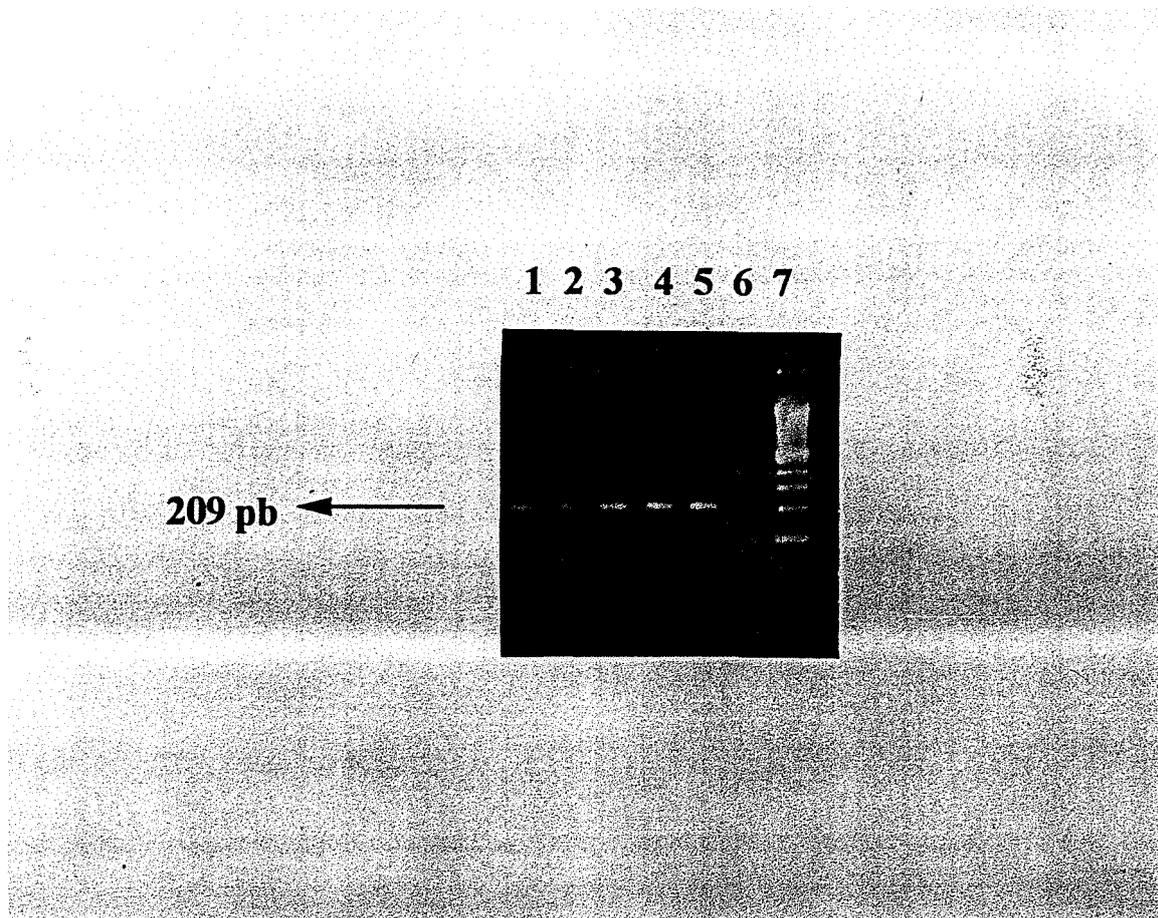
Nesta condição os oligonucleotídeos foram mantidos na concentração de 5 pmois cada e a *Taq* polimerase em 2.5 U, mas não foi adicionado DMSO na reação.

A análise eletroforética dos produtos de PCR podem ser observados na figura 3.3. Nas canaletas de 1 a 5, as quais são amostras de DNA de indivíduos distintos, foram evidenciadas amplificação do fragmento esperado (209 pb) e total eliminação da banda de tamanho menor presente anteriormente. Já na canaleta 6, controle negativo do PCR, não houve evidência de amplificação.

Portanto, as concentrações dos reagentes e condições de amplificação usadas neste experimento foram consideradas ideais no nosso laboratório para amplificação do fragmento alvo do presente estudo, e as mesmas estão descritas no item 2.2.4.



**Figura 3.2 - Amplificação de DNA na condição 2:** Análise eletroforética dos produtos de PCR em gel de agarose a 1,5% (p/v) corado com brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Canaletas 1, 2, 3, 4, 5 e 6: amostras de DNAs provenientes de 6 indivíduos distintos analisados no presente estudo; canaleta 7: controle negativo (sem DNA); canaleta 8: marcador de peso molecular DNA ladder 100 pb.



**Figura 3.3 - Amplificação de DNA na condição 4:** Análise eletroforética dos produtos de PCR em gel de agarose 1,5% (p/v) corado com brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Canaletas 1, 2, 3, 4 e 5: amostras de DNAs provenientes de 5 indivíduos deistintos analisados no presente estudo; canaleta 6 controle negativo (sem DNA); canaleta 7: marcador de peso molecular DNA ladder 100 pb.

### 3.3 - Detecção da mutação K329E

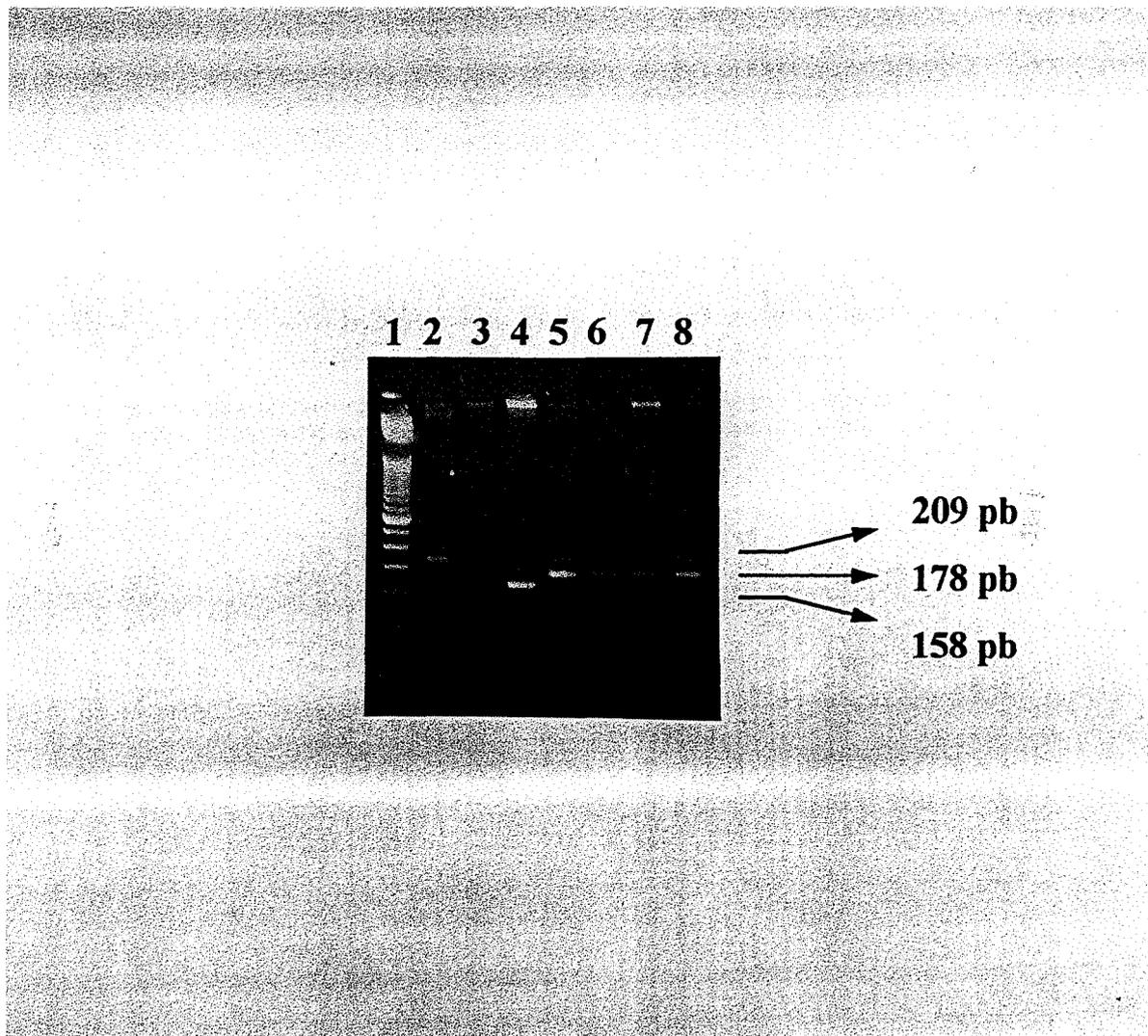
A reação de clivagem do fragmento de DNA amplificado na reação de PCR foi realizado conforme as condições descritas no item 2.2.5. Os produtos obtidos após a digestão foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 3%.

A figura 3.4 é um exemplo dos resultados obtidos com controles positivos e alguns indivíduos testados neste trabalho. Canaleta 2: controle da digestão, isto é, neste caso a enzima foi substituída por água Milli-Q estéril. Canaleta 3: heterozigoto para a mutação K329E (pai de um paciente com deficiência da MCAD). Canaleta 4: paciente com deficiência da MCAD e homozigoto para a mutação K329E. Canaletas 5 a 8: amostras de indivíduos testados os quais são homozigotos para a sequência normal do gene, ou seja, não apresentam a mutação K329E.

A interpretação dos resultados visualizados no gel foram feitas conforme o quadro abaixo:

Genótipo	Tamanho do fragmento
homozigoto para sequência normal	178 pb
heterozigoto	178 pb e 158 pb
homozigoto para sequência mutante	158 pb

Após o estabelecimento das condições ideais da amplificação por PCR e da digestão com enzima de restrição, a detecção da mutação K329E no gene da MCAD foi realizada em todos os indivíduos da população deste estudo (n=243), no entanto nenhum alelo com a mutação pesquisada foi identificado.



**Figura 3.4 - Detecção da mutação K329E no gene da MCAD.** A região de interesse foi amplificada por PCR, o produto clivado com endonuclease de restrição *Nco* I e analisado por eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v) corado com brometo de etídio (0,5 µg/µl). Canaleta 1: marcador de peso molecular DNA ladder 50 pb; canaleta 2: controle negativo da digestão; canaleta 3: indivíduo heterozigoto para a mutação; canaleta 4: paciente com deficiência da MCAD homozigoto para a mutação; canaletas 5, 6, 7 e 8: indivíduos homozigotos para sequência normal.

## 4 - DISCUSSÃO

A deficiência da MCAD tem atraído muita atenção nos últimos anos. Primeiramente porque ela tem se mostrado bastante frequente em populações do Norte Europeu (Matsubara *et al*, 1991) e, em segundo lugar, pelo fato dessa deficiência enzimática só se manifestar em períodos de estresse do sistema de  $\beta$ -oxidação, em geral durante o jejum em conexão com febre (Roe & Coates, 1995).

Testes diagnósticos tradicionais compreendem uma série de análises bioquímicas, que são extremamente trabalhosas e requerem equipamentos sofisticados. A partir do isolamento do gene da MCAD e da caracterização da mutação K329E, a qual é responsável por aproximadamente 90% dos alelos em pacientes com a doença, a detecção desta mutação em indivíduos pré-sintomáticos passou a ser uma boa alternativa para programas de triagem neonatal (Matsubara *et al*, 1990a; Gregersen *et al*, 1991; Kelly *et al*, 1990; Yokota *et al*, 1990b). Apesar de suas graves manifestações, o tratamento da deficiência da MCAD é simples e de baixo custo, tendo como base evitar o jejum e prover adequado aporte calórico e rápido manejo do paciente durante episódios de crise (Matsubara *et al*, 1991).

A frequência da mutação K329E é variável em diferentes populações, dependendo da etnia local, podendo variar de 1 para 40 (heterozigotos) na Inglaterra até o extremo de não ter sido detectada até o momento no Japão (Matsubara *et al*, 1991; Gregersen *et al*, 1993; Ged *et al*, 1995).

Assim, no presente trabalho padronizamos a técnica para detecção da mutação K329E, visando a implementar mais este teste diagnóstico em nosso laboratório, e procuramos estimar a frequência de heterozigotos para esta mutação no nosso meio, visto que não existe nenhum dado referente à frequência desta doença em nossa população.

É importante salientar que a idéia inicial seria a padronização do protocolo para sangue coletado em papel filtro, normalmente usado como fonte de DNA em programas de triagem neonatal. Isto facilitaria a rápida e imediata aplicação em recém-nascidos, visando identificar precocemente casos de deficiência da MCAD. Entretanto, o DNA obtido dos protocolos de extração se mostrou inadequado para o procedimento descrito, pois não foi possível a obtenção de produto após reação de PCR.

A técnica de detecção da mutação adotada foi a originalmente descrita por Gregersen e colaboradores (1991), mas como não houve evidências de amplificação com o uso das condições descritas, introduzimos diversas modificações em nosso laboratório.

Utilizando os parâmetros da condição 1 (item 3.2.1), a amplificação de um fragmento de tamanho desejado foi obtida, mas ficou evidenciada a presença de uma banda extra, possivelmente decorrente de oligonucleotídeos em excesso, o que propicia a formação de dímeros de oligonucleotídeos.

Portanto, na condição 2 (item 3.2.2) diminuimos a concentração dos oligonucleotídeos utilizados, sendo mantidas as demais condições. Neste caso, houve uma diminuição da presença dos dímeros de oligonucleotídeos, mas a formação dos mesmos não foi eliminada completamente.

Na condição 3 (3.2.3), testamos uma diminuição da concentração da *Taq* polimerase e a adição de DMSO, pois este reagente aumenta a extrínseca da reação, tornando mais específica a ligação dos oligonucleotídeos a cadeia molde de DNA. Nestas condições não houve mudança nos resultados obtidos. Desta forma, consideramos desnecessário o uso de DMSO e decidimos manter uma baixa concentração dos oligonucleotídeos e menor concentração de *Taq* polimerase. Assim, obtivemos os melhores resultados sob a condição 4 (3.2.4), onde completa eliminação dos dímeros de oligonucleotídeos e a obtenção de boa concentração de desejado foram evidenciados. Esta condição foi estabelecida como a ideal para a amplificação do fragmento desejado e utilizada durante todo este estudo.

Após a análise de 243 indivíduos (486 alelos), não detectamos nenhum alelo para a mutação K329E nessa amostra, achado que pode ser interpretado de maneiras distintas.

A primeira interpretação seria de que a população estudada apresenta uma frequência muito baixa do alelo para a mutação K329E, sendo que o número de indivíduos testados seria inferior ao necessário para a detecção de pelo menos um único alelo.

Estudos da frequência de heterozigotos para a mutação K329E foram realizados em diferentes populações. Na Inglaterra onde cerca de 500 indivíduos foram testados, a frequência foi estimada em 1 em cada 40 indivíduos. Em um outro estudo, apenas 120 indivíduos foram testados, 1 heterozigoto foi detectado (Matsubara *et al*, 1991; LeCoq *et al*, 1996). Por outro lado num estudo realizado no Japão onde 500 indivíduos

foram analisados, não foi encontrado nenhum alelo para a mutação K329E (Matsubara *et al*, 1991). Portanto, baseados nos dados obtidos até o momento, pode-se dizer que a frequência de heterozigotos para a mutação K329E é bastante variável

Contrariando dados obtidos anteriormente através de estudos retrospectivos em portadores assintomáticos, Ziadeh e colaboradores (1995) demonstraram recentemente que a mutação K329E pode não ser realmente responsável por cerca de 80 a 90 % dos alelos causadores de doença. No referido estudo, foram analisados mais de 80.000 recém-nascidos, tanto a nível bioquímico como molecular, e apenas 44% dos pacientes com deficiência da MCAD eram homozigotos para a mutação K329E, contra os cerca de 80 a 90% descritos na literatura; e 56% dos pacientes eram heterozigotos para K329E, contra apenas 18% dos demais estudos.

Outro ponto a ser levado em consideração é a origem étnica da nossa população. A alta frequência de um alelo para uma única mutação deve-se, geralmente a um efeito fundador. No caso do alelo para a mutação K329E, o mesmo provavelmente teve sua origem em um grupo germânico, como os dos anglos ou dos saxões, cujos descendentes migraram para a Inglaterra e posteriormente para os Estados Unidos e Austrália (LeCoq *et al*, 1996). Este alelo é encontrado primariamente em países com habitantes de origem caucasóide e não foi identificado, até o momento, no Japão (Yokota *et al*, 1991; Kolvraa *et al*, 1991). Além disto, em vários pacientes com deficiência da MCAD de origem Européia, Norte-americana, Canadense e Australiana foi encontrado uma forte associação deste alelo com um haplótipo único e comum em indivíduos caucasóides (Gregersen *et al*, 1993). Neste mesmo estudo foi demonstrado que a frequência de portadores numa população de origem caucasóide era de 1 para 84, e na população em geral era de 1 para 492, mostrando desta maneira que a mutação tem sua origem em populações caucasóides. Além disto, este estudo demonstrou a distribuição da mutação nos diferentes países europeus, mostrando que a ocorrência da mesma na Itália e em Portugal seria praticamente zero.

Por outro lado, um estudo realizado na Suíça (Conne *et al*, 1995) propõe que a distribuição da mutação K329E não obedece este gradiente norte → sul, já que uma alta frequência de heterozigotos (1/52) foi identificada na Suíça, a qual é mais elevada até mesmo do que a frequência estimada na Dinamarca (1/101), sugerindo a possibilidade de um efeito fundador regional.

Segundo Ziadeh e colaboradores (1995), uma alta frequência da mutação K329E foi encontrada numa população bastante miscigenada, que incluía Europeus provenientes do leste e negros, sugerindo que a miscigenação seja um fator importante a ser considerado, especialmente em países como o Brasil.

Fazendo uma análise da população do sul do Brasil, podemos concluir que a mesma é predominantemente caucasóide, com cerca de 87% de indivíduos da cor branca e o restante dividido entre pardos, negros e amarelos (IBGE). Entretanto, apesar da presença de descendentes germânicos, há uma marcada influência dos países do Sul da Europa, como Portugal, Espanha e Itália. Destes países, temos conhecimento da frequência estimada da mutação K329E na Itália, que fica em torno de 1/333, Alemanha com uma frequência de 1/116 e na Espanha com 1/141, em estudos que avaliaram cerca de 1000 indivíduos em cada país (Tanaka *et al*, 1997). Estes dados reforçam a necessidade da ampliação do número de indivíduos estudados para melhor interpretação dos resultados obtidos no presente trabalho.

Os indivíduos testados neste trabalho não foram selecionados por raça ou cor aparente. Conforme os dados obtidos no momento da coleta do material, a procedência dos mesmos se estende pelas diversas regiões do Estado, com um predomínio de indivíduos provenientes da Grande Porto Alegre, do Vale dos Sinos e da região Serrana, o que aumenta a chance de estarmos avaliando predominantemente indivíduos de origem caucasóide. No entanto, a classificação dos indivíduos por raça ou cor de pele é difícil e imprecisa.

Baseada nas informações acima e comprovada a dificuldade de interpretação dos dados obtidos, pode-se concluir que os resultados deste estudo são ainda preliminares. A padronização de um protocolo rápido e de fácil execução, o qual será utilizado como uma valiosa ferramenta para a detecção da deficiência da MCAD em nosso laboratório, foi alcançada com sucesso.

A ampliação do presente trabalho para se determinar claramente a frequência da mutação K329E em nosso meio é necessária e pode ser realizada através de dois estudos. O primeiro deles seria apenas a ampliação do número de indivíduos estudados e, o segundo, através de um estudo que levasse em consideração a região de origem dos indivíduos analisados, o que proporcionaria a separação dos mesmos em

grupos étnicos. A realização destes estudos se torna mais fácil e possível na medida que agora dispomos de um protocolo bem estabelecido para sua execução.

Convém salientar que este é um estudo pioneiro na América Latina, o que de certa forma contribui para dificultar a interpretação dos nossos resultados. Não há relatos de estudos com abordagem a nível molecular dos EIM da  $\beta$ -oxidação dos AG em países da latino-americanos. Sabemos apenas que a Fundação para Estudo das Enfermidades Neurometabólicas (FESEN), de Buenos Aires, na Argentina, realiza o diagnóstico da deficiência da MCAD utilizando espectrometria de massa em sequência, o que no entanto, requer equipamentos sofisticados e de alto custo.

Não existem dados referentes quanto ao seguimento a longo prazo dos pacientes com deficiência da MCAD detectados no período neonatal. A existência de adultos portadores desta patologia e o conhecimento da sua fisiopatologia sugerem que o tratamento precoce permite um desenvolvimento e crescimento normais (Roe & Cotes, 1995). Por outro lado, os relatos clínicos de casos com diagnóstico tardio são assustadores, devido a gravidade das sequelas. Uma população composta por 104 pacientes com deficiência da MCAD diagnosticados pela presença de sintomas sugestivos de um transtorno da  $\beta$ -oxidação foi estudada e a mortalidade nesta população chegou a 24% no primeiro episódio, destacando-se, porém, o fato de que nenhum paciente faleceu depois de ter sido estabelecido o diagnóstico. Dados obtidos em 78 sobreviventes revelaram sequelas como retardo mental, atraso na linguagem, déficit de atenção, convulsões, paralisia cerebral e retardo de crescimento em 21% dos pacientes (Iafolla *et al.*, 1994). Estes dados confirmam que o tratamento precoce permite uma significativa redução na mortalidade e que as sequelas tardias desta enfermidade são graves.

Os EIM constituem uma das principais causas de retardo mental severo e representam um problema crescente de saúde pública em todo o mundo. O impacto destas patologias sobre a família e a sociedade, determinaram o desenvolvimento de programas de triagem em todos os países, e eles variam muito de país para país, e mesmo dentro de um mesmo país (Sweetman, 1996). Nos últimos anos o número de patologias possíveis de serem detectadas por estes programas de triagem tem crescido bastante, e um dos maiores avanços tem sido a inclusão da deficiência da MCAD.

No presente estudo demonstramos que a detecção deste EIM, cuja identificação precoce pode ser decisiva para a saúde e a sobrevivência do paciente, é

viável. Estudos complementares devem ser realizados para estimar a frequência do problema em nosso meio e avaliar a relação custo/benefício da implantação deste teste em programas de triagem neonatal.

## **5 - CONCLUSÕES**

Os achados obtidos no presente estudo permitiram as seguintes conclusões:

- 1- As melhores condições para a detecção da mutação K329E do gene da MCAD em nosso laboratório, foram estabelecidas, e estão descritas no item 3.2 dos resultados.
- 2 - A detecção da mutação K329E através da técnica padronizada neste trabalho, é perfeitamente viável de ser realizada em nosso meio, sendo esta uma nova e importante ferramenta diagnóstica para a avaliação não só de recém-nascidos como de indivíduos com quadro clínico compatível com deficiência da MCAD, bem como de seus familiares.
- 3 - O estudo de 243 indivíduos (486 alelos) indicou que nenhum deles apresentava a mutação K329E, sugerindo que sua frequência em nosso meio seja provavelmente inferior à descrita nos estudos realizados na América do Norte e na Europa.
- 4 - A avaliação de um número maior de indivíduos se mostra necessária para que possamos estabelecer a frequência do gene em nossa população e, a partir daí, estimar a frequência de homozigotos em nosso meio.

## **6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ANDRESEN, B.S.; JENSEN, T.G.; WINTER, V.; KNUDSEN, I.; KOLVRAA, S.; JENSE, U.B.; BOLUND, L.; DURAN, M.; KIN, J-J.; CURTIS, D.; DIVRY, P.; VIANEY-SABAN, C.; GREGERSEN, N. (1993) A rare disease-associated mutation in the medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) gene changes a conserved arginine, previously show to be functionally essential in short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD). **American Journal of Human Genetics** 53: 730-739.
- ANDRESEN, B.S.; BROSS, P.; KNUDSEN, I.; WINTER, V.; KOLVRAA, S.; BOLUND, L.; GREGERSEN, N. (1994a). Medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency due to heterozygosity for the common mutation and an allele resulting in low levels of MCAD mRNA. **Journal of Inherited Metabolic Disease** 17: 275-278.
- ANDRESEN, B.S.; JENSEN, T.G.; BROSS, P.; KNUDSON, I.; WINTER, V.; KOLVRAA, S.; BOLUND, L.; DING, J-H.; CHEN, Y-T.; VAN HOVE, J.L.K.; CURTIS, D.; YOKOTA, I.; TANAKA, K.; KIM, J-J.P.; GREGERSEN, N. (1994b). Disease-causing mutations in exon 11 of the medium chain acyl-CoA dehydrogenase gene. **American Journal of Human Genetics** 54: 975-988.
- ANDRESEN, B.S.; BROSS, P.; UDVARI, S.; KIRK, J.; GRAY, G.; KMOCH, S.; CHAMOLES, N.; KNUDSEN, N.; WINTER, V.; WILCKEN, B.; YOKOTA, I.; HART, K.; PACKMAN, S.; HARPEY, J.P.; SAUDABRAY, J.M.; HALE, D.E.; BOLUND, L.; KOLVRAA, S.; GREGERSEN, N. (1997). The molecular basis if medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in compound heterozygous patients: is there correlation between genotype and phenotype? **Human Molecular Genetics** 6: 695-707.
- ANGELINI, C.; VERGANI, L. & MARTINUZZI, A.. (1992) Clinical and Biochemical aspects of carnitine deficiency and insufficiency: transport defects and inborn errors of B-oxidation. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences** , 29: 217-242.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; DEIDMANN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. (1997) **Current protocol in molecular biology**. Cap. 2, Vol. 1. Cambridge, John Willey & Sons,
- BEAUDET, A.L. & TSUI, L-C. (1993). A suggested nomenclature for designating mutations. **Human Mutation** 2: 245-248.
- BEAUDET, A.L.; SCRIVER, C.R.; SLY, W.S.; VALLE, D. (1995). Biochemistry and molecular basis of variant human phenotypes. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D.; eds. **The Molecular and Metabolic Basis of Inherited Disease**, 7<sup>a</sup> ed. New York, McGraw-Hill, pp. 261-276.
- BENSON, P.F. & FENSON, A.H. (1985). **Genetic biochemical disorders**. Oxford, Oxford University Press, pp. 274-305.

- BLAKEMORE, A.I.F.; SINGLETON, H.; POLLITT, R.J.; ENGEL, P.C.; KOLVRA, S.; GREGERSEN, N.; CURTIS, D. (1991). Frequency of the G985 MCAD mutation in the general population. **The Lancet** 337: 298-299.
- BRACKETT, J.C.; SIMS, H.F. & STEINER, R.D. (1994). Severe neonatal medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. **Journal of Clinical Investigation** 94: 1477-1483.
- BRADBURN, J. & SAPHIRO, E. (1990). Inborn errors of metabolism presenting as sepsis, failure to thrive or SIDS. **Children's Hospital Quarterly** 2:199-205.
- BROSS, P.; ENGST, S.; SRAUSS, A.W.; KELLY, D.P.; RASCHED, I.; GHISLA, S. (1990). Characterization of wild-type and active site mutant of human medium chain acyl-CoA dehydrogenase after expression in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry** 265: 7116-7119.
- CHRISTODOULOU, J.; HOARE, J.; HAMMOND, J.; IP, W.C.; WILCKREN, B. (1995). Neonatal onset of medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency with confusing biochemical features. **The Journal of Pediatrics** 126: 65-68.
- COATES, P.M. (1994). New developments in the diagnosis of mitochondrial fatty acid oxidation disorders. **European Journal of Pediatrics** 153 [ suppl 1]: 549-556.
- CONNE, B.; ZUFFEREY, R. & BELIN, D. (1995). The A985G mutation in the medium-chain acyl-CoA dehydrogenase gene: high prevalence in the Swiss population resident in Geneva. **Journal of Inherited Metabolic Disease** 18: 577-583.
- COHN, R.M. & ROTH, K.S. (1983). Catastrophic metabolic diseases presenting in the newborn period. In: **Metabolic diseases - a guide to early recognition**. Philadelphia, W.B. Saunders Company, pp. 3-6.
- DI DONATO, S. (1997). Diseases associated with defects of  $\beta$ -oxidation. In: Rosenberg, R.; Prusiner, S.; DiMauro, S.; Barch, R.; eds. **The Molecular and Genetics Basis of Neurological Disease**, 2<sup>nd</sup> ed. Butterworth-Heinemann. pp. 939-956.
- DING, J-H.; ROE, C.; IAFOLLA, A.K.; CHEN, Y-T. (1991). Medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency and sudden infant death. **The New England Journal of Medicine** 325: 61-62.
- DIVRY, P.; DAVID, M.; GREGERSEN, N.; KOLVRAA, S.; CHRISTENSEN, E.; COLLET, J.P.; DELLAMONICA, C.; COTLE, J. (1983). Dicarboxylic aciduria due to medium chain acyl-CoA dehydrogenase defect. **Acta Paediatrica Scandinavia** 72: 943-949.
- DUNDAR, M.; LANYON, W.G. & CONNER, J.M.(1993). Scottish frequency of the common G985 mutation in the medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) gene and the role of MCAD deficiency in sudden infant death syndrome (SIDS). **Journal of Inherited Metabolic Disease** 16: 991-993.

- DURAN, M. & WADMAN, S.K. (1987) Chemical diagnosis of inherited defects of fatty acid metabolism ketogenesis. **Enzyme**, 38: 115-123.
- EMERY, J.L.; HOWAT, A.J.; VARIEND, S.; VAWTER, G.F. (1988). Investigation of inborn errors of metabolism in the unexpected infant deaths. **The Lancet** 2: 29-31.
- GED, C.; SEBAL, H.E.; VERNEUIL, H.; PARROT-ROULEAN, F. (1995). Is genotyping useful for the screening of medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in France ? **Journal of Inherited metabolic Disease** 18: 253-256.
- GIUGLIANI, R. (1988). Erros Inatos do Metabolismo: uma visão panorâmica. **Pediatria Moderna** 23: 29-37.
- GREGERSEN, N.; LAURITZEN, R.; RASMUSSEN, K. (1976). Suberyglycine Excretion in the urine from a patient with dicarboxylic aciduria. **Clinica Chimica Acta** 70: 147.
- GREGERSEN, N.; BLAKEMORE, A. I.F.; WINTER, V.; ANDRESEN, B.; KOLVRAA, S.; BOLUND, L.; CURTIS, D.; ENGEL, P.C. (1991). Specific diagnosis of medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in dried blood spots by a polymerase chain reaction (PCR) assay detecting a point mutation (G985) in the MCAD gene. **Clinica Chimica Acta** 203: 23-34.
- GREGERSEN, N.; ANDRESEN, B.S.; BROSS, P.; WINTER, V.; RUDIGER, N.; ENGST, S.; CHRISTENSEN, E.; KELLY, D.; STRAUSS, A.W.; KOLVRAA, S.; BOLUND, L.; GHISLA, S. (1991). Molecular characterization of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency: identification of lys<sup>329</sup> to glu mutation in the MCAD gene and expression of inactive mutant enzyme protein in *E. coli*. **Human Genetics** 86: 545-551.
- GREGERSEN, N.; WINTER, V.; KOLVRAA, S.; ANDRESEN, B.; BROSS, P.; BLAKEMORE, A.; CURTIS, D.; BOLUND, L. (1992). Molecular analysis of medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: a diagnosis approach. In: Coates, P.M.; Tanaka, K. eds. **New developments in fatty acid oxidation**. New York, Wiley-Lis, pp. 441-452.
- GREGERSEN, N.; WINTER, V.; CURTIS, D.; DEUFEL, T.; MACK, M.; HENDRICKX, J.; WILLEMS, P.J.; PONZONE, A.; PARRELLA, A.; PONZONE, R.; ZHANG, W.; DING, J-H.; CHEN, Y.T.; KAHLER, S.; ROE, C.R.; KOLVRAA, S.; SCHNEIDERMAN, K.; ANDRESEN, B.S.; BROSS, P.; BOLUND, L. (1993). Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency: the prevalent mutation G985 (K304) is subject to a founder effect from northwestern Europe. **Human Hereditas** 43: 342-350.
- GREGERSEN, N.; ANDERSEN, B.S.; BROSS, P.; BOLUND, L.; KOLVRAA, S. (1994a) Disorders of mitochondrial fatty acid oxidation - especially medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency. In: Farrinaux, J-P. & Dhondt, J-L. eds. **New Horizons in Neonatal Screening**, Netherlands, Elsevier Science, pp. 247-255.

- GREGERSEN, N.; WINTER, V.; LYONNET, S.; SAUDUBRAY, J-M.; WENDEL, U.; JENSEN, T.G.; ANDRESEN, B.S.; KOLVRAA, S.; LENHERT, W.; BOHUND, L.; CHRISTENSEN, E.; BROSS, P. (1994b). Molecular genetic characterization and urinary excretion pattern of metabolites in two families with MCAD deficiency due to compound heterozygosity with a 13 base pair insertion in one allele. **Journal of Inherited Metabolic Disease** 17: 169-184.
- HEALES, S.J.R.; THOMPSON, G.N.; MASSOUD, A.F.; RAHMAN, S.; HALLIDAY, D.; LEONARD, J.V. (1994). Production and disposal of medium-chain fatty acids in children with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. **Journal of Inherited Metabolic Disease** 17: 74-80.
- HEPTINSTALL, L.E.; TILL, J.; WRAITH, J.E.; BESLEY, T.N. (1995). Common MCAD mutation in a healthy parent of two affected siblings. **Journal of Inherited Metabolic Disease** 18: 638-639.
- HOLTON, J.B.; ALLEN, J.T.; GREEN, C.A.; PARTINGTON, S.; GILBERT, R.E.; BERRY, P.J. (1991). Inherited metabolic disease in the sudden infant death syndrome. **Archives of Disease in Childhood** 66: 1315-1317.
- HOWAT, A.J.; BENNET, M.J.; SHAW, L.; ENGEL, P.C. (1985). Defects of metabolism of fatty acids in the sudden infant death syndrome. **British Medical Journal** 290: 1771-1773.
- IAFOLLA, A.K.; THOMPSON, R.J.; ROE, C.R. (1994). Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: clinical course I 120 affected children. **Journal of Pediatric** 124: 409-415.
- IKEDA, I.; KEESE, S.M.; FENTON, W.A.; TANAKA, K. (1987). Biosynthesis of rat liver mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases: in vitro synthesis import into mitochondria and processing of their precursor in a cell-free system and in cultured cells. **Archives of Biochimica and Biophysics** 252: 662-674.
- IOLASCON, A.; PARRELA, T.; PERROTA, S.; GUARDAMAGNA, O.; COATES, P. M.; SARTORE, M.; SURREY, S.; FORTINA, P. (1994). Rapid detection of medium chain acyl-CoA dehydrogenase gene mutation by non-radioactive, single strand conformation polymorphism minigels. **Journal of Medical Genetics** 31: 551-554.
- JENSEN, T.G.; ANDRESEN, B.S.; BROSS, P.; JENSEN, V.B.; HOLME, E.; KOLVRAA, S.; GREGERSEN, N.; BOLUND, L. (1992). Expression of wild-type and mutant medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) cDNA in eucaryotic cells. **Biochimica et Biophysica Acta** 1180: 65-72.
- KELLY, D.P.; KIM, J-J.; BILLADELLO, J.J.; HAINLINE, B.E.; CHU, T.W.; STRAUSS, A.W. (1987). Nucleotide sequence of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase mRNA and its expression in enzyme-deficient human tissue. **Proceedings of the National Academy of Science USA** 84: 4068-4072.

- KELLY, D.P.; GORDON, J.I.; ALPERS, R.; STRAUSS, A.W. (1989). The tissue-specific expression and developmental regulation of two nuclear genes encoding rat mitochondrial proteins. **The Journal of Biological Chemistry** 264(32): 18921-18925.
- KELLY, D.P.; WHELAN, A.J.; OGDEN, M.L.; ALPERS, R.; ZHANG, Z.; BELLUS, G.; GREGERSEN, N.; DORLAND, L.; STRAUSS, A.W. (1990). Molecular characterization of inherited medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. **Proceedings of National Academy of Science of USA** 87: 9236-9240.
- KELLY, D.P.; HALE, D.E.; RUTLEDGE, S.L.; OGDEN M.L.; WHELAN, A.J.; ZHANG, Z.; STRAUSS, A.W. (1992). Molecular basis of inherited medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency causing sudden infant death. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 15: 171-180.
- KIDD, J.R.; MATSUBARA, Y.; CASTIGLIONE, C.M.; TANAKA, K.; KIDD, K.K. (1990) The locus for the medium chain acyl-CoA dehydrogenase gene on chromosome 1 is highly polymorphic. **Genomics** 6: 89-93.
- KIM, J.P. & WU, J. (1988). Structure of the medium-chain acyl-CoA dehydrogenase from pig liver mitochondria at 3-Å resolution. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA** 85: 6677-6681.
- KIRK, J.M.; LAING, I.A.; SMITH, N.; UTTLEY, W.S. (1996). Neonatal presentation of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in two families. **Journal of Inherited Metabolic Diseases** 19: 370-371.
- KOLVRAA, S.; GREGERSEN, N.; CHRISTENSEN, E.; HOLBOTH, N. (1982). In vitro fibroblast studies in a patient with C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-dicarboxylic aciduria: evidence for a defect in general acyl-CoA dehydrogenase. **Clinica Chimica Acta** 126: 53.
- KOLVRAA, S.; GREGERSEN, N.; BLAKEMORE, A.I.F.; SCHNEIDERMANN, A.K.; WINTER, V.; ANDRESEN, B.S.; CURTIS, D.; ENGEL, P.C.; PRICILLE, D.; RHEAD, W.; BOLUND, L. (1991). The most common mutation causing medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency is strongly associated with a particular haplotype in the region of the gene. **Human Genetics** 87: 425-428.
- LECOQ, I.; MALLET, E.; BONTE, J.B.; TRAVERT, G. (1996). The A985 to G mutation of the medium-chain acyl-CoA dehydrogenase gene and sudden infant death syndrome in Normandy. **Acta Paediatrica** 85: 145-147.
- LEVIN, M.L.; ZHANG, Y.H.; SCHWARTZ, E.I.; MCCABE, E.R.B. (1992). MCAD K329E mutant allele frequency in Russia: unselected sample with newborn screening specimens and need for automatism. **American Journal of Human Genetics** 51 suppl:A 72.
- LUBS, H.A. (1977). Frequency of genetic disease. In: Lubs, H.A. & De La Cruz, F. eds. **Genetic Counseling**. New York, Raven Press. pp 26-30.

- MARCUS, R. & COULSTON, A.M. (1996). The Vitamins. In: Hardman, J.G. & Limbard, L.E. eds. **Goodman & Gilman's - The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9<sup>th</sup> edition, New York, McGraw-Hill, pp 1567-1568.
- MATSUBARA, Y.; KRAUS, J.P.; YANG-FEING, T.L.; FRANCKEU, U.; ROSENBERG, L.E.; TANAKA, K. (1986). Molecular cloning of c DNA encoding rat and human medium-chain-acyl-CoA dehydrogenase and assignment of the gene to human chromosome 1. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA** 83: 6543-6547.
- MATSUBARA, Y.; KRAUS, J.P.; OZASA, H.; GLASSBERG, R.; FINOCCHIARO, G.; IKEDA, Y.; MOLE, J.; ROSENBERG, L.E.; TANAKA, K. (1987). Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding the entire precursor of rat liver medium chain acyl coenzyme A dehydrogenase. **Journal of Biological Chemistry** 262: 10104-10108.
- MATSUBARA, Y.; INDO, Y.; NAITO, E.; OZASA, H.; GLASSBERG, R.; VOCKLEY, J.; IKEDA, Y.; KRAUS, J.; TANAKA, K. (1989). Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNAs encoding the precursor of rat long chain acyl-coenzyme A dehydrogenase, short chain acyl-coenzyme A, and isovaleryl-coenzyme A dehydrogenase. **The Journal of Biological Chemistry** 264(27): 16321-16333.
- MATSUBARA, Y.; NARISAWA, K.; MIYABAYASHU, S.; TADA, K.; COATES, P.M.; BACHMANN, C.; ELSA II, L.J.; POLLIT, R.J.; RHEAD, J.; ROE, C.R. (1990a). Identification of a common mutation in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 171(1): 498-505.
- MATSUBARA, Y.; NARISAWA, K.; MIYABAYASHU, S.; TADA, K.; COATES, P.M. (1990b). Molecular lesion in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. **The Lancet** 335: 1589.
- MATSUBARA, Y.; NARISAWA, K.; TADA, K.; IKEDA, H.; YE-QI, Y.; DANKS, D. M.; GREEN, A.; MCCABE, E.R.B. (1991). Prevalence of K329E mutation in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase gene determined from Guthrie cards. **The Lancet** 38: 552-553.
- MATSUBARA, Y.; NARISAWA, K. & TADA, K. (1992). Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: molecular aspects. **European Journal of Pediatrics** 151: 154-159.
- MAYES, P. (1996). Oxidation of fatty acids: ketogenesis. In: Murray, R.; Granner, D.; Mayes, P.; Rotwell, V. eds. **Harper's Biochemistry**. 24<sup>th</sup> ed. A Lange Medical Book, pp. 224-235.
- MCCABE, E.R.B. (1994). DNA techniques for screening of inborn errors of metabolism. **European Journal of Pediatrics** 153 [ suppl 1]: 584-585.

- McKUSICK, V.A. (1996). **Mendelian Inheritance in man**. 11<sup>a</sup> ed. The Johns Hopkins University, Baltimore. 2320p
- MILLER, A.S.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.S. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acid Research** 16:1215.
- MILLINGTON, D.S.; KODO, N.; NORWOOD, D.L.; ROE, C.R. (1990). Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. **Journal of Inherited Metabolic Disease** 13: 321-324.
- MORTON, D.H. & KELLEY, R.I. (1990). Diagnosis of medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency in the neonatal period by measurement of medium-chain fatty acids in plasma and filter paper samples. **Clinical and Laboratory Observations** 117(3): 439-442.
- MOWAT, A.P. (1983). Reye's Syndrome: 20 years on. **British Medical Journal** 286(6383): 1999-2001.
- NYHAN, W.L. (1991). Classic approaches to the treatment of inherited metabolic disease. In: Friedman, T. ed. **Therapy for genetic disease**. Oxford, Oxford University Press, pp 1-29.
- PATEL, J.S. & LEONARD, J.V. (1995). Ketonuria and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. **Journal of Inherited Metabolic Diseases** 18: 98-99.
- RABIER, D.; BARDET, J.; POVRY, P.; POGGI, F.; BRIVET, M.; SAUDUBRAY, J.M.; MAUMOUN, P. (1995). Do criteria exist from urinary organic acids to distinguish  $\beta$ -oxidation defects? **Journal of Inherited Metabolic Diseases** 18: 257-260.
- REBUFFAT, E.; SOTTIAUX, M.; GOYEUS, P.; BLUM, D.; VAMOS, E.; VANVLIET, G.; HASEARTS, D.; STEENHOUT, P.; DEMEIRLER, L.; KAHN, A. (1991). Sudden Infant death syndrome, as first expression of a metabolic disorder. In: Schaub, J.; Vanhoof, F.; Vis, H.L. eds. **Inborn Error of Metabolism - Nestle Nutrition workshop series**, vol 24. New York: Raven Press, pp 71-80.
- RHEAD, W.J.; AMENDT, B.A.; FRITCHMAN, K.S.; FELTS, S.J. (1983). Dicarboxylic aciduria: deficient [1-<sup>14</sup>C] octanoate oxidation and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase in fibroblasts. **Science** 221: 73.
- ROE, C.R. & COATES, P.M. (1995). Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. eds. **The Molecular and Metabolic Basis of Inherited Disease**, 7<sup>th</sup> ed., New York, McGraw-Hill, pp. 1501-1533.
- RUITENBEEK, W.; POELS, P.J.E.; TURNBULL, D.M.; GARAVAGLIA, B.; CHALMERS, R.A.; TAYLOR, R.W.; GABREELS, F.J.M. (1995) Rhabdomyolysis and acute encephalopathy in late onset medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, 58: 209-214.

- RUPAR, C.A.; FREWEN, T.W.; GORDON, B.A. (1995). Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency is not a cause of previously diagnosed Reye syndrome. **Journal of Inherited Metabolic Disease** 18: 365-366.
- SABATINI, D.D. & ADESNIK, M.B. (1995.) The biogenesis of membranes and organelles. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D.; eds. **The Molecular and Metabolic Basis of Inherited Disease**, 7<sup>a</sup>ed. New York, McGraw-Hill, pp. 459-553.
- SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. (1989) **The Metabolic Basis of Inherited Disease**, 6<sup>th</sup> ed., New York, McGraw-Hill, 3006p
- SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. (1995) **The Molecular and Metabolic Basis of Inherited Disease**, 7<sup>th</sup> ed., New York, McGraw-Hill, 4605p
- SEDDON, H.R.; GREEN, A.; GRAY, R.G.F.; LEONARD, J.V.; POLLET, R.J. (1994). Regional variations in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. **The Lancet** 345: 135-136.
- STANLEY, C.A.; HALE, D.E.; COATES, P.M.; HALL, C.L.; CORKEY, B.E.; YANG, W.; KELLEY, R.I.; GONZALES, E.L.; WILLIANSON, J.R.; BAKER, L. (1983). Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in children with non-ketotic hypoglycemia and low carnitine levels. **Pediatric Research** 17: 877.
- STANLEY, C.A. (1990). Disorders of fatty acid oxidation. In: Fernandes, J.; Saudubray, J-M.; Tada, K. eds. **Inborn Metabolic Diseases**, Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 395-403.
- STRYER, L. (1996). Metabolismo dos ácidos graxos. Em: Stryer, L. eds. **Bioquímica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 4<sup>ed</sup>, 1000 p.
- SWEETMAN, L. (1996). Newborn screening by tandem mass spectrometry (MS-MS). **Clinical Chemistry** 42:345.
- TANAKA, K.; YOKOTA, I.; COATES, P.M.; STRAUSS, A.W.; KELLY, D.P.; ZHANG, Z.; GREGERSEN, N.; ANDRESEN, B.S.; MATSUBARA, Y.; CURTIS, D.; CHEN, Y.T. (1992). Mutations in the medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) gene. **Human Mutation** 1: 271-279.
- TANAKA, K.; GREGERSEN, N.; RIBES, A.; KIM, J.; KOLVRAA, S.; WINTER, V.; EIBERG, H.; MARTINEZ, G.; DEUFEL, T.; LEIFERT, B.; SANTER, R.; FRANCOIS, B.; PRONICKA, E.; LASZLO, A.; KMOCH, S.; KREMENSKY, I.; KALAYDJICVA, L.; OZALP, I.; ITO, M. (1997). A survey of the newborn populations in Belgium, Germany, Poland, Czech Republic, Hungary, Bulgaria, Spain, Turkey, and Japan for the G 985 variant allele with haplotype analysis at the medium chain Acyl-CoA dehydrogenase gene locus: clinical and evolutionary consideration. **Pediatric Research** 41: 201-209.

- VIANEY-LIAUD, C.; DIVRY, P.; GREGERSEN, N.; MATHIEU, M. (1987). The Inborn Errors of Mitochondrial fatty acid oxidation. **Journal of Inherited Metabolic Disease** 10: 159-198.
- VIANEY-SABAN, C.; DORCHE, C.; DIVRY, P.; LAHET, C.; MATHIEU, M. (1994). Screening of the A985 to G mutation of the medium chain acyl-CoA dehydrogenase gene in Rhone- Alpes area (Ain, Ardeche, Loire, Rhone): a pilot study. In: Farrinaux, J-P. & Dhondt, J.L. eds. **New Horizons in Neonatal Screening**, Netherlands, Elsevier Science, pp. 257-260.
- VOET, D & VOET, J.G. (1995). Lipid Metabolism. In: Voet & Voet eds. **Biochemistry**. 2<sup>a</sup> ed. New York. John Wiley & Sons, pp. 618-677.
- WANNMACHER, C.M.D. & DIAS, R.D. (1986). Oxidação dos ácidos graxos- Metabolismo dos corpos cetônicos. Em: Wannmacher, C.M.D. & Dias, R.D. eds. **Bioquímica fundamental**. 6<sup>a</sup> ed., Departamento de Bioquímica - UFRGS. pp. 261-276.
- WILCKEN, B.; CARPENTER, K.H. & RICHMOND, J. (1993). Neonatal symptoms in medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. **Archives Disease in Childhood** 69: 292-294.
- YOKOTA, I.; INDO, Y.; COATES, P.M.; TANAKA, K. (1990a). Molecular basis of medium chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. **Journal of Clinical Investigation** 86: 1000-1003.
- YOKOYA, I.; TANAKA, K.; COATES, P.M.; UGARTE, M. (1990b). Mutations in the medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. **The Lancet** ii: 748.
- YOKOTA, I.; COATES, P.M.; HALE, D.E.; RINALDO, P.; TANAKA, K. (1991). Molecular survey of a prevalent mutation, <sup>985</sup> A-to-G transition, and identification of five infrequent mutation in the medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) gene in 55 patients with MCAD deficiency. **American Journal of Human Genetic** 49: 1280-1291.
- ZHANG, Z.; KELLY, D.P.; KIM, J.; ZHOU, Y.; OGDEN, M.L.; WHELAN, A.J.; STRAUSS, A.W. (1992). Structural organization and regulatory regions of the human medium-chain acyl-CoA dehydrogenase gene. **Biochemistry** 31: 81-89.
- ZIADEH, R.; HOFFMAN, E.P.; FINEGOLD, D.N.; HOOP, R.C.; BRACKETT, J.C.; STRAUSS, A.W.; NAYLOR, E.W. (1995). Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Pennsylvania: neonatal screening shows high incidence and unexpected mutation frequencies. **Pediatric Research** 37: 675-678.

## 7 - ANEXO

## TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do Projeto “Deficiência da desidrogenase das acil-CoA dos ácidos graxos de cadeia média no sul do Brasil: uma abordagem molecular”. Para tanto fico ciente de que:

1 - Este projeto visa estudar diversos aspectos relacionados a deficiência da desidrogenase das acil-CoA dos ácidos graxos de cadeia média, com o objetivo de melhor conhecer esta patologia.

2 - Serão coletados 10 ml de sangue em EDTA para extração de DNA, os quais serão utilizados exclusivamente neste trabalho.

Porto Alegre,

de 199 .

-----

obs: caso o paciente seja menor de idade, o responsável é que deverá assinar.