



**Carmen Marília  
Moreira de Sousa**

**Detecção e caracterização molecular de defeitos no  
ciclo da carnitina**



**Carmen Marília  
Moreira de Sousa**

**Detecção e caracterização molecular de defeitos no  
ciclo da carnitina**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Sónia Mendo Barroso, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e da Doutora Laura Vilarinho, Investigadora Auxiliar do Departamento de Genética do Centro de Genética Médica Jacinto de Magalhães, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge – CGMJM-INSA.

Dedico este trabalho às crianças rastreadas com a esperança de ter contribuído para a melhoria das suas vidas...

## **o júri**

presidente

Professora Doutora Helena Silva  
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Luísa Cristina da Costa Azevedo  
Investigador do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto - IPATIMUP

Doutora Laura Vilarinho  
Investigadora Auxiliar do Departamento de Genética do Centro de Genética Médica Jacinto de Magalhães - CGMJM-INSA

Professora Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso  
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

O trabalho aqui apresentado foi possível devido à implementação do rastreio neonatal a todos os recém-nascidos em Portugal. Esse mérito é atribuído a duas pessoas. O Doutor Vaz Osório que o instituiu e que o perfilha até hoje, e a Doutora Laura Vilarinho que dirigindo este rastreio o expandiu a muitas patologias através das novas tecnologias e do saber,...e projectou Portugal num lugar soberbo a nível mundial no rastreio das doenças hereditárias do metabolismo. O meu Obrigada.

Gostaria de agradecer também a todos os que me ajudaram a levar a cabo este trabalho directa ou indirectamente. À Helena, que esteve comigo nesta aventura.

À minha família por todo o apoio, carinho e compreensão.

## palavras-chave

carnitina, deficiência do transportador de carnitina, deficiência em carnitina palmitoiltransferase, deficiência em carnitina acilcarnitina translocase, OCTN2, CPT1, CPT2, CACT, oxidação dos ácidos gordos

## resumo

O ciclo da carnitina é uma etapa fundamental da oxidação mitocondrial dos ácidos gordos de cadeia longa, porque catalisa o seu transporte até à matriz mitocondrial para serem oxidados. Este transporte requer quatro proteínas. O transportador de carnitina orgânico (OCTN2), a carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1), a carnitina acilcarnitina translocase (CACT) e a carnitina palmitoiltransferase 2 (CPT2).

As alterações nos genes que codificam estas proteínas causam doenças da oxidação mitocondrial dos ácidos gordos, com uma apresentação clínica metabólica, miopática ou cardíaca, que estão associadas à morte súbita infantil.

A espectrometria de massa em *tandem* veio possibilitar o rastreio destas patologias através da avaliação do perfil de acilcarnitinas. Este estudo baseia-se na sua detecção e caracterização molecular.

Foram estudados 15 casos e 30 familiares; 11 casos do rastreio neonatal, 2 provenientes de centros estrangeiros e 2 casos com fenótipo clínico.

Foram caracterizados molecularmente 13 casos, detectadas 14 mutações causais, cinco das quais não estavam descritas na literatura ou na base de dados *HGMD* e 8 variantes polimórficas descritas no *NCBI*. Foram encontradas 5 mutações *missense*, 4 mutações *frameshift* (pequenas deleções e inserções), 1 mutação *nonsense*, 2 deleções e 2 mutações *splicing*.

Este estudo permitiu a confirmação de diagnóstico em nove casos com deficiência no transportador de carnitina, três casos com deficiência em carnitina palmitoiltransferase 2 e um caso com deficiência em carnitina palmitoiltransferase 1. Tornou disponível a caracterização molecular de doentes futuros com diagnóstico clínico, ou bioquímico, deste tipo de patologias.

**keywords**

carnitine, carnitine transporter deficiency, carnitine palmitoyltransferase, carnitine-acylcarnitine translocase, OCTN2, CPT1, CPT2, CACT, fatty acid oxidation

**abstract**

Carnitine cycle plays an essential role in mitochondrial oxidation of long chain fatty acids by catalyzing their transport into the mitochondrial matrix to be oxidized. This transport requires four proteins: organic carnitine transporter (OCTN2), carnitine palmytoiltransferase 1 (CPT1), carnitine-acylcarnitine translocase (CACT) and carnitine palmytoiltransferase 2 (CPT2).

Deleterious mutations in the genes encoding these proteins cause diseases of the mitochondrial oxidation of fatty acids, with a metabolic, cardiac or myopathic presentation often associated with sudden infant death.

Mass spectrometry in tandem allows the screening of these diseases by assessing the profile of acylcarnitines. This investigation is based on biochemical detection and molecular characterization of patients with these pathologies.

A cohort of 15 cases and 30 family members were studied, 11 of which were detected by neonatal screening and four by clinical presentation. After the molecular approach of genes involved with these disorders, 13 cases were characterized, and 14 causal mutations were identified, five of them not described in the literature. Five missense mutations were found, as well as, four frameshift (small insertions and deletions), one nonsense, two deletions and two splicing mutations. Eight polymorphic variants described in the NCBI were also found.

This study allowed the molecular confirmation of nine cases with carnitine transporter deficiency, three cases with carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency and one case with carnitine palmitoyltransferase 1 deficiency.

Molecular diagnosis will be available for future patients suspected of carnitine cycle diseases.

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AFLP	- <i>Acute fatty liver of pregnancy</i>
AG	- Ácidos gordos
ATP	- Adenosina trifosfato
C0	- Carnitina livre
C16	- Palmitoilcarnitina
C18	- Esteroilcarnitina
C18:1	- Oleoilcarnitina
C2	- Acetilcarnitina
CACT	- <i>Carnitine acilcarnitine translocase</i>
cDNA	- Ácido desoxirribonucleico complementar ao mRNA
CK	- Enzima creatina fosfoquinase
CoA	- Coenzima A
CPT1	- <i>Carnitine palmitoyltransferase 1</i>
CPT2	- <i>Carnitine palmitoyltransferase 2</i>
C-terminal	- Carboxilo-terminal
CUD	- <i>Carnitine uptake disease</i>
ddNTPs	- 2,3 dideoxiribonucleótidos
DHM	- Doença hereditária do metabolismo
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
dNTP	- Deoxiribonucleótido trifosfato
ESS	- <i>Exonic sequence silencer</i>
ESSE	- <i>Exonic sequence enhancer</i>
FADH2	- Flavina-adenina dinucleótido
GLUT	- Transportador de glucose
GTP	- Guanosina trifosfato
HGMD	- <i>Human Gene Mutation Database</i>
ISE	- <i>Intronic sequence enhancer</i>
ISS	- <i>Intronic sequence silencer</i>
K <sup>+</sup>	- Potássio

KDa	- kilo Dalton
Li <sup>+</sup>	- Lítio
m/z	- Massa/carga
MCT	- <i>Médium-chain triglycerides</i>
MgCl <sub>2</sub>	- Cloreto de magnésio
MIM	- <i>Mendelian Inheritance in Man</i>
min	- minuto
mRNA	- Ácido ribonucleico mensageiro
MS/MS	- <i>Tandem Mass</i>
Na <sup>+</sup>	- Sódio
NADH <sub>2</sub>	- Nicotinamida adenina dinucleótido
NCBI	- <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMD	- <i>Nonsense-mediated mRNA decay</i>
N-terminal	- Amino-terminal
OCTN2	- <i>Organic cation/carnitine transporter</i>
Pb	- Pares de bases
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	- potencial hidrogeniônico
r.p.m.	- Rotações por minuto
Rb <sup>+</sup>	- Rubídio
RNA	- Ácido ribonucleico
s	- segundo
TAE	- Tampão Tris-Acetato-EDTA
TMD	- <i>Transmembranar domain</i>
UTR	- <i>Untranslated terminal region</i>

# ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Doenças hereditárias do metabolismo (DHM)	3
1.2. Oxidação mitocondrial dos ácidos gordos	4
1.3. Fisiopatologia das doenças da oxidação dos ácidos gordos	5
1.4. Rastreio neonatal das DHM por espectrometria de massa em tandem	6
1.5. Ciclo da carnitina	7
1.6. Proteína transportadora de carnitina	8
1.7. Defeito do transportador de carnitina ( <i>CUD-Carnitine Uptake Defect</i> ): Caracterização clínica	10
1.7.1. Tratamento	11
1.7.2. Diagnóstico bioquímico	12
1.7.3. Diagnóstico molecular	12
1.8. O gene <i>SLC22A5</i>	13
1.8.1. Espectro mutacional	13
1.8.2. Correlação fenótipo / genótipo	14
1.9. O sistema carnitina palmitoiltransferase (CPT)	15
1.10. Proteínas CPT1 CPT2 e CACT	17
1.10.1. CPT1s – Carnitina Palmitoiltransferase 1	17
1.10.2. Proteína CPT2 – Carnitina Palmitoiltransferase 2	20
1.10.3. Proteína CACT - Carnitina Acilcarnitina Translocase	21
1.11. Deficiência em CPT1	22
1.12. Deficiência em CPT2	24
1.13. Deficiência em CACT	25
1.14. Tratamento das deficiências em CPT1A, CPT2 e CACT	26
1.15. Diagnóstico bioquímico	27
1.16. Diagnóstico molecular	28
1.17. Genes <i>CPT1A</i> , <i>CPT2</i> e <i>CACT (SLC25A20)</i>	29

1.18. Espectro mutacional -----	30
1.19. Correlação fenótipo / genótipo -----	31
1.20. Diagnóstico pré-natal -----	32
1.21. Objectivos -----	33
2. MATERIAL E MÉTODOS -----	37
2.1. Amostra -----	37
2.2. Material biológico -----	37
2.3. Método de selecção dos casos -----	38
2.4. Extracção de DNA de sangue total -----	39
2.5. Extracção de DNA a partir de sangue seco em papel de filtro -----	40
2.6. PCR de amplificação -----	41
2.7. Purificação dos produtos de PCR -----	44
2.8. Reacção de sequenciação. -----	44
2.9. Purificação dos produtos de sequenciação -----	45
2.10. Electroforese capilar -----	45
2.11. Bioinformática -----	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	49
3.1. Detecção de suspeitos por MS/MS -----	49
3.2. Estudo molecular -----	49
3.3. Mutações encontradas no gene <i>SLC22A5</i> -----	57
3.3.1. Mutações <i>missense</i> / <i>nonsense</i> -----	57
3.3.2. Mutações com alteração da grelha de leitura ( <i>frameshift</i> ) -----	61
3.3.3. Delecção de codão -----	63
3.3.4. Mutação <i>splicing</i> -----	64
3.4. Mutações encontradas no gene <i>CPT2</i> -----	65
3.4.1. Mutações <i>missense</i> -----	65
3.4.2. Delecção de Codões -----	68
3.4.3. Mutações com alteração da grelha de leitura ( <i>frameshift</i> ) -----	70
3.5. Mutação encontrada no gene <i>CPT1A</i> -----	72
3.6. Casos negativos -----	74

3.7. Correlação fenótipo / genótipo-----	75
4. CONCLUSÃO -----	79
5. PERSPECTIVAS FUTURAS-----	80
6. BIBLIOGRAFIA-----	83

## INDÍCE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> - Via mitocondrial da oxidação dos ácidos gordos-----	5
<b>Figura 1.2</b> - Representação esquemática do ciclo da carnitina -----	8
<b>Figura 1.3</b> - Proteína transportadora de carnitina OCTN2 -----	10
<b>Figura 1.4</b> - Mutações no transportador de carnitina OCTN2 -----	14
<b>Figura 1.5</b> - Sistema Carnitina Palmitoiltransferase-----	16
<b>Figura 1.6</b> - Modelo da topologia de membrana para a CPT1 -----	18
<b>Figura 1.7</b> - Dois locais para a ligação do malonil-CoA à CPT1A -----	20
<b>Figura 1.8</b> - Representação da estrutura da CPT2 de rato -----	21
<b>Figura 1.9</b> - Modelo da topologia de membrana para a CACT-----	22
<b>Figura 3.1</b> - Espectro de acilcarnitinas em <i>tandem mass</i> de um indivíduo normal (A) e de um perfil com suspeita de CUD-----	50
<b>Figura 3.2</b> - Espectro de acilcarnitinas em tandem mass de um perfil suspeito de deficiência em CPT2 -----	51
<b>Figura 3.3</b> - Espectro de acilcarnitinas em tandem mass de um perfil suspeito de deficiência em CPT1A -----	51
<b>Figura 3.4</b> - Mutação c.136C>T-----	57
<b>Figura 3.5</b> - Mutação c.695C>T-----	58
<b>Figura 3.6</b> - Mutação c.632A>G -----	59
<b>Figura 3.7</b> - Mutação c.844C>T-----	60
<b>Figura 3.8</b> - Mutação c.254_264dupGGCTCGCCACC -----	62
<b>Figura 3.9</b> - Mutação c.844delC -----	63
<b>Figura 3.10</b> - Mutação c.67_69delTTC -----	63
<b>Figura 3.11</b> - Mutação c.825-1G>C -----	65
<b>Figura 3.12</b> - Mutação c.359A>G-----	66
<b>Figura 3.13</b> - Mutação c.1412T>G -----	67

<b>Figura 3.14</b> - Representação parcial do alinhamento do gene <i>CPT2</i> e de outras espécies evidenciando a conservação do resíduo de fenilalanina na posição 471 -----	67
<b>Figura 3.15</b> - Resultado da análise feita através do <i>Poyphen</i> na previsão do efeito deletério da mutação F471C no gene <i>CPT2</i> -----	68
<b>Figura 3.16</b> - Mutação c.430_435delGAGTAT -----	69
<b>Figura 3.17</b> - Representação parcial do alinhamento do gene <i>CPT2</i> e de outras espécies evidenciando a conservação dos resíduos de ácido glutâmico e tirosina na posição 144 e 145 -----	69
<b>Figura 3.18</b> - Mutação c.725_726insA -----	70
<b>Figura 3.19</b> - Heredograma da família do caso 12-----	71
<b>Figura 3.20</b> - Mutação c.624_629insGC -----	72
<b>Figura 3.21</b> - Mutação c.1456-1458+1delGAGg -----	73

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 2.1</b> - Sequências dos <i>primers</i> para o gene <i>SLC22A5</i> e suas condições -----	42
<b>Tabela 2.2</b> - Sequências dos <i>primers</i> para o gene <i>CPT2</i> e suas condições de amplificação -----	42
<b>Tabela 2.3</b> - Sequências dos <i>primers</i> para o gene <i>CPT1A</i> e suas condições de amplificação -----	43
<b>Tabela 2.4</b> - Sequências dos <i>primers</i> para o gene <i>CACT</i> e suas condições de amplificação -----	43
<b>Tabela 2.5</b> - Condições do PCR de sequenciação -----	44
<b>Tabela 3.1</b> - Dados bioquímicos e moleculares dos casos estudados suspeitos de deficiência do transportador de carnitina – CUD-----	53
<b>Tabela 3.2</b> - Dados bioquímicos e moleculares dos casos estudados suspeitos de deficiência em CPT2/CACT-----	53
<b>Tabela 3.3</b> - Dados bioquímicos e moleculares do caso estudado suspeito de deficiência em CPT1A -----	54
<b>Tabela 3.4</b> - Mutações causais encontradas em 15 doentes estudados para os genes <i>SLC22A5</i> , <i>CPT2</i> e <i>CPT1A</i> -----	55
<b>Tabela 3.5</b> - Alterações polimórficas encontradas nos genes <i>SLC22A5</i> , <i>CPT2</i> e <i>CPT1A</i> -----	56

## INTRODUÇÃO

---



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Doenças hereditárias do metabolismo (DHM)

As doenças hereditárias do metabolismo (DHM) ou erros inatos do metabolismo são doenças genéticas individualmente raras mas no seu conjunto numerosas, estão associadas a mutações que afectam a síntese ou função de uma proteína enzimática, de transporte, ou mais raramente de uma proteína estrutural. É esta heterogeneidade genética que condiciona uma grande variabilidade de expressão clínica neste grupo de doenças, podendo envolver qualquer órgão ou tecido do organismo.

As DHM têm na sua maioria transmissão autossómica recessiva. A consanguinidade aumenta a probabilidade de herdar a doença, porque os pais podem ser portadores de uma rara mutação recessiva.

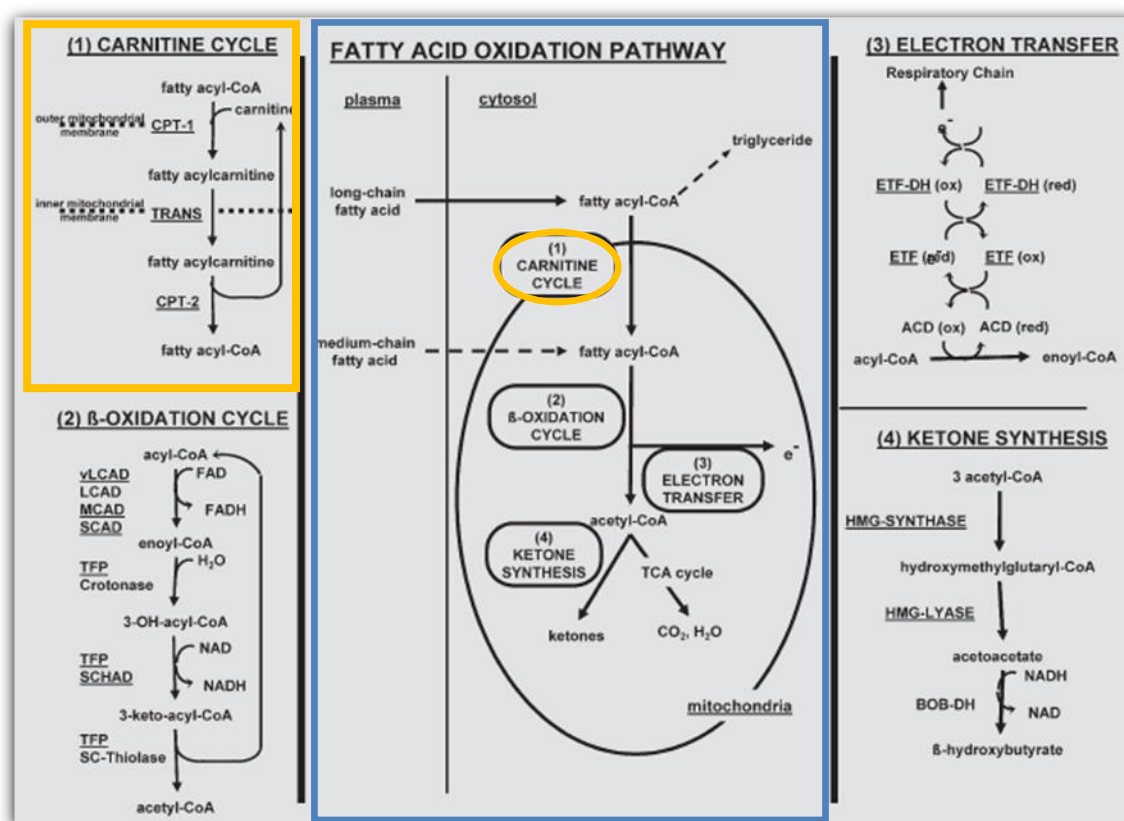
Sob o ponto de vista fisiopatológico podem considerar-se três grandes grupos (Fernandes *et al.* 2006): (i) as doenças que conduzem à intoxicação aguda ou progressiva, secundária à acumulação de compostos tóxicos a montante do bloqueio; este grupo de defeitos no metabolismo intermediário inclui as aminoacidopatias, a maior parte das acidúrias orgânicas, defeitos congénitos do ciclo da ureia, intolerância aos açúcares, intoxicação de metais e porfirias; os defeitos deste grupo não interferem com o desenvolvimento embrionário-fetal e apresentam um intervalo livre de sintomas entre o nascimento e os primeiros sinais clínicos de intoxicação que podem ser agudos ou crónicos; (ii) as doenças que afectam a síntese ou catabolismo de moléculas complexas, onde os sintomas são permanentes e progressivos e inclui entre outras, as doenças do lisossoma, do peroxissoma e da glicosilação das glicoproteínas; (iii) as doenças que envolvem o metabolismo energético e consistem em erros inatos do metabolismo intermediário em que os sintomas são devidos à deficiente produção ou utilização de energia dentro do fígado, miocárdio, músculo, cérebro e outros tecidos. Fazem parte deste grupo, as acidemias lácticas congénitas, as doenças da cadeia respiratória mitocondrial e os défices da oxidação dos ácidos gordos, glicogenoses, defeitos de gluconeogénese, hiperinsulinismo e doenças do

metabolismo da creatina. Algumas destas doenças podem interferir com o desenvolvimento embrionário-fetal e provocar dismorfias, displasias e malformações (Spronsen *et al.* 2005). A idade de apresentação clínica é variável entre o período neonatal e a infância, ou ainda mais tardia.

### **1.2. Oxidação mitocondrial dos ácidos gordos**

A oxidação mitocondrial dos ácidos gordos é predominantemente responsável pela oxidação dos ácidos gordos com 20 ou menos carbonos, enquanto a via peroxissomal é fisiologicamente mais relevante para os ácidos gordos de cadeia muito longa (Vockley and Whiteman 2002). Os ácidos gordos constituem a maior reserva de energia no corpo e têm um papel crucial na resposta fisiológica à depleção de energia nos tecidos em períodos de jejum, doença febril e aumento de actividade muscular através da  $\beta$ -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos (Eaton *et al.* 1996; Wanders *et al.* 1999; Rinaldo *et al.* 2002). Proporciona 80% da energia para órgãos como o coração, o fígado e músculo-esquelético especialmente durante o jejum quando as reservas de glicogénio nos tecidos ficam depletadas (Shekhawat *et al.* 2005). A via da  $\beta$ -oxidação também gera corpos cetónicos, 3-hidroxiabutirato e acetoacetato, que são usados por tecidos periféricos e pelo cérebro (Mitchell *et al.* 1995). Os ácidos gordos de cadeia longa são os preferidos pelo coração e servem como reserva essencial de energia no músculo-esquelético durante o exercício prolongado (Fernandes *et al.* 2006). Esta via metabólica é crítica para o recém-nascido, uma vez que este tem reservas limitadas de glicogénio e uma alta taxa metabólica, conducentes a uma rápida descompensação metabólica se houver algum defeito em qualquer das enzimas envolvidas neste processo (Sim *et al.* 2002). A oxidação dos ácidos gordos compreende quatro etapas: o ciclo da carnitina, o ciclo da  $\beta$ -oxidação, a via de transferência de electrões e a síntese de corpos cetónicos.

Este estudo abordou, dentro da oxidação mitocondrial dos ácidos gordos, as patologias associadas a defeitos nas proteínas do ciclo da carnitina, como está evidenciado na figura 1.1.



**Figura 1.1 – Via mitocondrial da oxidação dos ácidos gordos.** No centro do painel, a via está dividida nas suas quatro maiores componentes que estão em detalhe nos esquemas laterais. Os locais que identificam doenças estão sublinhados e com contorno amarelo está referido o ciclo que é objecto deste estudo. A entrada da carnitina na célula; CPT1: carnitina palmitoiltransferase 1; CPT2: carnitina palmitoiltransferase 2; TRANS: transportador carnitina acilcarnitina translocase. Adaptado de (Fernandes *et al.* 2006).

### 1.3. Fisiopatologia das doenças da oxidação dos ácidos gordos

Cerca de 25 enzimas e proteínas específicas de transporte são responsáveis pelos passos do metabolismo mitocondrial dos ácidos gordos. Defeitos em muitas delas provocam doença nos humanos. A clínica é provocada por um ou dois mecanismos básicos: intoxicação ou défice energético, que podem estar isolados ou combinados.

Como consequência do defeito da β-oxidação existem acumulações intracelulares de uma série de ácidos gordos e seus derivados. Os ésteres de acil-CoA acumulados dependem do tipo de bloqueio enzimático. Como há um défice de acetil-CoA, não é possível activação da gluconeogénese nem da ureogénese, também não há formação de corpos cetónicos, e

consequentemente há um défice energético que pode provocar hipoglicemia hipocetótica, acidemia láctica e hiperamonemia. A acumulação de acilcarnitinas de cadeia longa pode ter um efeito tóxico no sarcolema, interagindo com diferentes canais iónicos e provocar patologia cardíaca. O excesso das acilcarnitinas nos tecidos provoca disfunções ainda em outros órgãos (Quintana and Sanjurjo 2006).

Os pacientes com doenças da oxidação dos ácidos gordos geralmente apresentam sintomas quando a sua capacidade oxidativa está sobrecarregada durante alturas de jejum, stress ou exercício prolongado. Nas crianças, os sintomas também se desenvolvem durante a doença viral. Estas doenças tem significativa morbilidade e mortalidade se não forem diagnosticadas atempadamente porque algumas crianças morrem no primeiro episódio ou sofrem sequelas irreversíveis (Kompore and Rizzo 2008). Estudos iniciais sugerem que este grupo de doenças da oxidação dos ácidos gordos representa provavelmente o grupo mais frequente dos erros inatos do metabolismo e a sua associação com a morte súbita infantil (Sim *et al.* 2002).

### **1.4. Rastreio neonatal das DHM por espectrometria de massa em tandem**

A introdução da espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS) em 1990 nos laboratórios de *screening* metabólico (Garg and Dasouki 2006) veio permitir o diagnóstico que actualmente se faz em Portugal de 24 DHM através do Programa de Rastreio Neonatal, desde 2005.

Este rastreio é possível a partir da análise de uma única amostra de sangue colhido sobre papel de filtro, que permite a identificação e quantificação de metabolitos marcadores de doença (aminoácidos e acilcarnitinas) e razões entre determinados metabolitos (Zytkovicz *et al.* 2001; Chace *et al.* 2003; Schulze *et al.* 2003). A identificação das patologias por MS/MS baseia-se na utilização de marcadores primários e secundários, em que os primários estão obrigatoriamente elevados e os secundários estão frequentemente alterados. O seu aumento confirma a patologia, ajudando a excluir factores extrínsecos que alterem o marcador primário.

A utilização do *tandem mass*, tecnologia multianalítica no rastreio neonatal sistemático, permite que se lancem novos desafios à medicina preventiva e surjam novas questões no tratamento destas doenças (Vilarinho *et al.* 2006).

## 1.5. Ciclo da carnitina

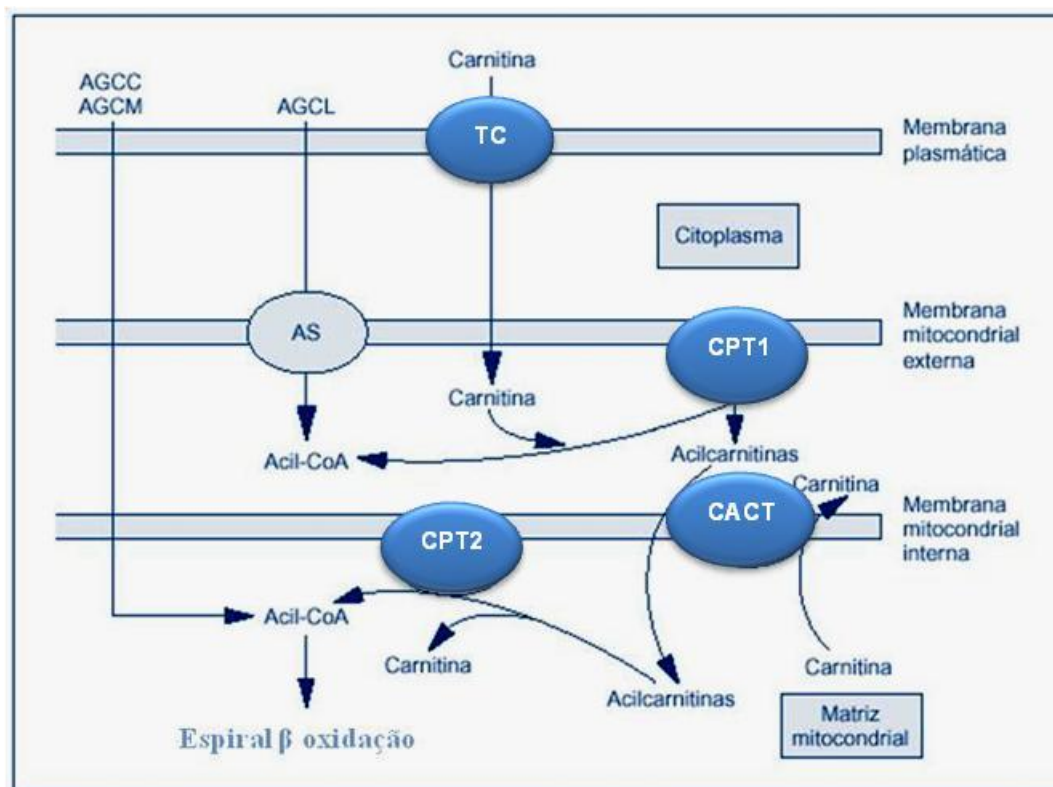
A carnitina (ácido 3-hidroxi-4-N-trimetilaminobutírico) é uma molécula hidrofílica que serve de cofactor essencial para a oxidação mitocondrial dos ácidos gordos, transferindo os ácidos gordos de cadeia longa como ésteres de acilcarnitinas, através da membrana interna mitocondrial (Lamhonwah and Tein 1998; Tamai *et al.* 1998).

Os adipócitos contêm a principal reserva energética do organismo sob a forma de triglicerídeos. A resposta fisiológica ao jejum está ligada à mediação endócrina da utilização da reserva de glicogénio hepático e muscular para manter a normoglicemia, mas quando há uma depleção na reserva de glicogénio os triglicerídeos são mobilizados através de lipases que os hidrolisam em ácidos gordos (AG) e glicerol. Os AG são transportados pelo sangue, ligados à albumina e utilizados principalmente pelo fígado e pelos músculos como fonte de energia. A sua degradação é feita no interior da mitocôndria. Os AG de cadeia longa (comprimentos de cadeia de átomos de carbono entre C14 a C20), para poderem passar para a matriz mitocondrial, necessitam de ser activados pela acil-CoA sintetase, presente na membrana externa mitocondrial no músculo-esquelético e nos microsomas no fígado, ou presente na membrana plasmática dos adipócitos (Sim *et al.* 2002) e convertem-se em acil-CoA ésteres.

Para serem transportados até à matriz mitocondrial precisam do ciclo da carnitina que compreende quatro etapas (Figura 1.2):

- A entrada da carnitina na célula através da proteína transportadora de carnitina (OCTN2).
- A conversão de ésteres acil-CoA de cadeia longa em acilcarnitinas através da acção da carnitina palmitoiltransferase I (CPT I) da membrana mitocondrial externa.
- O transporte das acilcarnitinas efectuado pela carnitina/acilcarnitina translocase (CACT) através da membrana interna mitocondrial, em troca de carnitina livre.
- Por último, a carnitina palmitoiltransferase II (CPT II) da membrana interna reesterifica as acilcarnitinas de cadeia longa nas suas correspondentes acil-CoAs.

No interior da mitocôndria inicia-se a espiral da  $\beta$ -oxidação, série cíclica de reacções, que remove electrões via  $FADH_2$  e  $NADH_2$  para a síntese de ATP e sequencialmente degrada os ácidos gordos em acetil-CoA convertidos em corpos cetónicos no fígado. Os AG de cadeia curta e média (C4 a C12) passam directamente a matriz mitocondrial sem precisarem do sistema de transporte da carnitina (Brivet *et al.* 1999).



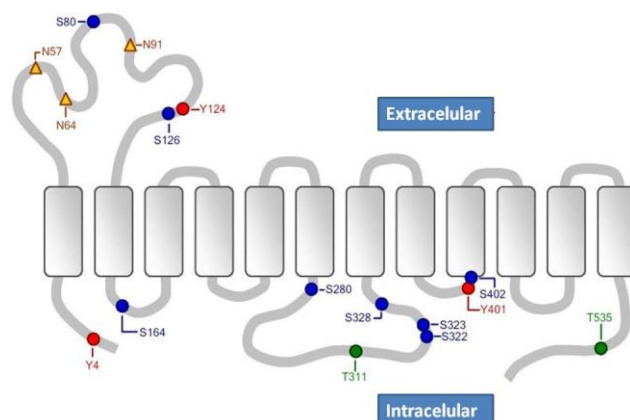
**Figura 1.2 – Representação esquemática do ciclo da carnitina.** TC-transportador de carnitina; CPT1-carnitina palmitoiltransferase 1; CACT-carnitina acilcarnitina translocase; CPT2-carnitina palmitoiltransferase 2; AGCC-ácidos gordos de cadeia curta; AGCM-ácidos gordos de cadeia média; AGCL-ácidos gordos de cadeia longa; AS-acilCoA sintetase, adaptada de (Quintana and Crespo 2001).

## 1.6. Proteína transportadora de carnitina

O transportador de carnitina, *organic cation transporter* (OCTN2) faz parte de uma família de proteínas transportadoras de solutos da membrana plasmática que incluiu transportadores multiespecíficos de catiões orgânicos, aniões e iões dipolares (Lamhonwah and Tein 1999). É um transportador de carnitina dependente de  $Na^+$ , essencial para o metabolismo dos ácidos gordos, que também transporta o catião orgânico tetraetilamónio

(TEA) de forma independente de  $\text{Na}^+$  (Ohashi *et al.* 2001). OCTN2 é o único transportador que é bifuncional, facilitando o transporte de catiões orgânicos pH dependentes e  $\text{Na}^+$  independentes, como também de iões dipolares  $\text{Na}^+$  dependentes (Tamai *et al.* 2000). O *uptake* de carnitina é dependente de um gradiente de  $\text{Na}^+$  e energia. Esta dependência do gradiente de sódio foi demonstrada por vários estudos efectuados em tecidos de rato, bem como em culturas de fibroblastos humanos (Tamai *et al.* 1998) e foi ainda testada a substituição extracelular de  $\text{Na}^+$  por outros iões, como  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$  ou  $\text{Rb}^+$  e foi verificada uma diminuição de capacidade de *uptake* da carnitina. A dependência de energia foi sugerida pela inibição significativa de *uptake* de carnitina em diferentes tecidos de rato, na presença de vários inibidores metabólicos da fosforilação oxidativa e em condições de anoxia. Finalmente, ainda foi documentado uma inibição consistente de *uptake* de carnitina na presença de agentes de ligação sulfídricos (Tein 2003).

O membro da família de transportadores de catiões orgânicos OCTN2 foi clonado a partir de uma linha celular de trofoblastos de placenta humana (Wu *et al.* 1998). As bases moleculares da sua multiespecificidade não são ainda conhecidas e não há ainda informação dos domínios envolvidos no reconhecimento da carnitina, catiões orgânicos ou sódio (Amat di San Filippo and Longo 2004). O cDNA (~3,2 Kb) codifica um polipeptídeo de 557 aminoácidos com 12 supostos domínios transmembranares (TMD). O amino-terminal (N-terminal) e o carboxilo-terminal (C-terminal) da proteína OCTN2 situam-se no lado citoplasmático da membrana (Wu *et al.* 1998). Contém um grande *loop* extracelular de 107 aminoácidos entre os dois primeiros domínios transmembranares, contendo três potenciais sítios de N-glicosilação (Lamhonwah *et al.* 2002). Tem ainda treze potenciais sítios de fosforilação. Estes incluem os dependentes da proteína cinase-C, dependentes da proteína cinase-A e da caseína cinase II que se situam no *loop* do domínio intracelular e no *loop* extracelular (Figura 1.3). A proteína contém um local de ligação ATP/GTP (GTEILGKS) no *loop* intracelular entre o quarto e o quinto domínio transmembranar (Wu *et al.* 1998) e uma sequência (motivo) sinal do transportador de glicose (GLUT). A massa provável da proteína é 63 KDa. Um trabalho sobre as possíveis funções destes domínios demonstrou que os TMD1-7 são responsáveis pelo transporte de catiões orgânicos e pelo transporte sódio-dependente de carnitina e indica o envolvimento do TMD11 para o reconhecimento do meio aniónico (Inano *et al.* 2004) .



**Figura 1.3 – Proteína transportadora de carnitina OCTN2** com os 12 supostos domínios transmembranares, sítios prováveis de fosforilação (círculos) e N-glicosilação (triângulos). Figura adaptada de (Rytting and Audus 2008).

### **1.7. Defeito do transportador de carnitina (*CUD-Carnitine Uptake Defect*): caracterização clínica**

O Defeito no transportador de carnitina da membrana plasmática (MIM#212140) representa a verdadeira deficiência primária de carnitina (Tamai *et al.* 2000). É uma deficiência hereditária de transmissão autossômica recessiva da oxidação dos ácidos gordos. O defeito é no transporte activo de carnitina através da membrana plasmática, devido a alterações no transportador de carnitina OCTN2 (Tein 2003; Longo *et al.* 2006).

O transportador expressa-se no músculo, coração e rins assim como em leucócitos e fibroblastos, não se expressando no fígado (Scriver *et al.* 2001).

Os pacientes apresentam deficiente reabsorção renal, reduzido nível de carnitina no soro, nos tecidos e diminuição do metabolismo dos ácidos gordos de cadeia longa (Vockley and Whiteman 2002). Consequentemente dá-se acumulação de lípidos nos tecidos. Em condições normais a concentração de carnitina nos tecidos diferentes do cérebro, é 20 a 50 vezes mais alta do que no plasma e paralelamente, a capacidade dos tecidos metabolizarem os ácidos gordos (Tein 2003). Como a carnitina não é significativamente degradada no organismo, o rim é capaz de ajustar as variações de carnitina na dieta. A deficiência de carnitina associada ao defeito do transportador tem duas componentes; a reabsorção renal está comprometida e origina concentrações extremamente baixas de carnitina no plasma;

por outro lado, os tecidos que têm este defeito são incapazes de concentrar carnitina. Daí se verificar que o aumento de concentração de carnitina intracelular é muito pequeno, quando a terapia de carnitina é instituída para aumentar as concentrações no plasma para os valores normais.

Os pacientes afectados podem apresentar uma sintomatologia predominantemente metabólica ou cardíaca. A apresentação metabólica é mais frequente a partir dos 2 anos de idade, havendo contudo casos descritos a partir do primeiro mês. A maioria dos casos tem hepatomegalia, hipoglicemia hipocetótica, hiperamonémia e alguns testes da função hepática variavelmente alterados, nomeadamente a creatina fosfoquinase (CK) ligeiramente elevada (Longo *et al.* 2006). A cardiomiopatia é mais frequente nos pacientes mais velhos (1-7 anos), associada por vezes à hipotonia. As diferentes apresentações clínicas podem aparecer na mesma família porque outros factores exógenos, tais como o stress do jejum, as infecções, a dieta pobre em carnitina ou o uso de drogas que induzam a deficiência de carnitina, podem provocar episódios agudos ou coma, antes de a cardiomiopatia estar totalmente desenvolvida. Vários pacientes são completamente assintomáticos até desenvolverem sinais de cardiomiopatia ou falha cardíaca que pode ser fatal, tendo sido já descritos na literatura casos de mortes súbitas (Brivet *et al.* 1999).

### **1.7.1. Tratamento**

O diagnóstico precoce e o tratamento com L-carnitina são essenciais para proteger estes doentes. A toma de L-carnitina faz reverter a patologia cardíaca, motora e a disfunção hepática, pondo fim a episódios de coma, restabelecendo o crescimento normal, apesar do soro e os tecidos manterem concentrações relativamente baixas de carnitina, devido à persistente perda de carnitina renal e ao defeito do transportador (Lamhonwah *et al.* 2002). Na ausência do *uptake* de alta afinidade para a carnitina, a concentração intracelular segue a concentração extracelular, ou seja dá-se difusão passiva. Em contraste com o músculo, a concentração de carnitina hepática subiu dramaticamente de 5% para 55% do normal num doente após suplementação oral, sugerindo que a depleção de carnitina no fígado é devida à baixa concentração de carnitina no soro (Tein 2003).

A dose de carnitina tem que ser adaptada individualmente a cada paciente através de séries de doseamentos do nível de carnitina no plasma. Embora tenha poucos efeitos secundários, a carnitina pode causar diarreia e desconforto intestinal quando ingerida em elevadas doses. Os doentes respondem à dieta com suplementação de carnitina, se a iniciarem antes de ocorrerem danos irreversíveis nos órgãos.

O metabolismo bacteriano no intestino pode resultar em degradação da carnitina com produção de trimetilamina, que embora não seja tóxico tem um cheiro muito desagradável, mas pode ser tratado com um antibiótico activo contra bactérias anaeróbicas. Episódios de hipoglicemia com arritmias ou morte súbita sem cardiomiopatia têm sido descritos em pacientes que deixam de tomar carnitina contra indicação médica (Longo *et al.* 2006).

### **1.7.2. Diagnóstico bioquímico**

O doseamento da concentração de carnitina plasmática revela níveis muito baixos (<10µmol/L) em contraste com o aumento de excreção urinária de carnitina. O perfil de acilcarnitinas revela ainda uma diminuição de acilcarnitinas de cadeia longa, C16 (Palmitoilcarnitina) e C18 (Estearoilcarnitina).

A determinação da velocidade de *uptake* da carnitina em cultura de fibroblastos ou linfoblastos, é normalmente utilizada para a confirmação enzimática do diagnóstico de CUD. Os resultados são cerca de 10% dos controlos em doentes e muitas vezes 40% dos controlos nos pais (Brivet *et al.* 1999), o que sugere que estes portadores têm um número reduzido de transportadores de carnitina a funcionar normalmente. A concentração de carnitina no plasma dos portadores pode ser normal ou medianamente reduzida, o que reflecte provavelmente algum comprometimento da reabsorção renal (Tein 2003).

### **1.7.3. Diagnóstico molecular**

Após a identificação do cDNA do transportador humano de alta afinidade para a carnitina OCTN2 por Wu *et al.*, 1998 foi possível identificar mais de seis dezenas de mutações no gene *SLC22A5*. Este estudo molecular, para além de confirmar o diagnóstico de CUD,

permite a intervenção rápida do tratamento, contribuindo para uma redução da morbilidade e da mortalidade nesta doença letal e facilita o conselho genético nas famílias atingidas, permitindo ainda identificar familiares doentes que ainda sejam assintomáticos.

Por outro lado, o estudo molecular vai permitindo saber cada vez mais que tipo de impacto originam as mutações neste transportador, nas suas características funcionais através de estudos mutagénicos que elucidem a sua estrutura crítica (os locais chave funcionais), ou seja, o local de ligação da carnitina, o canal de sódio e os sítios de ligação de sulfídricos.

O esclarecimento dos defeitos funcionais, associados às mutações individuais pode fomentar mais abordagens ao desenvolvimento da terapêutica segmentada para melhorar o fornecimento de carnitina às células.

## **1.8. O gene *SLC22A5***

A pesquisa no *Genebank* indica que o gene humano *SLC22A5* (MIM:603377) (30 Kb) codifica o transportador OCTN2 e foi sequenciado na sua totalidade como parte do *Human Genome Project*. O gene consiste em 10 exões e 9 intrões e foi localizado no cromossoma humano 5q31 (Shoji *et al.* 1998). A análise em múltiplos tecidos humanos permitiu concluir que é fortemente expresso no rim, músculo-esquelético, coração e placenta. Estudos de hibridização *in situ* no rato demonstraram que o mRNA do OCTN2 é expresso nas células dos túbulos proximal, distal e dos glomérulos no rim, no miocárdio, na lâmina fibrosa das válvulas do coração, na zona labiríntica da placenta e nas vilosidades ramificadas da lacuna e no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo no cérebro (Wu *et al.* 1999).

### **1.8.1. Espectro mutacional**

Estão já descritas 65 mutações moleculares, nomeadamente deleções, inserções, mutações de *splicing*, mutações *missense* e *nonsense*. Neste gene existe uma área de aumento de susceptibilidade para mutações no exão 5 de acordo com o número de alelos mutantes descritos nos codões R282 e W283. Estes dois resíduos, arginina (282) e triptofano (283)

são altamente conservados. A distribuição da maioria das mutações descritas neste transportador, (Figura 1.4) permite-nos concluir que a maioria delas forma um grupo à volta do *loop* intracelular, entre o domínio transmembranar 10 e 11, que é codificado pelo exão 8 do gene *SLC22A5*. Muitas mutações *missense* estão localizadas nos domínios transmembranares, que se sabe terem um papel chave no reconhecimento do substrato (Amat di San Filippo *et al.* 2003). A maioria das mutações *missense* descritas afecta preferencialmente a parte intracelular em vez dos *loops* extracelulares.

É possível que estas variações nos domínios extracelulares tenham um significado funcional limitado, e assim o fenótipo produzido pelas mutações extracelulares não seja tão grave. Também é possível que os *loops* intracelulares sejam menos tolerantes às substituições e mais facilmente comprometam a actividade do transporte, quando substituídos (Amat di San Filippo *et al.* 2006).

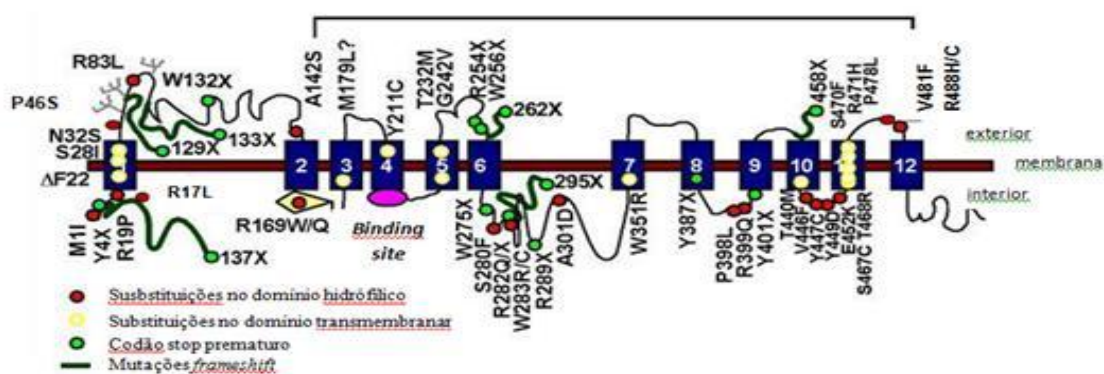


Figura 1.4 – Mutações no transportador de carnitina OCTN2. Modelo adaptado (Amat di San Filippo *et al.* 2006).

### 1.8.2. Correlação fenótipo / genótipo

Diferentes apresentações clínicas podem ocorrer na mesma família. Stanley *et al.* descreveram uma família em que um doente manifestou uma hipoglicemia na primeira infância, enquanto o seu irmão só apresentou uma cardiomiopatia aos sete anos (Stanley *et al.* 1991). Uma outra família foi descrita com homozigotia para R471H, em três

indivíduos, pai e dois filhos, em que um aparece sintomático com *Reye-syndrome-like*, quadro de hepatopatia e encefalopatia na infância, enquanto os outros estavam assintomáticos, com 28 e 5 anos (Spiekerkoetter *et al.* 2003). Dadas as variações clínicas fenotípicas na mesma família, parece haver outros factores exógenos relativos ao *stress* do jejum, infecções, dieta deficiente em carnitina, ou o uso de medicamentos que induzem a deficiência em carnitina, como o ácido pivalico ou o ácido valproico (Lamhonwah *et al.* 2002).

Há uma correlação entre a actividade residual do transporte de carnitina nos fibroblastos e a severidade das mutações, com as mutações *nonsense* associadas à ausência de actividade do transporte de carnitina. Contudo, não há correlação entre o genótipo e o fenótipo clínico (Wang *et al.* 2000; Longo *et al.* 2006).

Os pais heterozigóticos das crianças afectadas podem ter os níveis de carnitina plasmática baixos. Há indicações em que o estado de heterozigotia pode estar associado a um decréscimo de *uptake* da carnitina, aumento de perdas urinárias de carnitina e cardiomiopatia moderada ou de aparecimento tardio (Koizumi *et al.* 1999). Deste modo, a perda parcial da função do OCTN2 pode produzir sintomas de insuficiência de carnitina.

Vem sendo descrito na literatura que estes heterozigóticos com manifestações clínicas podem ter uma explicação que se prende com o conceito de heterozigóticos sinérgicos, em que a heterozigotia de um alelo com função reduzida de um gene, pode produzir um fenótipo severo no contexto de heterozigotia para uma mutação noutra gene, na mesma via (Lahjouji *et al.* 2002; Urban *et al.* 2006). Este fenómeno já foi descrito para mutações em OCTN2 e para outros genes envolvidos no metabolismo dos ácidos gordos.

A análise do impacto das mutações nas características funcionais do transportador de carnitina permitirá elucidar cada vez mais a relação estrutura-função da proteína OCTN2, relativamente aos seus locais funcionais.

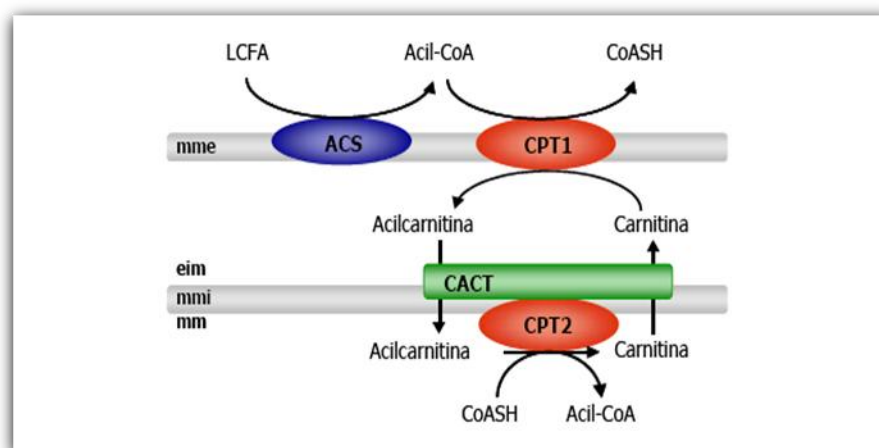
## **1.9. O sistema carnitina palmitoiltransferase (CPT)**

Os ácidos gordos de cadeia longa, não entram na mitocôndria por simples difusão. Após a sua activação através da acil-CoA sintetase na membrana externa da mitocôndria (Jlst *et al.*

1998), os acil-CoAs gordos de cadeia longa são importados para a matriz mitocondrial através do sistema da carnitina palmitoiltransferase (EC 2.3.1.21). Este complexo enzimático é feito por duas proteínas distintas, a carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1) e 2 (CPT2) (McGarry and Brown 1997). A CPT1 na membrana externa mitocondrial, que catalisa a formação de acilcarnitina a partir da carnitina e da acil-CoA e a CPT2 que catalisa a formação de acil-CoA a partir da acilcarnitina e CoA. Para além destas, a proteína carnitina acilcarnitina translocase (CACT) transporta as acilcarnitinas de cadeia longa através da membrana mitocondrial interna por troca da carnitina livre (Figura 1.5).

O sistema CPT há muito tempo tem sido visto como a via principal de transporte de ácidos gordos de cadeia longa-CoA através das membranas mitocondriais. O complexo CPT é composto também pela regulação da enzima CPT1, que controla a regulação da oxidação dos ácidos gordos. No fígado, a CPT1 controla o fluxo de ácidos gordos através das vias de esterificação e oxidação, devido à sua sensibilidade ao malonil-CoA, que é um potente inibidor da CPT1.

Em situação de jejum, o nível de malonil-CoA diminui, permitindo que a CPT1 funcione e consequentemente a oxidação dos ácidos gordos e a cetogénese. No período pós prandial a concentração de malonil-CoA aumenta, a CPT1 é inibida e os ácidos gordos de cadeia longa recém-formados são direccionados para a esterificação (Bonfont *et al.* 1999).



**Figura 1.5 – Sistema Carnitina Palmitoiltransferase.** Abreviaturas: mme: membrana mitocondrial externa; eim: espaço intermembranar; mmi: membrana mitocondrial interna; mm: matriz mitocondrial; CPT1-carnitina palmitoiltransferase 1; CPT-2-carnitina palmitoiltransferase 2; CACT-carnitina acilcarnitina translocase; ACS-acil CoA sintetase. Adaptado de (McGarry and Brown 1997).

A CPT1 é um elemento importante para a manutenção da homeostase da energia no coração e no músculo-esquelético. Tem ainda um papel importante na regulação de secreção de insulina nas células  $\beta$  pancreáticas (Chen *et al.* 1994), e alguns inibidores de CPT1 parecem ser usados como potenciais agentes antidiabéticos (Giannessi *et al.* 2001). Parece estar envolvida noutras funções metabólicas como a síntese dos complexos lipídicos nas células pulmonares (Arduini *et al.* 2001). A regulação da CPT1 pelo malonil-CoA e pelos ácidos gordos de cadeia longa é a maior propriedade da CPT1 e confere-lhe a capacidade de indicar à célula a disponibilidade para usar carboidratos ou lípidos como combustíveis (woldegiorgis *et al.* 2005).

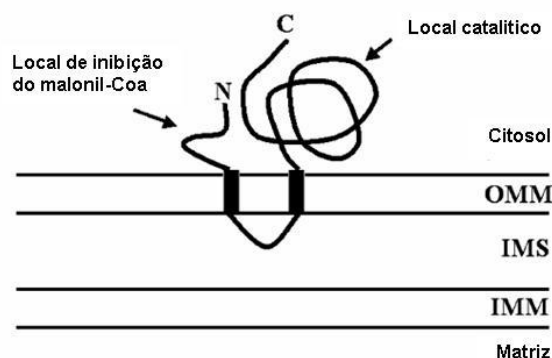
## 1.10. Proteínas CPT1 CPT2 e CACT

### 1.10.1. CPT1s – Carnitina Palmitoiltransferase 1

A CPT1 catalisa a formação de acilcarnitinas de cadeia longa a partir de acil-CoA gordos de cadeia longa e carnitina livre. Os tecidos dos mamíferos expressam três isoformas; hepática (L-CPT1 ou CPT1A), muscular (M-CPT1 ou CPT1B) que tem 62% da sequência de aminoácidos idêntica e a isoforma cerebral (CPT1C) que é 54% idêntica à L e a M-CPT1 (Bonfont *et al.* 2004). A L-CPT1 é a isoforma predominante expressa em grande variedade de tecidos, incluindo fígado, pâncreas, rim, pulmão, baço, intestino, ovário, cérebro e fibroblastos humanos (McGarry and Brown 1997), enquanto a forma M-CPT1 é predominante no músculo-esquelético, coração, tecido adiposo branco e castanho e também no testículo (Esser *et al.* 1996). Comparada com a M-CPT1, a L-CPT1 tem mais afinidade para a carnitina mas é menos sensível à inibição do malonil-CoA (Kerner and Hoppel 2005). Todas as isoformas CPT1 são expressas no cérebro sendo a expressão da L-CPT1 maior que a M-CPT1 e a CPT1C em todas as regiões do cérebro. A CPT1C só se expressa no cérebro e no testículo, e a M-CPT1 expressa-se no cerebelo (woldegiorgis *et al.* 2005). O papel da CPT1C no transporte dos ácidos gordos de cadeia longa não é claro, pois ainda não foi demonstrado que tenha actividade catalítica, embora tenha sido descrita afinidade para ligação à malonil-CoA. É uma proteína que está envolvida no controlo do apetite e na regulação do ritmo diurno (Zammit 2008).

Britton *et al.*, 1995 isolaram o L-cDNA humano a partir de fígado humano e concluíram que a sequência da proteína contém 773 resíduos de aminoácidos (88kDa). O cDNA da isoforma M-CPT1 foi identificado em 1995 por Yamazaki *et al.*, 1995, codifica uma proteína de 772 resíduos de aminoácidos (88kDa) (Yamazaki *et al.* 1995). A isoforma da CPT1C foi identificada por Price *et al.*, 2002 e codifica uma proteína de 798 resíduos de aminoácidos (Price *et al.* 2002) com peso molecular similar ao da CPT1A. As CPT1A e CPT1C são comparáveis porque adoptam a mesma topologia na membrana com dois segmentos transmembranares e os segmentos C- e N-terminal expostos para o lado citosólico da membrana mitocondrial externa (Figura 1.6).

As L-CPT1 e M-CPT1 são proteínas integrantes membranares localizadas na membrana externa mitocondrial com duas  $\alpha$ -hélices que transpõem a membrana e 125 resíduos de aminoácidos em N-terminal. Um modelo corrente da topologia da CPT1 pressupõe os domínios N- e C-terminal, cruciais para a actividade e sensibilidade ao malonil-CoA no lado citosólico da membrana externa mitocondrial (van der Leij *et al.* 2000; woldegiorgis *et al.* 2005).

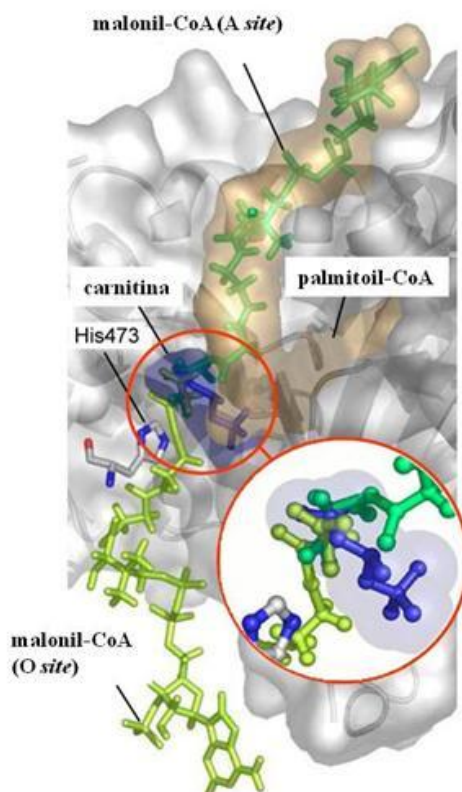


**Figura 1.6 – Modelo da topologia de membrana para a CPT1**, adaptada a partir de Woldegiorgis, 2005. OMM: membrana externa mitocondrial; IMS: espaço intermembranar; IMM: membrana interna mitocondrial.

A maior parte da proteína L-CPT1 é orientada em direcção ao lado citosólico da membrana externa mitocondrial, cerca de 46 resíduos de aminoácidos do domínio N-terminal e cerca de 650 resíduos de aminoácidos do domínio catalítico C-terminal. Estão ligados por dois segmentos transmembranares (TM-1 e TM-2), TM-1 inclui os resíduos 52-75 e TM2 102-

126, domínios hidrofóbicos, unidos por um pequeno *loop* curvo de 27 resíduos de aminoácidos que mergulham no espaço intermembranar mitocondrial (Saggerson 2008).

Foi postulado que há dois sítios de ligação malonil-CoA, um deles “CoA site” ou “A site” está envolvido nas interações entre os domínios terminais N- e C-terminal. O outro oposto a “CoA site” ou “O site” está no lado oposto da enzima, no canal catalítico. Estes dois sítios partilham o mesmo local de ligação á carnitina (Lopez-Vinas *et al.* 2007). A interação estrutural entre ambos os domínios é crítica para a sensibilidade da enzima à inibição do malonil-CoA no “A site” (Figura 1.7). Embora o domínio N-terminal não contenha o sítio de ligação ao malonil-CoA contém ambos os determinantes positivos (resíduos 1-18) e negativo (resíduos 19-30) de sensibilidade ao malonil-CoA e é essencial para manter a integridade do sítio de ligação de alta afinidade ao malonil-CoA. Estudos de interligações químicas demonstraram que a dessensibilização induzida química ou fisiologicamente é devida a alterações na interação entre os domínios N- e C-terminal (Borthwick *et al.* 2006; Saggerson 2008). A informação requerida para a enzima atingir o alvo específico, membrana externa mitocondrial, está situada no domínio N-terminal, imediatamente depois do segundo fragmento transmembranar (posições 123-147 da CPT1 de rato) (Cohen *et al.* 1998). Seguidamente a proteína interage com a maquinaria de importação na membrana mitocondrial externa e parece que é a TM2 que actua com a sequência de “paragem” da transferência que faz ancorar a CPT1 à mitocôndria (Cohen *et al.* 2001). Um modelo estrutural foi proposto baseado no cristal da acetiltransferase (Morillas *et al.* 2004).



**Figura 1.7 – Dois locais para a ligação do malonil-CoA à CPT1A.** Indicada a posição do resíduo catalítico His473. Adaptado de (Lopez-Vinas *et al.* 2007)

### 1.10.2. Proteína CPT2 – Carnitina Palmitoiltransferase 2

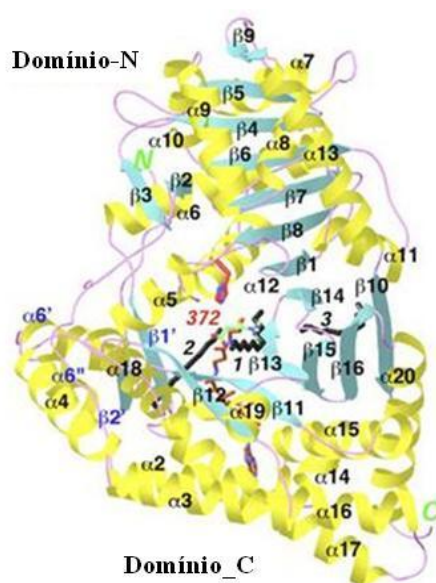
A proteína CPT2 cataliza a formação de acil-CoA a partir da acilcarnitina e CoA. O cDNA humano da CTP2 foi isolado por Finocchiaro *et al.*, em 1991. A sequência de cDNA codifica para uma proteína de 658 aminoácidos, contendo uma sequência condutora de 25 aminoácidos no domínio N-terminal que é clivada na importação mitocondrial para produzir uma proteína madura com peso molecular de aproximadamente 71 kDa (McGarry and Brown 1997). CPT2 é cataliticamente activa, insensível ao malonil-CoA, enzima “distinta”, porque o cDNA do fígado de rato que codifica a CPT2 sintetiza uma proteína activa quando expressa em *E. Coli* e em outras células de acordo com a literatura (Woldegiorgis *et al.* 2000; woldegiorgis *et al.* 2005).

A estrutura cristalina da carnitina palmitoiltransferase 2 do rato foi determinada em 2006 (Figura 1.8). A CPT2 contém uma única inserção de 30 resíduos no domínio-N (resíduos

176-206). Este segmento contém duas hélices ( $\alpha 6'$  e  $\alpha 6''$ ) ligadas por uma pequena  $\beta$ -estrutura anti-paralela ( $\beta 1'$  e  $\beta 2'$ ), que vão ter um papel importante na associação da CPT2 com a membrana interna mitocondrial (Ramsay *et al.* 2001). Foram observadas três cadeias alifáticas na estrutura, duas das quais localizadas nos locais de ligação da carnitina e da CoA. A terceira cadeia alifática simula o grupo acil de cadeia longa no substrato da CPT2 (Hsiao *et al.* 2006).

O local activo da CPT2 está localizado no centro da enzima, túnel em forma de Y na interface dos domínios, e os substratos carnitina e CoA ligam-se a locais opostos do resíduo catalítico de His372 (Rufer *et al.* 2006) (Figura 1.8). Expressa-se em vários tecidos entre os quais, músculo, fígado, fibroblastos e leucócitos.

CPT1 e CPT2 diferem no que diz respeito à tensão da associação às suas membranas e à sua sensibilidade aos detergentes (Woeltje *et al.* 1987). Também diferem nos alvos subcelulares e a na sensibilidade ao malonil-CoA.



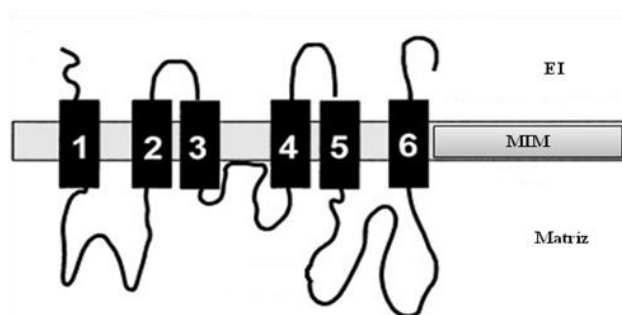
**Figura 1.8 – Representação da estrutura da CPT2 de rato.** O resíduo catalítico de His372 está representado a vermelho. Adaptado de Hsiao *et al.* 2006.

### 1.10.3. Proteína CACT - Carnitina Acilcarnitina Translocase

CACT é um transportador que catalisa a troca “um por um” entre carnitina e as diferentes espécies de acilcarnitinas na membrana interna mitocondrial. É muito sensível à inibição por reagentes -SH (Rubio-Gozalbo *et al.* 2004). O cDNA da CACT humano foi clonado

por Huizing *et al.*, 1997. A sequência de aminoácidos revelou três repetições homólogas de cerca de 100 aminoácidos de comprimento e a sequência motivo característica da família de proteínas transportadoras. Foi proposto que cada uma das três sequências-motivo repetidas na sequência da CACT tenha sido dobrada em duas  $\alpha$ -hélices formando uma estrutura no total com seis  $\alpha$ -hélices (Iacobazzi *et al.* 1998). As duas hélices dos elementos individuais estão ligadas por um extenso *loop* hidrofílico exterior à bicamada lipídica, considerando que as três repetições estão ligadas por trechos curtos de aminoácidos hidrofílicos (Figura 1.9) (Iacobazzi *et al.* 1998).

O N- e o C-terminal estão expostos para o espaço intermembranar (Costa *et al.* 2003). O transportador maduro foi modificado em N-terminal sugerindo modificação pós-translacional do transportador (Indiveri *et al.* 1997). Estudos cinéticos sugerem que esta proteína transportadora tem uma ampla variedade de substratos desde carnitina livre até acilcarnitinas de cadeia longa. O que contrasta com a especificidade conhecida das carnitina aciltransferases mitocondriais e implica que, para além do seu papel, na oxidação mitocondrial o mesmo transportador está igualmente empenhado noutras funções. Está envolvida no transporte membranar de grupos acil de cadeias de tamanhos diferentes (Sigauke *et al.* 2003). Assim poderá ser explicada a severidade da doença CACT face a outras doenças da oxidação mitocondrial dos ácidos gordos (Kerner and Hoppel 2000).



**Figura 1.9 – Modelo da topologia de membrana para a CACT**, adaptada a partir de Iacobazzi, 2004. EI: espaço intermembranar; MIM: membrana interna mitocondrial.

### 1.11. Deficiência em CPT1

A deficiência em carnitina palmitoiltransferase 1 (MIM#255120) é uma doença da oxidação dos ácidos gordos de cadeia longa. A consequência metabólica pode ser uma diminuição de acilcarnitinas de cadeia longa nos tecidos e um aumento no citoplasma da

concentração em acil-CoA de cadeia longa. Por sua vez os ésteres de acil-CoA de cadeia longa são potentes inibidores da adenina nucleotideo translocase e podem inibir a fosforilação oxidativa, tornando-se num défice energético generalizado. A alternativa metabólica é a incorporação destes nos triglicerídeos deixando depósitos lipídicos nos tecidos afectados (Kerner and Hoppel 1998). Como no caso do defeito do transportador de carnitina os compostos acumulados de acil-CoA de cadeia longa, passam ao metabolismo intermédio produzindo intermediários de cadeia média que são totalmente oxidados pela mitocôndria (Scriver *et al.* 2001). Como a CPT1 se expressa em tecidos específicos de acordo com as diferentes isoformas, a expressão fenotípica da deficiência em CPT1 depende se, é a isoforma do músculo ou do fígado que está afectada. Só a deficiência da forma hepática (CPT1A) foi demonstrada em humanos (Longo *et al.* 2006).

A apresentação clínica da CPT1A em crianças tem sido descrita como idêntica a episódios *Reye-like*, com hipoglicemia hipocetótica. A primeira manifestação da doença está associada ao jejum, doença viral ou hepatomegalia com ou sem falência aguda hepática usualmente sem miopatia ou cardiomiopatia e quando não tratada é fatal (Bonfont *et al.* 2004). A ausência do envolvimento miopático e cardiomiopático é o reflexo bioquímico do defeito enzimático estar presente só no fígado e nos fibroblastos e não no músculo. Como a capacidade de oxidação hepática dos ácidos gordos está comprometida, dá origem à hipocetonemia (Kerner and Hoppel 1998). Episódios recorrentes são frequentes antes dos 5 anos de idade e geralmente o tratamento é bem sucedido pela terapia sintomática. Um outro quadro clínico que foi descrito, consiste numa falência hepática aguda em grávidas (*AFLP- acute fatty liver of pregnancy*) portadoras de um feto deficiente em CPT1A (Innes *et al.* 2000).

Não há casos publicados de apresentação muscular. A explicação para o caso poderia ser que pelo facto de a perda de actividade CPT1B não ser compatível com a vida, dada a importância desta enzima para a função cardíaca. Se a condição no entanto existir, pode ser esperado um fenótipo clínico associado a cardiomiopatia e miopatia lipídica periférica em recém-nascidos, crianças ou possivelmente em adultos (Bonfont *et al.* 2004). Como para a CPT1B a deficiência em CPT1C não se encontra descrita na literatura.

## 1.12. Deficiência em CPT2

A deficiência em CPT2 tem um espectro variável de sintomas e gravidade. Devido ao déficit em CPT2 as acilcarnitinas de cadeia longa não podem ser convertidas nas suas correspondentes acil-CoA, acumulando-se na matriz mitocondrial. Estas acilcarnitinas podem ser transportadas para fora da mitocôndria (revelando-se níveis elevados no plasma), produzindo-se a via metabólica alternativa da  $\beta$ -oxidação peroxissomal com produção de intermediários de cadeia média, os quais por sua vez vão ser posteriormente oxidados por completo na mitocôndria sem requerer o ciclo da carnitina. Por este motivo não está presente uma acidúria dicarboxilica.

Há três formas clínicas distintas da deficiência em CPT2, a forma adulta (MIM#255110), a infantil (MIM#600649) e a neonatal (MIM#608836).

A mais comum é a forma muscular adulta, entre os seis e os 20 anos, descrita pela primeira vez em 1973 (Di Mauro and Di Mauro 1973). A maioria dos doentes são do sexo masculino (~80%), embora a doença seja herdada de forma autossômica recessiva (Bonfont *et al.* 2004). Os pacientes apresentam geralmente na idade adulta episódios recorrentes de mialgias, mioglobinúria e fraqueza muscular em situações de exercício prolongado, bem como jejum, infecções, stress emocional ou exposição ao frio. Entre os episódios os níveis de creatina fosfoquinase (CK) são normais (Scriver *et al.* 2001). Falência renal ou até mesmo paragem cardíaca pode ocorrer, e entre os episódios, os pacientes são assintomáticos (Kompare and Rizzo 2008).

A apresentação infantil, hepatocardiomuscular, é potencialmente fatal e nos poucos doentes descritos a razão sexual era cerca de 1. A idade de início é entre os 6 meses e os 2 anos, na maioria das vezes antes de um ano com recorrentes episódios de hipoglicemia hipocetótica levando ao coma e convulsões e hepatomegalia transitória. Envolvimento cardíaco está presente em várias crianças com cardiomiopatia e arritmias. Estes episódios podem ser desencadeados por infecções, febre ou jejum.

A forma mais severa apresenta-se no período neonatal e é rapidamente fatal. Nos casos descritos muitos tiveram morte súbita no primeiro mês de vida. Em alguns casos o início

da doença ocorre no período pré-natal em alguns casos devido à presença de malformações detectadas após o parto, nomeadamente, características dismórficas, displasia cística renal e defeitos na migração neuronal. Apresentam hipoglicemia não cetótica, acidose metabólica, convulsões, arritmias, nefromegalia, hepatomegalia e cardiomegalia (Kerner and Hoppel 1998; Bonnefont *et al.* 2004; Kompare and Rizzo 2008).

Tem-se especulado acerca das diferentes apresentações clínicas de CPT2 que diferem na idade de início dos sintomas e o padrão de expressão nos tecidos que permanece inexplicável. Questiona-se se a gravidade da doença pode estar relacionada com o impacto do defeito enzimático na oxidação dos ácidos gordos de cadeia longa num determinado tecido (Ilsinger *et al.* 2008). Esta hipótese implicaria adicionalmente que o nível de actividade residual de CPT2 suficiente para a oxidação dos ácidos gordos de cadeia longa variasse entre os tecidos (Thuillier *et al.* 2003). Outros propuseram que a CPT2 pode formar uma associação física com os componentes que distam da maquinaria da  $\beta$ -oxidação de modo que mutações em diferentes locais da proteína possam resultar na variável eficiência do sistema global (Taroni *et al.* 1993).

### **1.13. Deficiência em CACT**

A deficiência em CACT (MIM#212138) resulta num transporte defeituoso intramitocondrial de acilcarnitinas formadas pela CPT1 e conduz à acumulação de acilcarnitinas de cadeia longa fora da matriz mitocondrial. Parte das acilcarnitinas são provavelmente degradadas nos peroxissomas. Esta doença está associada a uma severa deficiência em carnitina secundária e supõe-se que a acumulação de acilcarnitinas inibe o transportador de carnitina da membrana plasmática, o que vai provocar a redução de carnitina renal ao limiar e défice de carnitina nos tecidos (Rubio-Gozalbo *et al.* 2004).

É uma das mais severas doenças da oxidação dos ácidos gordos. A doença herda-se de forma autossómica recessiva com início muito precoce e letal, no período perinatal e no período infantil precoce de vida. Muitos doentes mostraram envolvimento multiorgânico, fígado, coração e músculo-esquelético. Os sintomas são às vezes desencadeados pelo jejum ou pela ingestão de gordura e incluem hiperamonemia, hipoglicemia hipocetótica e

hipocarnitinemia, convulsões, cardiomiopatia, arritmia cardíaca e apneia (Kerner and Hoppel 1998; al Aqeel *et al.* 1999; Kompare and Rizzo 2008). Esta deficiência em CACT afecta não só a oxidação mitocondrial dos ácidos gordos, como prejudica severamente o metabolismo mitocondrial em geral como resultado da sua função tampão acil-CoA. Isto pode explicar a severidade e a natureza letal desta doença. Contudo estão descritos casos mais tardios com fenótipos menos graves sem sintomas cardíacos (Scriver *et al.* 2001), mas onde foi encontrada uma actividade residual elevada o que pode explicar a condição mais benigna.

### **1.14. Tratamento das deficiências em CPT1A, CPT2 e CACT**

Na deficiência em CPT1, os compostos de acil-CoA de cadeia longa acumulados sofrem um metabolismo alternativo produzindo intermediários de cadeia média que são totalmente oxidados pela mitocôndria. Este mecanismo serve de fundamentação para o tratamento dos doentes com dietas contendo *MCT* (*medium-chain triglycerides*) (Scriver *et al.* 2001). O tratamento inclui também frequentes refeições para evitar o jejum, disponibilizar glucose suficiente para prevenir a lipólise do tecido adiposo e restrição de gorduras de cadeia longa. Durante o período neonatal e nos episódios agudos metabólicos, nas deficiências de CPT1A e na forma severa de CPT2 por vezes é necessário a administração de glucose intravenosa para prevenir a hipoglicémia. Na forma muscular de CPT2 a terapia preventiva de episódio de rabdomiólise baseia-se em efectuar refeições ricas em carboidratos antes e durante o exercício prolongado. A deficiência em CACT responde também à terapia com uma dieta com baixa gordura suplementada com triglicérideos de cadeia média e prevenção de jejum (Iacobazzi *et al.* 2004; Iacobazzi *et al.* 2004; Rubio-Gozalbo *et al.* 2004; Pierre *et al.* 2007). O uso de determinadas drogas tais como, diazepam, ibuprofeno e ácido valproico (comum no tratamento pediátrico de convulsões), está contra-indicado na CPT2 pois pode desencadear rabdomiólise.

A terapia com carnitina na deficiência em CPT2 e em CACT é controversa, primeiro não é claro se a deficiência secundária em carnitina tem uma influência negativa em vias carnitina-dependentes e se deve ser complementada. Segundo, esta deficiência em carnitina

pode ser benéfica porque pode realmente limitar a entrada de ácidos gordos na mitocôndria, posteriormente limitando a produção de substâncias tóxicas intermédias. Além disso a sua utilização resultaria num aumento de acumulação de acilcarnitinas de cadeia longa que são tóxicas (Rubio-Gozalbo *et al.* 2004).

Uma estratégia de tratamento para a forma muscular da deficiência em CPT2 poderá passar pelo uso de fibratos, que provou melhorar a oxidação dos ácidos gordos em fibroblastos de pacientes (Djouadi *et al.* 2006).

### 1.15. Diagnóstico bioquímico

Os níveis de carnitina plasmática nos doentes com deficiência em CPT1A e CPT2 são muito diferentes. A concentração da carnitina total plasmática pode ser normal ou até elevada nos doentes com deficiência em CPT1A (Sim *et al.* 2001), enquanto na generalidade, os doentes com deficiência em CPT2 apresentam valores baixos de carnitina livre plasmática combinada com a diminuição de carnitina total plasmática, embora normalmente na forma muscular não apresentem níveis de carnitina plasmáticos alterados. A carnitina livre (C0) em doentes com deficiência em CACT encontra-se muito diminuída. São ainda observados valores altos de amónia na CPT1 e na CACT e CK na CPT2 e CACT em alturas de crise metabólica.

Na análise por espectrometria de massa em tandem (MS/MS) o perfil de acilcarnitinas sanguíneo na deficiência em CPT1A revela uma diminuição de acilcarnitinas de cadeia longa, especialmente palmitoilcarnitina (C16) e esteroilcarnitina (C18). A avaliação da razão C0/C16+C18 é suficientemente sensível para definir valores de *cutoff* e fiável para diagnosticar a deficiência em CPT1 (Fingerhut *et al.* 2001; Tsuburaya *et al.* 2009). Esta razão está elevada devido à diminuição de acilcarnitinas de cadeia longa que se verifica nestes pacientes ao nascimento.

No caso da deficiência em CPT2 um proeminente pico de C16 caracteriza as amostras destes doentes (Albers *et al.* 2001), a razão C0/C16+C18, está nestes doentes diminuída e a razão (C16+C18:1)/C2 (C2-acetilcarnitina, C18:1-oleoilcarnitina) está aumentada (Gempel *et al.* 2002). O perfil de acilcarnitinas de doentes com deficiência em CACT não se consegue distinguir dos perfis de doentes com deficiência em CPT2.

Os ácidos orgânicos das amostras dos doentes com deficiência em CPT1 podem revelar níveis baixos de corpos cetónicos, acidúria dicarboxílica com proeminente elevação de C12 (ácido dodecanodióico) e presença do ácido 3-hidroxiglutarico (Korman *et al.* 2005).

Na deficiência em CACT os ácidos orgânicos podem revelar uma acidúria dicarboxílica severa (Longo *et al.* 2006). Embora se os doentes estiverem em condições de normoglicémia, os ácidos orgânicos urinários possam estar normais, mas o perfil de acilcarnitinas continua anormal, e que o torna bastante informativo em termos de diagnóstico.

A oxidação dos ácidos gordos de cadeia longa está reduzida para 5-25% dos valores de controlo em linfócitos e fibroblastos nos doentes com a forma infantil de ambos os defeitos de CPT, embora este método não distinga os doentes com deficiência em CPT1 dos com deficiência em CPT2. O desenvolvimento de técnicas analíticas permitiu medir a acumulação de intermediários da  $\beta$ -oxidação que pode ser detectada em células (fibroblastos) incubadas com ácidos gordos de cadeia longa marcados (Brivet *et al.* 1999). Esta técnica permite demonstrar a acumulação de grande quantidade de palmitoil-CoA nas células deficientes em CPT1 ou palmitoilcarnitina nas células deficientes em CPT2. A determinação da actividade enzimática em células com deficiência em CACT pode ser efectuada através da medição intramitocondrial de acetilcarnitina formada, em fibroblastos (Rubio-Gozalbo *et al.* 2004).

### **1.16. Diagnóstico molecular**

Neste estudo investigam-se os genes *CPT1A*, *CPT2* e *CACT* (*SLC25A20*) que codificam a carnitina palmitoiltransferase 1 isoforma hepática, a carnitina palmitoiltransferase 2 e a carnitina acilcarnitina transferase, respectivamente. Apresenta-se os seus espectros mutacionais e as técnicas envolvidas no estudo molecular das deficiências em *CPT1A*, *CPT2* e *CACT*, e de que forma elas podem reflectir o fenótipo destes doentes.

A contribuição deste estudo permite o diagnóstico diferencial, a detecção de portadores nas famílias, diagnóstico pré-natal e oferece a possibilidade de confirmar os resultados do *screening* no período pré sintomático.

### 1.17. Genes *CPT1A*, *CPT2* e *CACT* (*SLC25A20*)

Os genes *CPT1A*, *CPT2* e *SLC25A20* foram localizados nos cromossomas humanos 11q13.1-q13.2, 1p32 e 3p21.31 respectivamente. O cDNA do gene humano *CPT1A* (MIM:600528) contém 2319 pb (Britton *et al.* 1995) e é constituído por 19 exões (exão 1 não é transcrito) alinhados de 62 a 195 pb de dimensão, com 18 intrões (Gobin *et al.* 2002). O cDNA do gene humano *CPT2* (MIM:600650) tem 1974 pb (Finocchiaro *et al.* 1991), é composto por 5 exões com dimensões que vão entre 81 pb a 1305 pb, separados por quatro intrões (Verderio *et al.* 1995).

O cDNA do gene humano *CACT* (*SLC25A20*; MIM212138) foi sequenciado por (Huizing *et al.* 1997), é composto por 9 exões e 8 intrões.

A expressão dos genes *CPT* está sujeita à dieta e à regulação hormonal (Louet *et al.* 2001) em tecidos com altas taxas de utilização de ácidos gordos como o músculo cardíaco e o fígado. No fígado adulto, a capacidade de oxidação dos ácidos gordos mitocondrial é principalmente regulada a nível da expressão do gene *CPT1* em resposta a diversos estímulos fisiológicos ou patológicos, tais como jejum, gorduras alimentares entre outros que aumentam o mRNA da *CPT1* e a sua actividade, enquanto a *CPT2* não é marcadamente afectada (McGarry and Brown 1997).

*CPT1A* é a isoforma primária no fígado, rim, pulmão, baço, intestino, pâncreas, ovários e cérebro. Análises em tecidos de doentes com deficiência em *CPT1* demonstraram que *CPT1A* humano é expresso no fígado linfócitos e fibroblastos, enquanto expressão da *CPT2* já demonstra ser uma enzima obíqua (Bonfont *et al.* 2004). Estudos por *Northern blot* revelaram diferentes níveis de expressões do gene *CACT* em vários tecidos humanos com altos níveis de transcritos de mRNA de *CACT* no coração, músculo-esquelético e fígado e níveis muito mais baixos no cérebro, placenta, rim, pâncreas e pulmão (Huizing *et al.* 1997).

## 1.18. Espectro mutacional

### CPT1

A primeira mutação no gene humano *CPT1A* foi identificada em 1998 (Jlst *et al.* 1998). Um estudo efectuado em doentes de uma comunidade Hutterite (Canadianos e Americanos) revelou vários doentes com a mutação G710D em homozigotia. Esta população tem uma frequência elevada de portadores. Estes doentes apresentam um haplótipo comum no cromossoma 11q13, o que sugere um efeito fundador (Prasad *et al.* 2001).

Até à data foram publicadas 29 mutações, a maior parte tem sido privadas e ao longo de toda a sequência, com excepção de alguns grupos como o exemplo atrás referido, e a sua maior parte está na região catalítica. 22 delas são mutações pontuais, das quais 6 são mutações *nonsense* [Y32X (exão 2), Q100X (exão 4), R160X (exão 5), W475X (exão 12), Y498X (exão 13), Y579X (exão 14)], sendo as restantes mutações *missense* [R123C, A275T, C304W, R314I, R316G, F343V, R357W, E360G, A414V, D454G, G465W, P479L, L484P, Y498C, G709E, G710E] e uma mutação *splicing* [1876-1G>A]. Quatro mutações são pequenas deleções no códon 315, 394, 532, e 675. Uma grande deleção englobando o intrão 14 até ao exão 17 e ainda uma grande inserção de 113 pb na junção exão 13-exão 14.

### CPT2

Até à data foram caracterizadas 71 mutações em doentes com a forma adulta, infantil e neonatal. Na forma adulta há duas mutações que são consideradas comuns neste subgrupo S113L, 60% de frequência alélica em Europeus (Taroni *et al.* 1993) e P50H, com frequência 6.5% (Verderio *et al.* 1995). Enquanto algumas mutações são recorrentes como por exemplo Q413fs, F448L, Y628S, R631C, as restantes são mutações privadas. As mutações estão distribuídas ao longo de toda a sequência do gene. Além da mutação prevalente S113L (exão 3), os exões 4 e 5 são *hot spots* de mutações. 50 das 71 mutações são *missense/nonsense*, 3 mutações *splicing*, 13 pequenas deleções, 4 pequenas inserções e uma mutação complexa (inserção mais deleção). Três polimorfismos foram também descritos V368I, M647V e F352C, que por si só não causam doença, mas parecem

contribuir para uma redução adicional na actividade da enzima quando combinados com mutações em *CPT2* (Taroni *et al.* 1992; Vladutiu *et al.* 2000; Olpin *et al.* 2003). O polimorfismo F352C não foi encontrado na população caucasóide, parecendo estar unicamente presente na população Japonesa (Wataya *et al.* 1998).

## CACT

Desde a primeira mutação descrita neste gene em 1997 (Huizing *et al.* 1997), foram ainda só descritas 27 mutações. 11 mutações são pontuais (9 *missense* e 2 *nonsense*), 4 mutações *splicing*, 6 pequenas deleções, duas pequenas inserções, uma mutação complexa (inserção mais deleção) e ainda três grandes deleções. Todas as mutações foram identificadas em doentes severamente afectados à excepção de uma, que foi descrita num doente com fenótipo suave (c.893insC) (Huizing *et al.* 1997).

### 1.19. Correlação fenótipo / genótipo

Não há evidência para a relação entre a localização das mutações no gene *CPT1A* e a actividade residual da enzima. A homogeneidade da apresentação clínica em todos os doentes com deficiência em *CPT1A* sugere que nem a natureza nem a localização das mutações são preditivas da gravidade da doença, excepto para a P479L, que foi demonstrado resultar numa doença de início tardio, caracterizada por uma lesão muscular proximal (Gobin *et al.* 2002; Bennett *et al.* 2004; Greenberg *et al.* 2009). Em estudos de expressão funcionais *in vitro* de algumas mutações *missense* foi demonstrado que correspondem a duas categorias, dependendo sobre se elas afectam directamente (determinante funcional) ou indirectamente o sítio activo da enzima (determinante estrutural) (Gobin *et al.* 2003).

É de salientar que a marcada heterogeneidade genética gera, de facto, uma certa homogeneidade fenotípica.

Relativamente às relações entre os genótipos e os fenótipos clínicos, as mutações encontradas no gene *CPT2* podem ser divididas em três subtipos de genotipagem, que consistem em mutações associadas só com fenótipo adulto (1), só com o fenótipo infantil (2) ou com ambas as formas da doença (3).

No subtipo 1 cinco mutações *mild*, P50H, S113L, R161W, E174K e I502T foram referidas no estado homozigótico em doentes com a forma adulta da doença (Thuillier *et al.* 2003). Mutações severas foram descritas em homozigotia associadas ao subtipo 2, R151Q, P227L, D328G, R382K, F383Y, K413fs, R503C e Y628S (Thuillier *et al.* 2003; Spiegel *et al.* 2007; Isackson *et al.* 2008). Estas mutações quando se apresentam em heterozigotia composta, nunca estão associadas com a mutação S113L ou P50H no outro alelo. Poderá concluir-se que estas duas mutações parecem ter um efeito protector contra a ocorrência de um fenótipo severo infantil (Bonfont *et al.* 2004). No subtipo 3 as mutações encontradas em heterozigotia composta com S113L ou P50H resultam constantemente em fenótipo *mild*, quando associadas a outras mutações resultam em fenótipo severo como no subtipo 2 (Taggart *et al.* 1999; Thuillier *et al.* 2000; Deschauer *et al.* 2005).

Foi demonstrado que só a mutação R631C poderia causar doença severa ou moderada, quando presente em estado homozigótico, sugerindo que pelo menos neste caso específico, um factor adicional está envolvido no fenótipo da doença (Thuillier *et al.* 2003; Musumeci *et al.* 2007). Apresentação antenatal foi descrita em dois doentes com CPT2, que demonstraram no 5º mês de gravidez calcificações periventriculares e rins policísticos (Elpeleg *et al.* 2001). Embora seja uma doença autossómica recessiva, foram conhecidos casos de portadores sintomáticos. A incorporação de uma mutação nonsense na estrutura tetramérica do complexo CPT2 pode alterar a dobragem da proteína, formação dissulfídica ou a polimerização das subunidades e daí resultar um efeito dominante negativo (Orngreen *et al.* 2005).

Não se encontrou ainda uma correlação clara entre o fenótipo clínico e o défice enzimático nos doentes com deficiência em CACT (Iacobazzi *et al.* 2004).

### **1.20. Diagnóstico pré-natal**

O diagnóstico pré-natal das doenças da oxidação dos ácidos gordos é possível uma vez que as enzimas da oxidação mitocondrial dos ácidos gordos são expressas em biópsias das vilosidades coriônicas, fibroblastos e amniócitos. A combinação das análises enzimáticas e

moleculares, se o defeito molecular estiver estabelecido, tem sido utilizada com sucesso para prevenir gravidezes afectadas.

### **1.21. Objectivos**

O Programa Nacional de Diagnóstico Precoce criou a possibilidade de, no período neonatal, serem diagnosticadas patologias raras, antes de estas manifestarem sintomatologia clínica, evitando a sua morbilidade e mortalidade.

A finalidade deste trabalho foi:

- (i) A identificação de doentes com defeitos de transporte e do ciclo de carnitina, por espectrometria de massa.
- (ii) Implementação dos estudos dos genes que permitiram a sua caracterização molecular, a fim de poder assegurar um diagnóstico rápido e fundamental para o tratamento das crianças rastreadas, no período assintomático.
- (iii) Comparação dos doentes portugueses com os descritos na literatura
- (iiii) Disponibilização deste estudo para a caracterização molecular de doentes com diagnóstico clínico, ou bioquímico deste tipo de patologias.



## MATERIAL E MÉTODOS

---



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Amostra

Este estudo incidiu sobre 15 casos, onze dos quais provenientes do rastreio neonatal efectuado no Laboratório de Rastreio Neonatal realizado em todos os recém-nascidos no País. Estes casos foram considerados suspeitos ao longo de uma avaliação de cerca de 400.000 recém-nascidos rastreados.

Dentro dos onze casos atrás referidos, um deles foi um caso materno a partir dos resultados encontrados no rastreio neonatal do recém-nascido.

Três casos estudados eram doentes com diagnóstico clínico de defeito no transportador de carnitina: Dois destes casos estudados foram enviados por centros de referência estrangeiros, um pelo Hospital *Sant Joan de Déu* – Barcelona e um outro pelo *Department of Pediatrics-University Hospital* – Bélgica. O outro caso apresentava uma cardiomiopatia. Um caso com diagnóstico clínico de deficiência de carnitina palmitoiltransferase 2.

Todo o estudo foi realizado após consentimento informado. Foram também estudados 30 familiares dos casos índice.

A amostra seleccionada do rastreio neonatal surgiu a partir da avaliação do perfil de acilcarnitinas. Foram encontrados onze casos suspeitos de terem uma das patologias seguintes: CUD-deficiência do transportador de carnitina; CPT1D-deficiência de carnitina palmitoiltransferase 1; CPT2D-deficiência de carnitina palmitoiltransferase 1/ CACTD-deficiência de carnitina-acilcarnitina translocase.

### 2.2. Material biológico

Para a análise do rastreio neonatal foi utilizado sangue periférico colhido por picada no pé, entre o 3º e 6º dia de vida, para uma ficha com papel de filtro adequado (*Shleicher and Schuell 903, S&S*). Também para o doseamento das acilcarnitinas nos casos com sintomatologia foi utilizado o mesmo tipo de colheita sanguínea. A análise molecular foi

efectuada em DNA genómico extraído deste mesmo sangue. Relativamente ao estudo molecular em familiares e doentes suspeitos, foi utilizado sangue periférico para a extracção de DNA genómico. A determinação da actividade enzimática residual foi feita em fibroblastos de quatro pacientes, porém estes estudos foram solicitados a centros de referência, uma vez que não são disponibilizados ainda em Portugal.

### 2.3. Método de selecção dos casos

A detecção de casos foi efectuada por análise em espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS) no API 2000 da *Applied Biosystems – MDS Sciex* que permite a detecção conjunta das patologias em estudo. A espectrometria de massa é uma metodologia que permite a partir de uma só amostra, identificar diferentes metabolitos de acilcarnitinas e aminoácidos com base no seu padrão de fragmentação. Um MS/MS é formado por uma fonte de ionização, para ionizar as substâncias, por vários quadrupolos colocados em série e por um detector. Cada quadrupolo é constituído por 4 eléctrodos de secção hiperbólica onde é aplicado um campo eléctrico constante e um campo eléctrico alternado. Dentro deste a estabilidade da trajectória de um ião submetido a estes campos eléctricos vai depender da sua massa e da sua carga. Também é possível separar diferentes iões de uma complexa mistura em função da sua razão massa/carga ( $m/z$ ) (Cheillan *et al.* 2004). O primeiro quadrupolo (Q1) isola o ião a partir da mistura complexa que vai dar origem à molécula de interesse. Esse ião seleccionado é fragmentado dentro de uma câmara de colisão (Q2) para dar os iões produzidos e os fragmentos neutros característicos da substância de interesse. Por fim o terceiro quadrupolo (Q3) analisa os iões produzidos. Os dados são recolhidos por um detector e convertidos em espectros de massa.

Segue-se a descrição da preparação da amostra. Cada disco de 3.2 mm de sangue impregnado em papel de filtro, foi cortado para uma placa de microtitulação de 96 poços em propileno. O processo de extracção foi feito através da adicção a cada disco de 100  $\mu$ L de metanol durante 30 minutos sob agitação lenta, onde se encontravam diluídos os padrões internos deuterados utilizados para a quantificação das acilcarnitinas. Os padrões deuterados utilizados e as respectivas concentrações foram as seguintes: [ $^2\text{H}_9$ ]-carnitina (C0)

a 0.76nmol/mL; [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-acetilcarnitina (C2) a 0.19 nmol/mL; [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-propionilcarnitina (C3), [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-butirilcarnitina (C4), [<sup>2</sup>H<sub>9</sub>]-isovalerilcarnitina (C5), [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-octanoilcarnitina (C8) e [<sup>2</sup>H<sub>9</sub>]-miristoilcarnitina (C14) a 0.04 nmol/mL; [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-palmitoilcarnitina (C16) a 0.08nmol/mL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.).

No final dos 30 minutos de extracção, o extracto foi transferido para uma nova placa e seco sob uma suave corrente de azoto e ligeiro aquecimento. Posteriormente procedeu-se à derivatização das amostras por adição de 60 µL de 3N HCL/butanol e incubação de 15 minutos a 70°C. Após a derivatização, o butanol clorídrico foi evaporado a 60°C sob uma corrente de azoto. Por fim adicionaram-se 100 µL de fase móvel composta por acetonitrilo/água/ácido fórmico (50:50:0.025) e selou-se a placa com papel de estanho de forma a evitar a evaporação. Após a injeção das amostras a aquisição de dados foi efectuada pelo programa *Analyst* v1.4 (*AppliedBiosystems – Sciex*), sendo a posterior integração e quantificação dos dados efectuada pelo programa *ChemoView* v1.2 (*AppliedBiosystems – Sciex*). E por fim todos os valores exportados para uma base de dados – NeoScreen. A avaliação dos resultados foi feita com base nos “*cut-off*” utilizados para os marcadores primários e secundários inicialmente definidos com base na bibliografia (Zytkovicz *et al.* 2001; Chace *et al.* 2003; Schulze *et al.* 2003) e actualizados de acordo com a revisão bibliográfica.

#### **2.4. Extracção de DNA de sangue total (QIAmpBlood Mini Kit - Qiagen®)**

A enzima *Qiagen Protease* fez a lise das membranas celulares, utilizando um sistema de membranas de sílica que absorvem o DNA, permitindo assim isolá-lo dos restantes componentes citoplasmáticos e/ou nucleares intracelulares, também presentes na amostra. As concentrações salinas das soluções utilizadas ao longo de todo o processo e o respectivo pH fazem com que as proteínas, assim como outros contaminantes não fiquem retidos nas membranas *Qiagen*.

## Procedimento

1. Pipetaram-se 20 µl de *QIAGEN Protease* para um *ependorf* de 1,5 ml.
2. Adicionou-se 200 µl da amostra ao *ependorf* (sangue total).
3. Agitou-se no vortex.
4. Adicionou-se 200 µl de *Buffer AL*. Agitou-se no vortex durante 15 segundos.
5. Incubou-se a 56°C durante 10 minutos, tapando os tubos com parafilme.
6. Centrifugou-se brevemente o *ependorf* para remover as gotículas da tampa.
7. Adicionou-se 200 µl de etanol (96-100%) e agitou-se no vortex durante 15 segundos. Centrifugou-se brevemente.
8. Aplicou-se a mistura cuidadosamente na *QIAmp Spin Column*, tendo cuidado para não molhar a tampa (aproximadamente 500 µl). Centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 minuto. Colocou-se a *QIAmp Spin Column* num tubo colector limpo e rejeitou-se o tubo contendo o filtrado.
9. Abriu-se cuidadosamente a coluna e adicionou-se 500 µl de *Buffer AW1*. Centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 minuto. Colocou-se a coluna num tubo colector limpo e rejeitou-se o tubo contendo o filtrado.
10. Adicionaram-se à coluna 500 µl de *Buffer AW2*. Centrifugou-se a 14000 rpm durante 3 minutos.
11. Colocou-se a coluna num *ependorf* de 1,5 ml e rejeitou-se o tubo contendo o filtrado.
12. Adicionou-se 100 µl de *Buffer AL*. Incubou-se à temperatura ambiente durante 1 minuto e centrifugou-se a 8000 rpm por 1 minuto.

### **2.5. Extração de DNA a partir de sangue seco em papel de filtro (*GENERATION® Capture Card Kit- Gentra Systems*)**

#### **Preparação:**

1. Ajustou-se uma placa de aquecimento ou um termociclador a 50 °C.
2. Cortaram-se discos com 3mm de diâmetro, da amostra de sangue em papel, e colocaram-se em placas de 96 poços.

### **Purificação de DNA:**

1. Adicionou-se 200 µl de Solução de purificação de DNA (Solução 1) ao tubo com o disco e incubou-se durante 15 minutos a 50 °C.
2. Pipetou-se a solução para cima e para baixo uma vez e descartou-se.
3. Repetiu-se o passo 1 e 2 uma vez para um total de duas lavagens com a solução de purificação de DNA.
4. Ajustou-se a placa de aquecimento ou termociclador para 60 °C.
5. Adicionaram-se 200 µl de Solução de eluição de DNA (Solução 2) aos discos e incubou-se durante 15 minutos a 60 °C.
6. Pipetou-se a solução para cima e para baixo uma vez, depois removeu-se o máximo de solução possível. O DNA purificado ficou no disco.

### **Eluição do DNA:**

1. Ajustou-se a placa de aquecimento ou termociclador para 99 °C.
2. Adicionou-se 50 µl de Solução de eluição de DNA (Solução 2) às placas de 96 que contem os discos purificados. Cobriu-se a placa com uma membrana adesiva (e.g., Gentra's Capture Heat Seals) antes do aquecimento.
3. Incubou-se durante 15 minutos a 99°C, para que o DNA fosse libertado.
4. Pipetou-se a solução 15 vezes para cima e para baixo para misturar e depois transferiu-se o DNA eluído para tubos.
5. Armazenou-se o DNA a – 20 °C.

A determinação e concentração e pureza do DNA foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 *UV-Vis Spectrophotometer*. (a razão Abs260/Abs280 deverá ser 1.8).

## **2.6. PCR de amplificação**

Na amplificação de todos os genes estudados, exões e junção exão-intrão, foi utilizada 6.25 µl de *ImmoMix Red (Bioline-Biocompare®)*, à qual foi adicionada 0.125 µl de cada *primer* (50 pmol/µl), 0.5 µl de gDNA e água para um volume final de 12.5 µl. Submeteu-se a mistura final aos ciclos de temperaturas indicadas nas tabelas 2.1, 2.2, 2.3 e 2.4 em termociclador *BioRad*.

**Tabela 2.1 - Sequências dos primers para o gene *SLC22A5* e suas condições de amplificação.** Todos os primers têm uma cauda de sequenciação M13-Forward e M13-Back. pb: pares de bases.

Exão	Sequência dos primers (5' para 3')	Tamanho (pb)	Temperatura de annealing	nº de ciclos
1a	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTGTCTTGGGTCGCCTGCTG B-CAGGAAAACAGCTATGACCCGAGAAGTTGGCGATGGTG	396	60°C	35
1b	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTAACCACACTGTCCCACTGC B-CAGGAAAACAGCTATGACCTCCATCGCTAGGGTGTGAC	343	60°C	
2	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTCATTTTCCAGGATGCCTTTG B-CAGGAAAACAGCTATGACCCACACGCTTCTTCCTCAGTG	237	60°C	
3	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTTCTTGAGAAAAGCCCCACTTG B-CAGGAAAACAGCTATGACCTAGGTGATGGGATGATGGTG	299	60°C	
4	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTAAGGAAGGAACCCAAATTA AAC B-CAGGAAAACAGCTATGACCTTGTGTGCTGCCCTCTAGTGA	300	55°C	
5	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTTACCTGGTCTGTGGGTCTGC B-CAGGAAAACAGCTATGACCTGCTCTCAAATCACGGTCAG	246	60°C	
6	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTGCTAAGATGCCAGGGATTCA B-CAGGAAAACAGCTATGACCCGCCACTTCAAGAAGCTTTG	245	55°C	
7	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTACAGGTTGGGAAAAGATGTGG B-CAGGAAAACAGCTATGACCTTGAGACAGCTGGTAGACAG	342	60°C	
8	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTTTTTGCTCTCAATAGCTGCAT B-CAGGAAAACAGCTATGACCTACTTCCATCCCGTTGCTCT	298	60°C	
9	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTCCAGAGTCTGGGAGCATAA B-CAGGAAAACAGCTATGACCTCCATGGTGTCTGTGAGAGG	333	55°C	
10	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTGGAGACTGGGAGGCATCTTT B-CAGGAAAACAGCTATGACCACTCGGAGTCTGCACAAGC	225	60°C	

**Tabela 2.2 - Sequências dos primers para o gene *CPT2* e suas condições de amplificação.** Todos os primers têm uma cauda de sequenciação M13-Forward e M13-Back. pb: pares de bases

Exão	Sequência dos primers (5' para 3')	Tamanho (pb)	Temperatura de annealing	nº de ciclos
1	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTACTCCAGA ACTCCCCACTTG B-CAGGAAAACAGCTATGACCCGGGTTCACTAGAGGAGTCA	297	60°C	35
2	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTCGCTTCTGATTATTGGTTTTGG B-CAGGAAAACAGCTATGACCACTACTTGGCAGCCTGT	269	60°C	
3	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTAGTTCCTCGCCATGAACCTA B-CAGGAAAACAGCTATGACCTTCATTATGGAGGGCTCTGG	233	60°C	
4a	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTCTCTGGAGGTTGATGCCATT B-CAGGAAAACAGCTATGACCTGGCCTTGTATCAGTGAA	497	60°C	
4b	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTCCCCTGGATATGTCCCAGTA B-CAGGAAAACAGCTATGACCCCATCCTTGGCGATAATGAG	461	60°C	
4c	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTCCCATTAAGGACCTTGTCCA B-CAGGAAAACAGCTATGACCCGACAGTGCTACAGGACTCGT	486	60°C	
4d	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTTGACTGCGTCCAGTTTCAG B-CAGGAAAACAGCTATGACCAACCAAGCACTGAGGACAAG	370	60°C	
5	F-TGTA AAAACGACGGCCAGTTGAGGTCCTTTCCATCCTG B-CAGGAAAACAGCTATGACCTGGGATTACAGGCATGAGC	468	62°C	

**Tabela 2.3 - Sequências dos primers para o gene *CPT1A* e suas condições de amplificação.** Todos os primers têm uma cauda de sequenciação M13-Forward e M13-Back. pb: pares de bases

Exão	Sequência dos primers (5' para 3')	Tamanho (pb)	Temperatura de annealing	nº de ciclos
2	F-TGTA AACGACGGCCAGTTCTGTAAAGTGCGGAGGAAGA B-CAGGAAACAGCTATGACCACCTCAATAGCAGCCAGAGC	345	55°C	35
3	F-TGTA AACGACGGCCAGTGCTGTCCACACCCTCTTCTC B-CAGGAAACAGCTATGACC GAAACAGCATCAGGAGCTTCA	386	60°C	
4	F-TGTA AACGACGGCCAGTGTCACCGGTGGTGTGGT B-CAGGAAACAGCTATGACC TTCTTCCAAAGCCAAACT	299	60°C	
5	F-TGTA AACGACGGCCAGTCCAGGACTGACCCTGCTTAG B-CAGGAAACAGCTATGACC GATGGCTGGCTTTCAGTGT	239	60°C	
6	F-TGTA AACGACGGCCAGTAAGGCACAAGTGAGGCAAAC B-CAGGAAACAGCTATGACC GCCCCTCAAAATTAGCGTCT	283	60°C	
7	F-TGTA AACGACGGCCAGTCTGTAGACGCCGAAATGT B-CAGGAAACAGCTATGACC CTGTGAAGACGCCACCTCT	283	60°C	
8	F-TGTA AACGACGGCCAGTGACAGTGTGCAGGATGTGCT B-CAGGAAACAGCTATGACC CAGGCTGGTCTTGAAGTCT	376	65°C	
9	F-TGTA AACGACGGCCAGTGTGGGATTACAGGCGTGAG B-CAGGAAACAGCTATGACC GGAAGGTCAGCAAAAATCA	290	61°C	
10	F-TGTA AACGACGGCCAGTGCTGAACTTGGGACTCTTGG B-CAGGAAACAGCTATGACC GGGAGACCCAGAGAAAAAC	385	60°C	
11	F-TGTA AACGACGGCCAGTCAAACATCACGCTCCATCG B-CAGGAAACAGCTATGACC TCCAAGCTCATGGGCAA	300	57°C	
12	F-TGTA AACGACGGCCAGTTGAAGCAGAGAGGTGCAATG B-CAGGAAACAGCTATGACC CTCCAAAGTGTGGGATTA	245	67°C	
13	F-TGTA AACGACGGCCAGTCAACCCTCTTTCATGTTGGA B-CAGGAAACAGCTATGACC TGATAGGGCAGGAACACTACGG	294	57°C	
14	F-TGTA AACGACGGCCAGTCAGCCTCCAATTTCTTCTG B-CAGGAAACAGCTATGACC GGTGTAGGAACCCCAAAGT	299	60°C	
15	F-TGTA AACGACGGCCAGTTTGCCAACTTACCCAATCC B-CAGGAAACAGCTATGACC TCAGAAGCCTTTTAGGGAAG	280	60°C	
16	F-TGTA AACGACGGCCAGTGCGGTGGCTAACTTAGATCC B-CAGGAAACAGCTATGACC GCACTACTAAACGCGCTGCT	399	60°C	
17	F-TGTA AACGACGGCCAGTTGTGGTGTGTGGAACAATCA B-CAGGAAACAGCTATGACC ATCACACCCATTACCCATC	295	57°C	
18	F-TGTA AACGACGGCCAGTCGCCAGTGTTCATTTAGAA B-CAGGAAACAGCTATGACC TCAAGTAAAAGCAGGCAGTTGA	299	57°C	
19	F-TGTA AACGACGGCCAGTAAGCTTGAAATGTGGGGATG B-CAGGAAACAGCTATGACC CCCGAGCTAAGGTCAGGATT	236	60°C	

**Tabela 2.4 - Sequências dos primers para o gene *CACT* e suas condições de amplificação.** Todos os primers têm uma cauda de sequenciação M13-Forward e M13-Back. pb: pares de bases

Exão	Sequência dos primers (5' para 3')	Tamanho (pb)	Temperatura de annealing	nº de ciclos
1	F-TGTA AACGACGGCCAGTGAAGGCTTCTGGAGGAATA B-CAGGAAACAGCTATGACC TCTCACGGAAGCTCACACAT	500	60°C	35
2	F-TGTA AACGACGGCCAGTTACAGCCTTCCCTGTTTCACT B-CAGGAAACAGCTATGACC TCCAGCAGAACCACACAGTT	292	60°C	
3	F-TGTA AACGACGGCCAGTGAAGCCACAGTTTGGAGGAC B-CAGGAAACAGCTATGACC CCTCAGTCTCCAAAGTGTCT	349	67°C	
4	F-TGTA AACGACGGCCAGTCTCGGTGGTGTAGTCACAGGTG B-CAGGAAACAGCTATGACC GCCACTGCACCCAGTCTCTGA	251	60°C	
5	F-TGTA AACGACGGCCAGT TGGCCATACTTACTTTGTAGTCTCC B-CAGGAAACAGCTATGACC AAGGCTAATCTGGCAATCCA	299	60°C	
6	F-TGTA AACGACGGCCAGTCTCCTGGCCTCAAGCAATC B-CAGGAAACAGCTATGACC ATGGAGCCAGGAACAACAAC	298	60°C	
7	F-TGTA AACGACGGCCAGTTACCTCTCCCTCCAACCAGTT B-CAGGAAACAGCTATGACC ACCCCAGGATTAGCCAGTGC	297	64°C	
8	F-TGTA AACGACGGCCAGTATGGACTGGTCCCACATGACC B-CAGGAAACAGCTATGACC GCTCTGGCTGAAGATAGGGCTTT	374	57°C	
9	F-TGTA AACGACGGCCAGTAGGGCCAGCAAAGCATAGT B-CAGGAAACAGCTATGACC CTCACCAAGTCCATGCACAG	285	55°C	

Para testar a amplificação do PCR fez-se uma electroforese das amostras (4µl), em gel de agarose a 2% (m/v) (*Invitrogen*) com *SYBR Green* (*Roche*), corante fluorescente que permite detectar as cadeias de DNA, em tampão TAE 1x, 15 minutos a 125 volts.

## 2.7. Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados pelo método enzimático *ExoSap IT*® para remover o excedente de *primers* e nucleótidos. A cada 5 µl de produto de PCR adicionou-se 2 µl de *Exosap* e incubou-se 15 minutos a 37°C, seguida de outra incubação de 15 minutos a 80°C para inactivação das enzimas.

## 2.8. Reacção de sequenciação

As reacções de sequenciação foram preparadas segundo o protocolo do *kit Big Dye Terminator v.1 Cycle Sequencing Mix* (*Applied Biosystem*). A reacção com um volume final de 5 µl incluiu 2 µl de *Big Dye* (que contém MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, ddNTPs marcados com fluorocromos e *AmpliTaq DNA polimerase*), 0.5 µl de *primer* M13 a 3.2 pmol/µl (*F-Forward* ou *B-Back*) e 2.5 µl de produto de PCR purificado. As condições do programa de sequenciação encontram-se na Tabela 2.5.

**Tabela 2.5 - Condições do PCR de sequenciação**

Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
94°C	2 min	1
94°C	10 s	25
50°C	6 s	
60°C	10 s	

## 2.9. Purificação dos produtos de sequenciação

De forma a eliminar os dNTPs não incorporados e sais que podiam interferir com a electroforese os produtos de sequenciação foram purificados através de colunas contendo 750 µl de *Shephadex G-50* (*Amersham Biosciences*). Centrifugaram-se a 4400 r.p.m. durante 4 minutos.

## 2.10. Electroforese capilar

Os produtos purificados foram ressuspensos em 15 µl de formamida desionizada, (substância desnaturante) *Hi-Di<sup>TM</sup>* (*Applied Biosystem*) por agitação no vortex e deixando dissolver durante 10 minutos.

A separação dos fragmentos foi realizada por electroforese capilar no sequenciador automático *ABIPRISM 3130XL* (*Applied Biosystems*). Os resultados foram analisados por comparação com as sequências de referência dos genes estudados.

## 2.11. Bioinformática

Foram utilizadas as sequências de referência dos genes estudados descritas no *RefSeqProject* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e na base de dados *Ensembl*.

O desenho dos *primers* de cada gene foi efectuado no programa *Primer3* e no *FastPCR* o que permitiu a previsão da qualidade dos *primers*, na temperatura de *annealing* e na formação de dímeros de *primers*.

O alinhamento das sequências seleccionadas foi realizado no programa *CLUSTALW2*. As variações das sequências encontradas ao longo do trabalho foram pesquisadas na literatura e no programa *HGMD- Human Gene Mutation Database*, bem como no *Single Nucleotide Polymorphism* do NCBI.

Para a previsão de alteração de *Splicing* foi utilizado o programa *Human Splicing Analyser v.2.3* (<http://www.umd.be/HSF/>), e ainda os programas bioinformáticos *Polyphen* e *ESEFinder v.3.0*.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

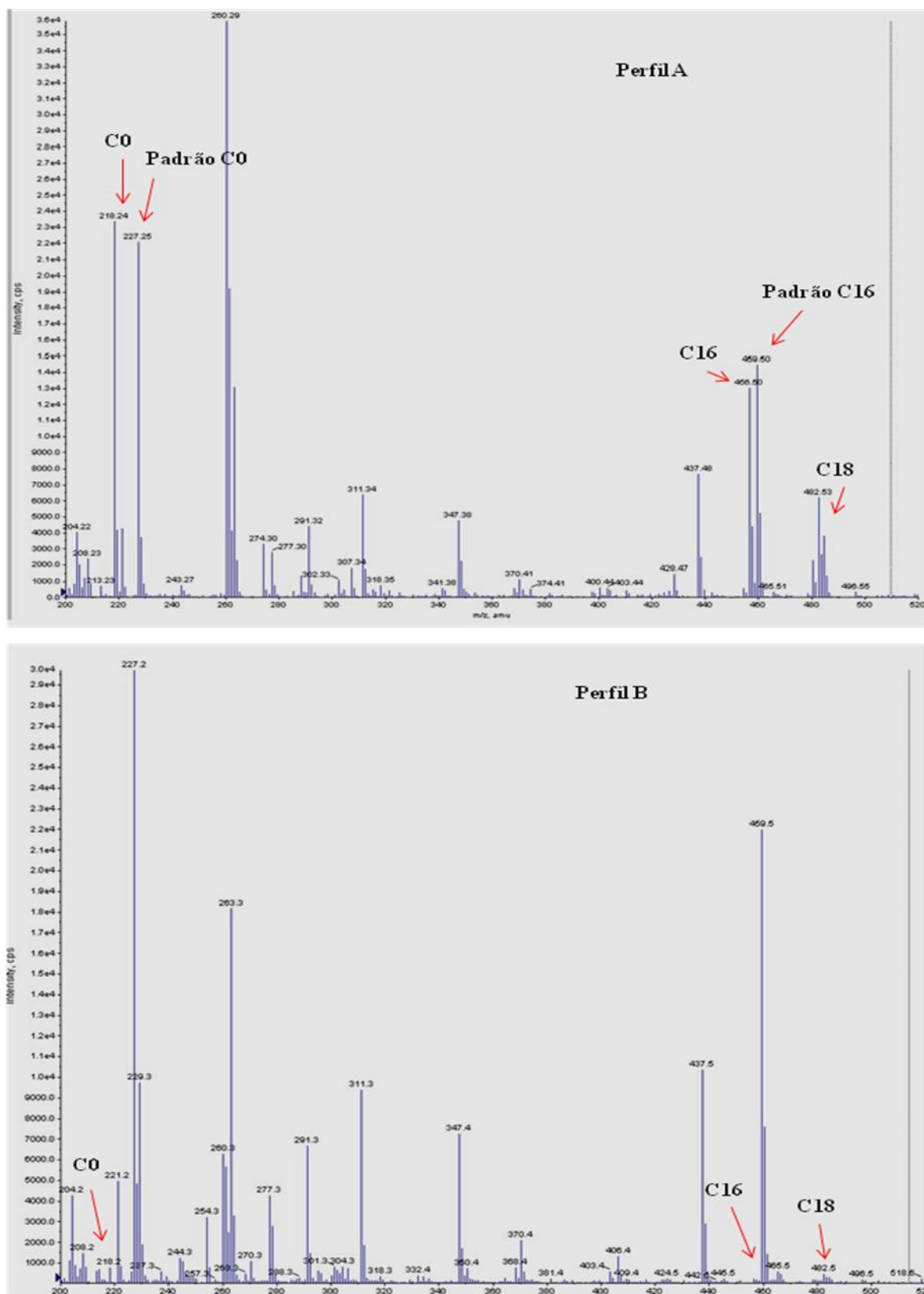
Este estudo foi efectuado em 15 casos seleccionados, onze dos quais recém-nascidos e quatro com clínica sugestiva. Os recém-nascidos foram seleccionados a partir da análise das acilcarnitinas por MS/MS. Foi feita a caracterização molecular a todos os casos, bem como em 30 familiares e para alguns casos foi possível efectuar a determinação residual da enzima envolvida.

#### 3.1. Detecção de suspeitos por MS/MS

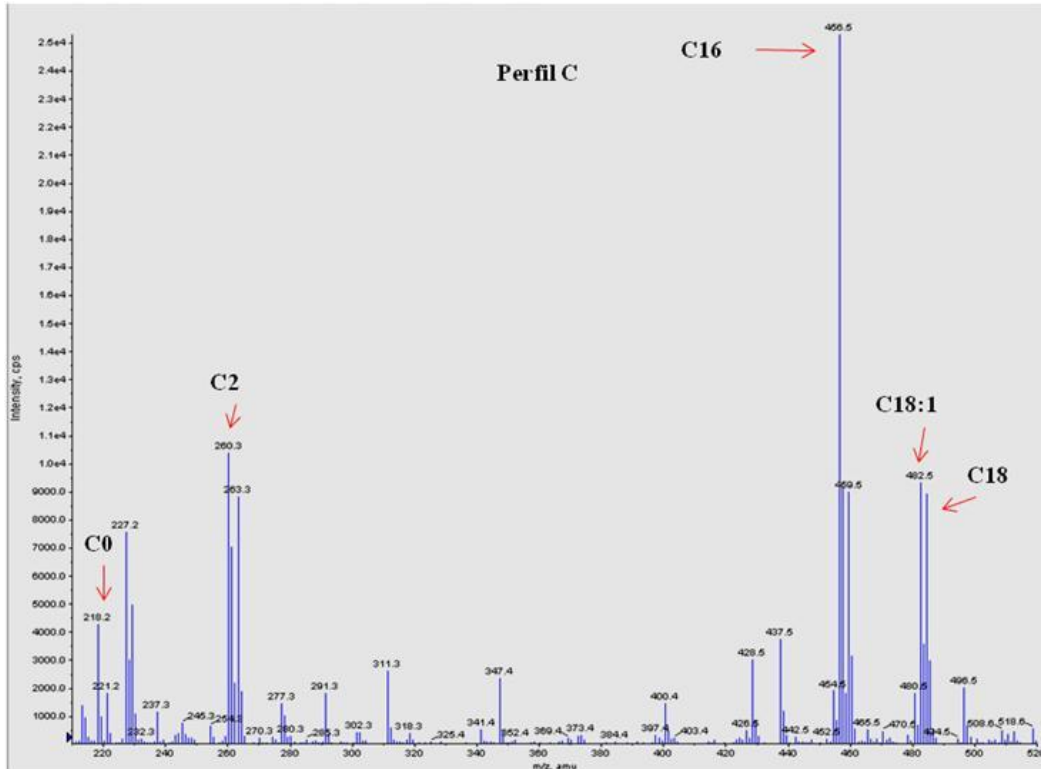
O perfil suspeito das patologias deste estudo está representado nas Figuras 3.1, 3.2 e 3.3. Na Figura 3.1 pode ser observada a diminuição de C0 em relação ao padrão correspondente, bem como uma diminuição de acilcarnitinas de cadeia longa, como C16 e C18, característico de um perfil suspeito de CUD. A deficiência em CPT2/CACT (Figura 3.2), caracteriza-se por uma diminuição de C0 e C2 e um aumento de C16, que provoca um desequilíbrio notório em relação ao controlo. Pelo contrário, no perfil de um suspeito de CPT1 (Figura 3.3) poder-se-á observar um C0 aumentado, mas as acilcarnitinas de cadeia longa apresentam-se baixas. A concentração de acilcarnitinas no sangue reflecte a concentração de acilcarnitinas dentro da mitocôndria, por isso representa uma estimativa a que nível o comprometimento da  $\beta$ -oxidação existe (Chace *et al.* 2002). Os resultados obtidos através do perfil de acilcarnitinas para cada uma das patologias estudadas apresentam-se seguidamente nas Tabelas 3.1, 3.2 e 3.3.

#### 3.2. Estudo molecular

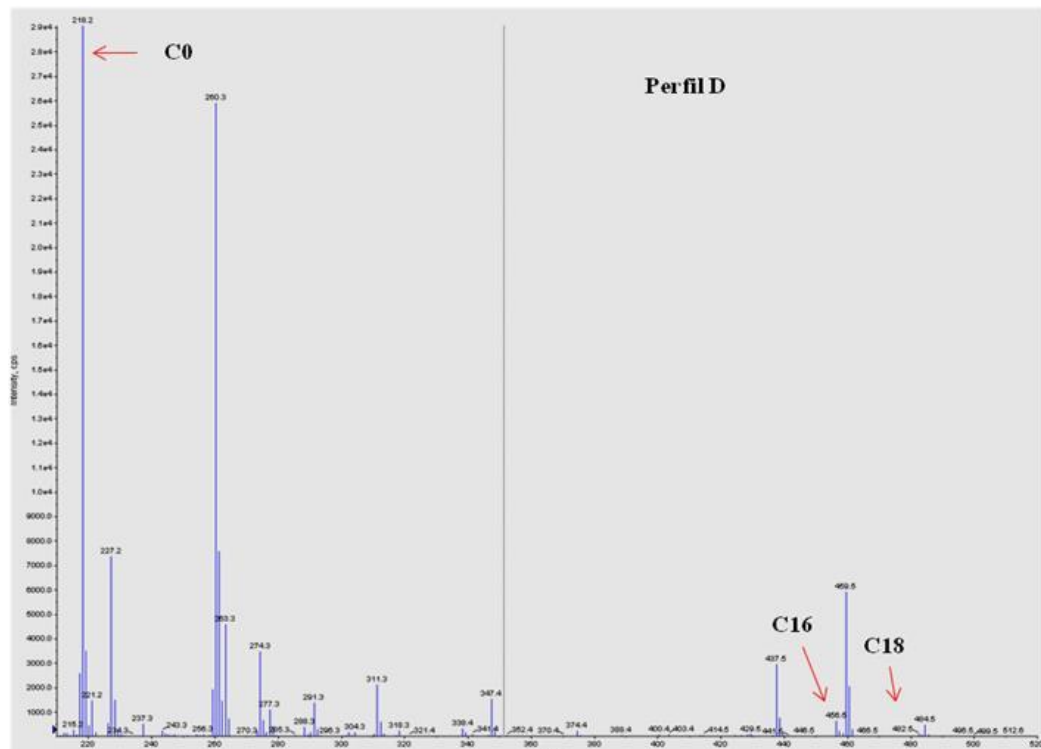
No estudo molecular dos 15 casos, foram caracterizados 13 e detectadas 14 mutações causais e 9 variantes polimórficas. Foram encontradas 5 mutações *missense*, 4 mutações *frameshift* (pequenas deleções e inserções), 1 mutação *nonsense*, 1 deleção de um codão, 2 mutações *splicing*, 1 deleção de dois codões. De acordo com a literatura e com a base de dados *HGMD*, 5 destas alterações não se encontram descritas. Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 3.1, 3.2 e 3.3.



**Figura 3.1-** Espectro de acilcarnitinas em *tandem mass* de um indivíduo normal (A) e de um perfil com suspeita de CUD (B). No perfil com CUD pode ser observada uma diminuição acentuada de carnitina livre (C0), bem como as acilcarnitinas de cadeia longa, palmitoilcarnitina (C16) e Esteroilcarnitina (C18).



**Figura 3.2 - Espectro de acilcarnitinas em *tandem mass* de um perfil suspeito de deficiência em CPT2 (C). No perfil de deficiência em CPT2 pode ser observada uma elevação de palmitoilcarnitina (C16) e oleoilcarnitina (C18.1), bem como uma diminuição de carnitina livre (C0) e acetilcarnitina (C2).**



**Figura 3.3 - Espectro de acilcarnitinas em *tandem mass* de um perfil suspeito de deficiência em CPT1A (D). No perfil de deficiência em CPT1 pode ser observada uma elevação de carnitina livre (C0), bem como as acilcarnitinas de cadeia longa, palmitoilcarnitina (C16) e Esteroilcarnitina (C18).**

O perfil de acilcarnitinas foi feito a todos os casos estudados à excepção do caso 2 e os valores das suas concentrações (Tabelas 3.1, 3.2 e 3.3) estão de acordo com os descritos na literatura, no rastreio destas patologias por *tandem mass*.

No caso 2 não foi possível obter um perfil de acilcarnitinas por se tratar de um caso de origem espanhola e que nos foi enviado apenas DNA para caracterização molecular.

O caso 3 refere-se a uma mãe de um recém-nascido ao qual se tinha efectuado o rastreio. Este revelou um perfil compatível com CUD. Para ser confirmado o rastreio procedeu-se à análise de nova colheita de sangue do recém-nascido e da sua mãe. O valor de concentração de carnitina livre da mãe era muito baixo, bem como as acilcarnitinas de cadeia longa. O perfil do recém-nascido na confirmação normalizou, o que levou à suspeição de que seria a mãe a ter a patologia. É típico observar-se um aumento ligeiro nos níveis de carnitina em pacientes com CUD quando a suplementação de carnitina é iniciada. Em contraste estas crianças tratadas com carnitina, normalizam os níveis de carnitina livre em algumas semanas.

Foram também efectuados perfis de acilcarnitinas aos familiares dos suspeitos de CUD, nos sangues disponíveis.

**Tabela 3.1 - Dados bioquímicos e moleculares dos casos estudados suspeitos de deficiência do transportador de carnitina - CUD.** C0-Carnitina livre; C16-Palmitoilcarnitina; C18-Estearoilcarnitina; ND-não doseado; RN – Recém-nascido; V.R.-Valores de Referência.

Caso	♀♂	Idade	C0 μM	C16 μM	C18 μM	Alelo 1	Alelo 2
1	F	adulto (belga)	4.68	0.19	0.15	c.136C>T	c.825-1G>C
2	F	criança (espanhola) (?A)	ND	ND	ND	c.254_264dupGGCTCGCCACC	c.844C>T
3	F	adulto (materno)	2.73	0.11	0.07	c.844C>T	?
4	F	RN	5.51	0.62	0.25	-	-
5	F	RN	4.43	0.72	0.28	c.695C>T	c.632A>G
6	F	RN	3.53	0.61	0.24	c.844C>T	c.844C>T
7	M	RN	4.82	0.93	0.32	c.67-69delTTC	?
8	F	RN	2.38	0.60	0.21	c.844C>T	c.844C>T
9	M	RN	3.44	0.57	0.25	c.844C>T	c.844C>T
10	F	15A	0.60	0.02	0.04	c.632A>G	c.844delC
V.R. (>1A) Percentil 95 [19.24-48.48] [0.53-2.09] [0.36-1.36]							
V.R. (RN) Percentil 99.5 [9.13-68.45] [0.83-7.99] [0.46-2.28]							

**Tabela 3.2 - Dados bioquímicos e moleculares dos casos estudados suspeitos de deficiência em CPT2/CACT.** C0-Carnitina livre; C2-Acetilcarnitina; C16-Palmitoilcarnitina; C18-Estearoilcarnitina; C18:1-Oleoilcarnitina. ND-não doseado. \*Segundo o *Region4* ; RN – Recém-nascido; V.R.-Valores de Referência.

Caso	♀♂	Idade	C0 μM	C2 μM	C16 μM	C18 μM	C18:1 μM	C0/ C16+18	C16+ C18:1/C2	Alelo 1	Alelo 2
11	M	2.5A	1.80	3.50	1.19	0.82	1.12	0.90	0.66	c.359A>G	c.1412T>G
12	M	RN	15.06	6.81	7.02	2.43	2.66	1.59	1.42	c.430_435del GAGTAT	c.725_726insA
13	M	RN	14.78	6.15	22.43	6.05	7.93	0.52	4.93	c.113_114insGC	c.113_114insGC
14	M	RN	14.94	10.72	7.23	3.13	4.21	1.44	1.07	-	-
V.R. (>1A) C0 [19.24-48.48] C2 [8.06-25.54] C16 [0.53-2.09] C18 [0.36-1.36] C18:1 [0.62-2.33]											
V.R. (RN) C0 [9.13-68.45] C2 [9.13-49.06] C16 [0.83-7.99] C18 [0.46-2.28] C18:1 [0.57-3.42] C0/C16+C18 [3.0-30] C16+C18:1/C2 [0.011-0.30]*											

**Tabela 3.3 - Dados bioquímicos e moleculares do caso estudado suspeito de deficiência em CPT1A.** C0-Carnitina livre; C16-Palmitoilcarnitina; C18-Estearoilcarnitina; V.R.-Valores de referência; RN-recém-nascido.

Caso	$\text{O}_2+\text{O}$	Idade	C0 $\mu\text{M}$	C16 $\mu\text{M}$	C18 $\mu\text{M}$	C0/C16+C18	Alelo 1	Alelo 2
15	M	RN	87.85	0.30	0.20	183	c.1456-1458+1delGAGg	c.1456-1458+1delGAGg
V.R. (RN)		C0 [9.13-68.45]	C16 [0.83-7.99]	C18 [0.46-2.28]	C0/C16+C18 [3.0-30]			

No estudo molecular foram identificadas 14 mutações causais, das quais 8 mutações no gene *SLC22A5* em 10 doentes, 5 mutações no gene *CPT2* em 4 doentes, e uma mutação no gene *CPT1A* num doente. Encontram-se resumidas na Tabela 3.4, discutindo-se pormenorizadamente adiante cada uma delas. Os 9 polimorfismos encontrados neste estudo estão descritos na literatura (Tabela 3.5) e as frequências com que estes se encontram em populações de várias etnias estudadas, na base de dados do *NCBI*.

Tabela 3.4 – Mutações causais encontradas em 13 casos nos genes *SLC22A5*, *CPT2* e *CPT1A*

Gene	Caso	Exão/ intron	Mutação	Efeito na proteína	Referência
<i>SLC22A5</i>	1	Exão1	c.136C>T	p.P46S	(Schimmenti <i>et al.</i> 2007)
	1	Intron 4	c.825-1G>C	IVS4-1G>C	<b>Este estudo</b>
	2	Exão 1	c.254_264dupGGCTCGCCACC	p.Ile89GlyfsX45	(Wang <i>et al.</i> 2001)
	2,3,6,8,9	Exão 5	c.844C>T	p.R282X	(Wang <i>et al.</i> 1999)
	5	Exão 4	c.695C>T	p.T232M	(Dobrowolski <i>et al.</i> 2005)
	5,10	Exão 3	c.632A>G	p.Y211C	(Vaz <i>et al.</i> 1999)
	7	Exão 1	c.67_69delTTC	p.delF23	(Lamhonwah <i>et al.</i> 2002)
	10	Exão 5	c.844delC	p.Arg282AspfsX14	(Lamhonwah <i>et al.</i> 2002)
<i>CPT2</i>	11	Exão 4	c.359A>G	p.T120C	(Martin <i>et al.</i> 2000)
	11	Exão 4	c.1412T>G	p.F471C	<b>Este estudo</b>
	12	Exão 4	c.430_435delGAGTAT	p.E144_Y145del	<b>Este estudo</b>
	12	Exão 4	c.725_726insA	p.H242QInfsX14	<b>Este estudo</b>
	13	Exão 1	c.113_114insGC	p.Ser38fs	(Martin <i>et al.</i> 2000)
<i>CPT1A</i>	15	Exão 12	c.1456-1458+1delGAGg	?	<b>Este estudo</b>

Tabela 3.5 – Alterações polimórficas encontradas nos genes *SLC22A5*, *CPT2* e *CPT1A*.

Gene	Alteração na proteína	Posição	Código	Frequência (heterozigotia)
<i>SLC22A5</i>	L95L	exão 1	rs2631365	0,416
	–	intrão 3 <b>c.652+6A&gt;G</b>	rs4551059	ND
	L269L	exão 4	rs274558	0,499
	–	intrão 4 <b>c.824+13T&gt;C</b>	rs274557	ND
	–	intrão 1 <b>c.393+17G&gt;A</b>	rs11568522	0,08
	<b>P549S</b>	exão 10	rs11568525	0,055
<i>CPT2</i>	<b>M647V</b>	exão 5	rs1799822	0,167
	<b>V368I</b>	exão 4c	rs1799821	0,499
<i>CPT1A</i>	F417F	exão 11	rs2228502	0,162

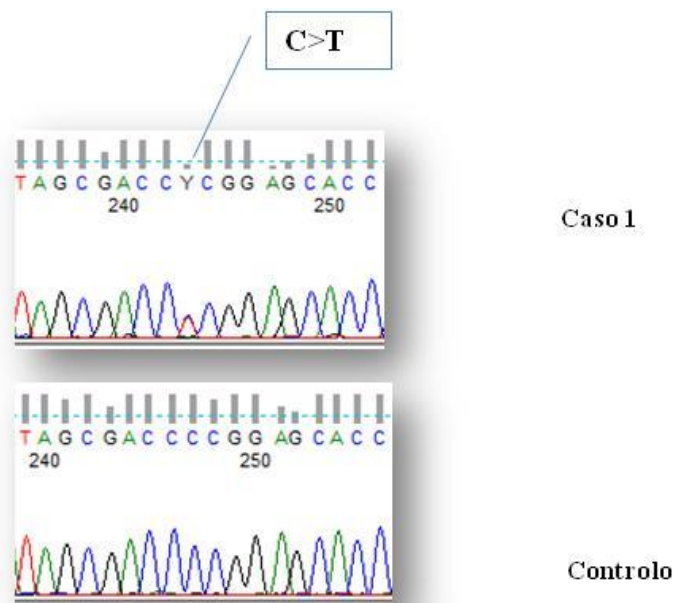
No gene *SLC22A5* foi encontrado um polimorfismo exónico no codão 549 não significativo, uma alteração que provoca uma troca de um aminoácido de prolina por um de serina num só caso (mãe do caso 7), três polimorfismos intrónicos e dois polimorfismos neutros exónicos. No gene *CPT2* foram encontrados dois polimorfismos não sinónimos, no codão 368 e 647 que trocam um aminoácido de valina por um de isoleucina (ambos apolares) e um aminoácido de metionina por um de valina (ambos apolares) respectivamente. Segundo a bibliografia os polimorfismos V368I e M647V contribuem para a redução da actividade da enzima CPT2 quando presentes com certas mutações no gene *CPT2* (Vladutiu *et al.* 2000). No gene *CPT1A* foi encontrado um polimorfismo neutro no codão 417.

### 3.3. Mutações encontradas no gene *SLC22A5*

#### 3.3.1. Mutações *missense* / *nonsense*

##### c.136C>T (Caso 1)

A substituição nucleotídica c.136C>T origina a troca de um resíduo não polar de prolina por um polar de serina (p.P46S) no exão 1 (Figura 3.4), foi identificada em heterozigotia com a mutação c.825-1G>C no caso 1. Esta mutação localiza-se no *loop* extracelular que contém 107 aminoácidos, que se situa entre os dois primeiros domínios transmembranares e contém 3 locais de glicosilação. A expressão de cDNA desta mutação em células de ovário de hamster (CHO) chinês diminui o transporte de carnitina para valores <5% dos medidos num cDNA de OCTN2 normal (Schimmenti *et al.* 2007).

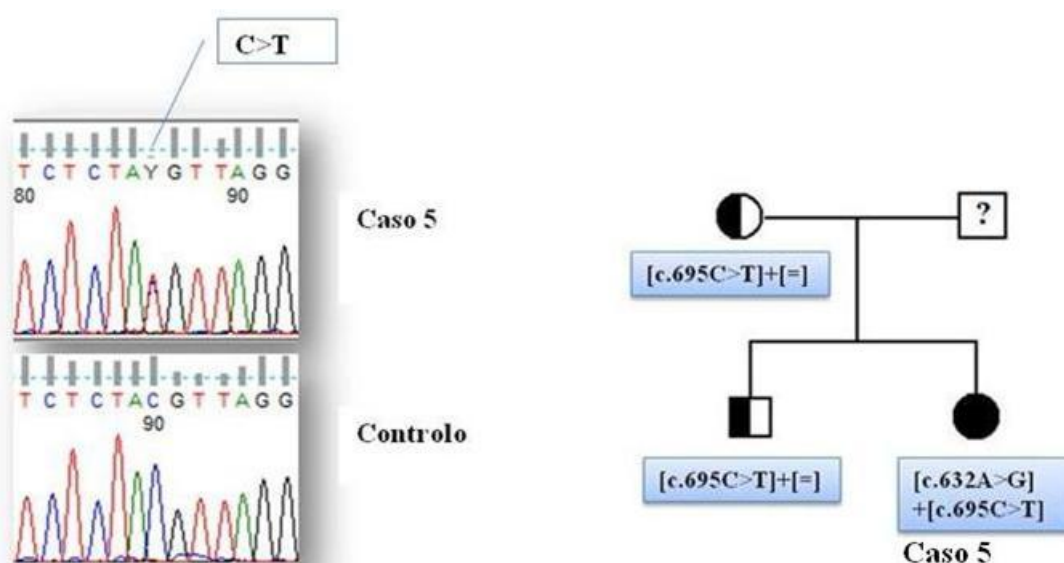


**Figura 3.4- Mutação c.136C>T.** Representação parcial da sequência do exão 1 do gDNA do gene *SLC22A5* com a mutação c.136C>T em heterozigotia no caso 1 comparada com o controle normal.

Foi demonstrado que as mutações nos domínios extracelulares da proteína, que é o caso desta, impedem a maturação correcta do transportador para a membrana plasmática e retêm o mutante OCTN2 no citoplasma (Amat di San Filippo *et al.* 2006).

### c.695C>T (Caso 5)

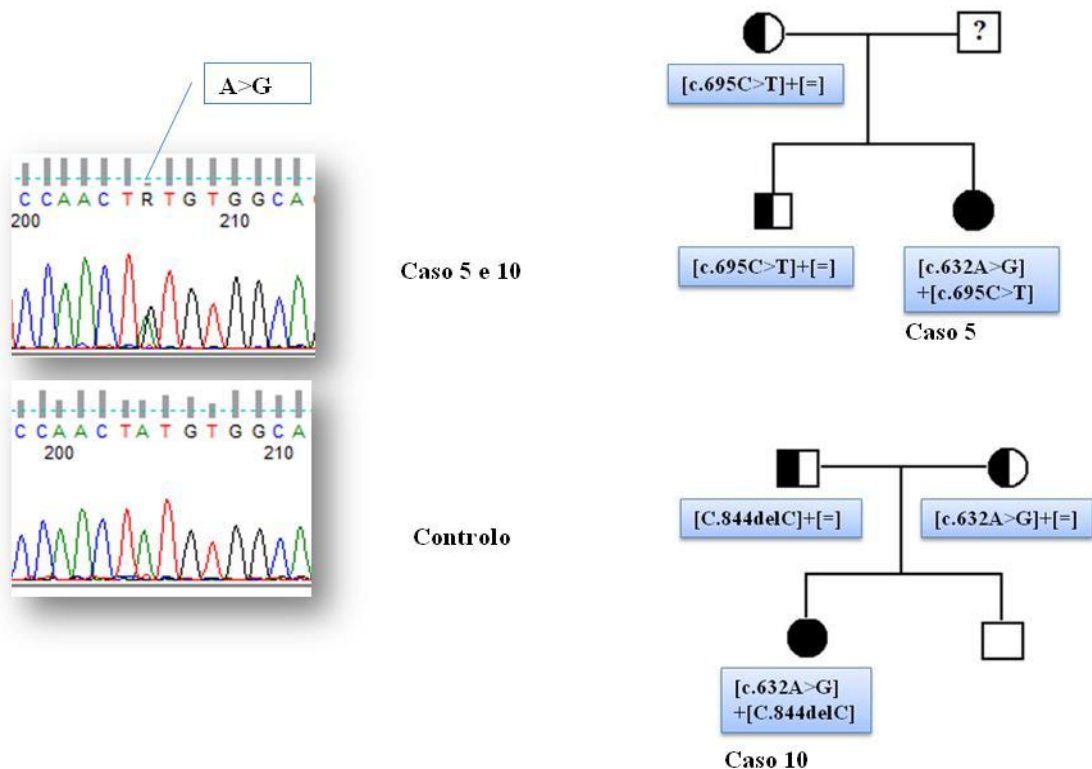
A substituição nucleotídica c.695C>T que origina a troca de um resíduo polar de treonina por um não polar de metionina (p.T232M) no exão 4 (Figura 3.5), foi identificada no caso 5 em heterozigotia com a mutação c.632A>G. Foi também encontrada na mãe e no irmão em heterozigotia, sendo estes só portadores, a análise de acilcarnitinas revelou C0=9.3 e C0=14.8 para um valor de referência >19.24µM. Esta mutação afecta o início do 5º domínio transmembranar. Estudos de expressão permitiram verificar que embora a proteína com esta mutação se localize normalmente na membrana plasmática ela faz reduzir o transporte de carnitina (Dobrowolski *et al.* 2005).



**Figura 3.5 - Mutação c.695C>T.** Representação parcial da sequência do exão 4 do gDNA do gene *SLC22A5* com a mutação c.695C>T em heterozigotia no caso 5 comparada com o controlo normal. Heredograma da família do caso 5.

**c.632A>G (Caso 5, 10)**

A mutação c.632A>G que origina a troca de um resíduo polar de tirosina por um resíduo polar de cisteína (p.Y211C) no exão 3 (Figura 3.6), foi identificada em heterozigotia no caso 5 e 10. A mãe do Caso 10 é portadora desta mutação. A tirosina afectada encontra-se a meio do 4º domínio transmembranar que indica ser um domínio importante para o reconhecimento da carnitina. O alinhamento de vários transportadores de catiões orgânicos, demonstrou em todos os casos um aminoácido aromático nesta posição, sugerindo que a conversão para uma cisteína hidrófila pode afectar a topologia e a função da proteína (Vaz *et al.* 1999).



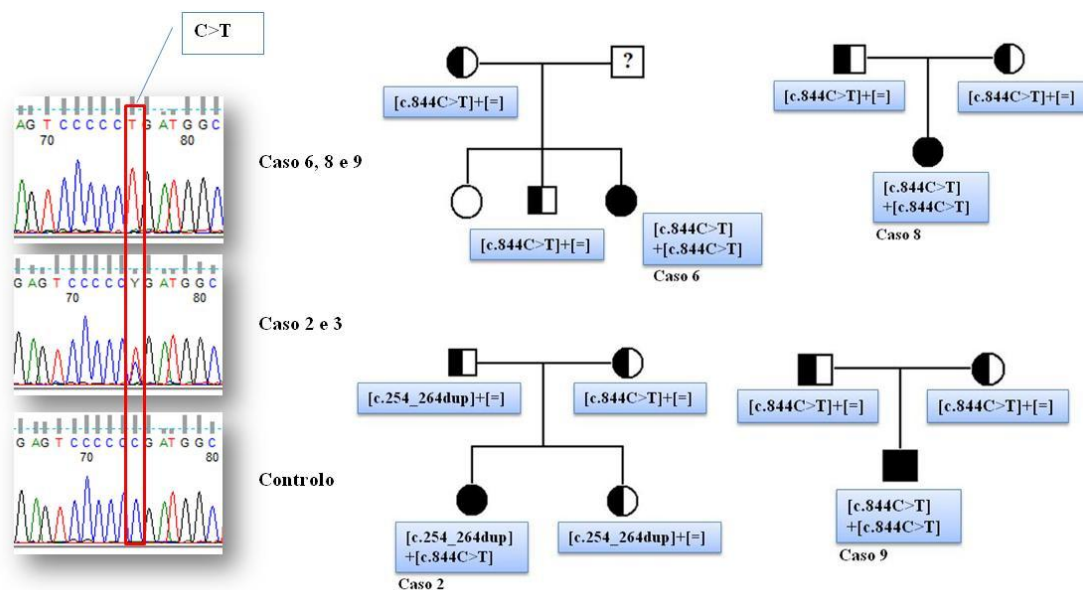
**Figura 3.6 - Mutação c.632A>G.** Representação parcial da sequência do exão 3 do gDNA do gene *SLC22A5* onde está assinalada a mutação c.632A>G em heterozigotia no caso 5 e 10 comparada com o controlo normal. Heredograma da família do caso 5 e do caso 10.

### c.844C>T (Caso 2,3,6,8,9)

Esta substituição nucleotídica converte o codão 282, resíduo de arginina num codão stop (R282X) no exão 5, originando uma mutação *nonsense* que resulta numa proteína truncada de apenas 275 aminoácidos.

Foi no estudo deste gene, a mutação mais frequente, num total de 20 alelos (10 doentes), foi encontrada em 8. Nos casos 6, 8 e 9 foi identificada homozigotia, e nos casos 2 e 3 em heterozigotia (Figura 3.7). Nos casos 8 e 9 com a mutação em homozigotia foram identificados ambos os pais como portadores. O irmão do caso 6 (C0=17) e a mãe do caso 2 foram identificados também como portadores. As mães do caso 6 e 8, portadoras de esta mutação apresentavam valores de C0=7.4 e 12.6 para valor de referência >19.24μM respectivamente.

Esta inserção prematura do codão stop pode produzir uma proteína truncada, que resulta num RNA instável, que rapidamente é degradado ou causa *skipping* do exão. Estudos de expressão revelaram que esta mutação torna o transportador não funcional (Wang *et al.* 1999). Foi ainda demonstrado que esta mutação faz reduzir os níveis de mRNA maduro, o que se torna previsível, dado que os codões stop prematuros diminuem a estabilidade do mRNA em várias patologias. O mRNA residual é o resultado da proteína truncada com 6 domínios transmembranares em vez de 12.



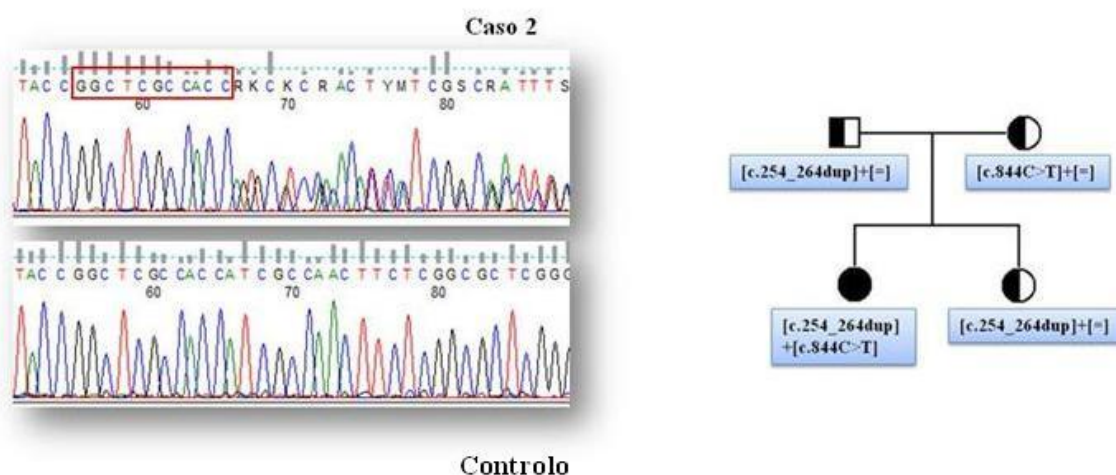
**Figura 3.7 – Mutação c.844C>T.** Representação parcial da sequência do exão 5 do gDNA do gene *SLC22A5* onde está assinalada a mutação c.844C>T, nos casos 6, 8 e 9 em homozigotia, 2 e 3 em heterozigotia comparadas com o controlo normal. Heredogramas das famílias dos casos 2, 6, 8 e 9.

O caso 3, mãe heterozigótica para esta mutação, foi revelado através da análise do filho, para o qual as acilcarnitinas foram feitas no rastreio neonatal. A carnitina é transferida da placenta para o feto durante a vida intra-uterina e os níveis de carnitina livre dos recém-nascidos refletem os níveis das suas mães se a colheita é feita nos primeiros dias do nascimento. O recém-nascido tinha um valor de carnitina livre de 4.6  $\mu\text{M}$  que indiciou a suspeição, embora após uns dias o valor tenha normalizado. Ao serem feitas acilcarnitinas à mãe verificou-se que esta seria a doente, perante os resultados obtidos (Tabela 3.1). Só foi encontrada esta mutação em heterozigotia. A carnitina baixa neste caso faz prever uma significativa redução do *uptake* da carnitina, como já descrito em casos maternos em condição de portadoras desta mutação, nas quais se verificou 45% do *uptake* de carnitina do controlo em fibroblastos (Vaz *et al.* 1999).

### 3.3.2. Mutações com alteração da grelha de leitura (*frameshift*)

#### c.254\_264dupGGCTCGCCACC (Caso2)

Esta mutação consiste numa duplicação de 11 pb no exão 1, que altera a grelha de leitura e resulta numa prematura inserção de um codão stop na posição 133 no cDNA (133X). Esta inserção provoca provavelmente uma proteína truncada (p.Ile89GlyfsX45). Nesta mutação já descrita, os estudos de expressão permitiram verificar que ela reduz o nível de mRNA e compromete o transporte de carnitina (Wang *et al.* 2001). Foi identificada em heterozigotia no caso 2 (Figura 3.8), (origem Espanhola), com a mutação p.R282X. Nesta família foram caracterizados molecularmente os pais e uma irmã que apresentava valores de carnitina baixos. No pai e na irmã foi identificada esta mutação em heterozigotia, sendo considerados os dois portadores.

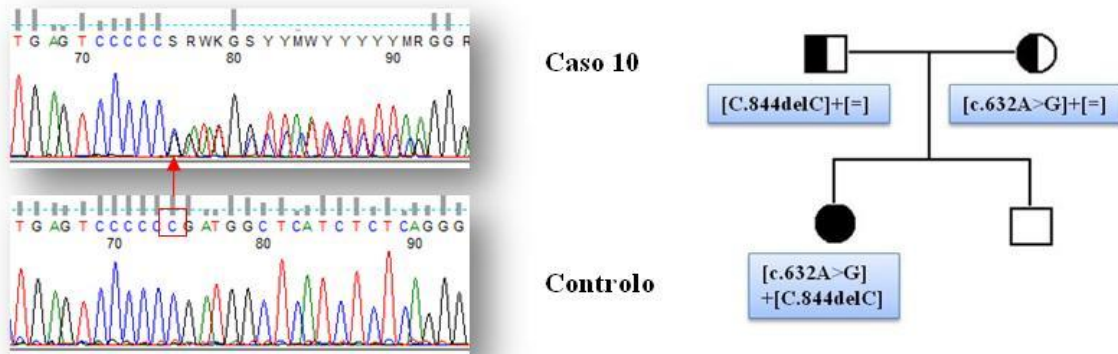


**Figura 3.8 – Mutação c.254\_264dupGGCTCGCCACC.** Representação parcial da sequência do exão 1 do gDNA do gene *SLC22A5* no caso 2 onde está destacada a mutação c.254\_264dupGGCTCGCCACC em heterozigotia comparada com o controlo normal. Estão assinaladas as 11 bases que estão duplicados na inserção (rectângulo vermelho). Heredograma da família do caso 2

### c.844delC (Caso 10)

Esta deleção, já descrita de uma citosina resulta um *frameshift* na posição Arg282Asp, no exão 5 (Figura 3.9), no loop intracelular entre o 6º e o 7º domínio transmembranar e torna-se previsível uma proteína truncada de 294 aminoácidos (p.Arg282AspfsX14). Perde os domínios transmembranares do 7º ao 12º, e deve resultar numa proteína rapidamente degradada ou não funcional.

O resíduo de arginina na posição 282 é altamente conservado. O caso 10 teve uma cardiopatia aos 2 anos, foi submetida a cirurgia e aos 10 anos tem novamente queixas de fadigabilidade. É-lhe diagnosticada uma miocardiopatia e teve uma má evolução. Aos 15 anos foi feita avaliação metabólica que revelou a quase inexistência de carnitina livre e das acilcarnitinas de cadeia longa no sangue. Foi identificada esta mutação em heterozigotia com a mutação *missense* c.632A>G. Este caso teve confirmação enzimática em fibroblastos que revelou um *uptake* da carnitina de aproximadamente 0% do controlo. O pai é portador desta mutação e o estudo do irmão revelou-se normal.

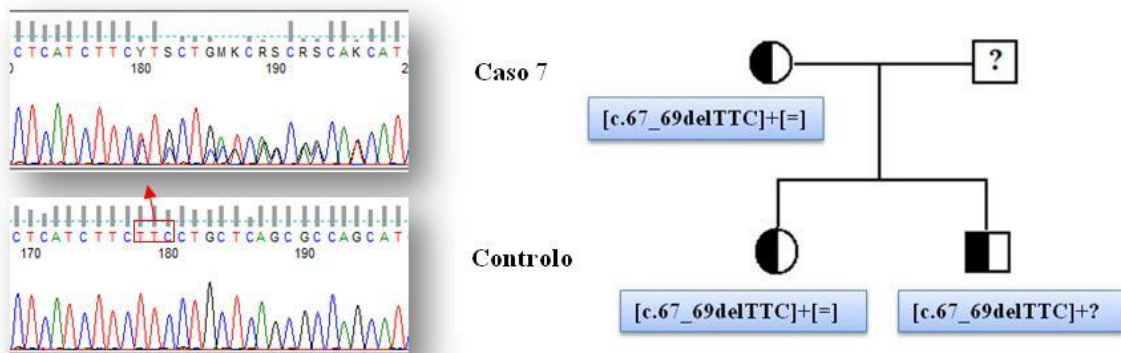


**Figura 3.9 – Mutação c.844delC.** Representação parcial da sequência do exão 5 do gDNA do gene *SLC22A5* no caso 10 onde está destacada a mutação c.844delC em heterozigotia, comparada com o controle normal. Heredograma da família do caso 10

### 3.3.3. Delecção de codão

#### c.67\_69delTTC (Caso 7)

Esta delecção de 3 bases TTC no exão 1 resulta na delecção de um resíduo de fenilalanina na posição 23 (p.del23) no primeiro domínio transmembranar e pode alterar a conformação ou topologia da proteína funcional, tendo sido já descrita em heterozigotia composta. Neste estudo foi identificada em heterozigotia no caso 7 (Figura 3.10).



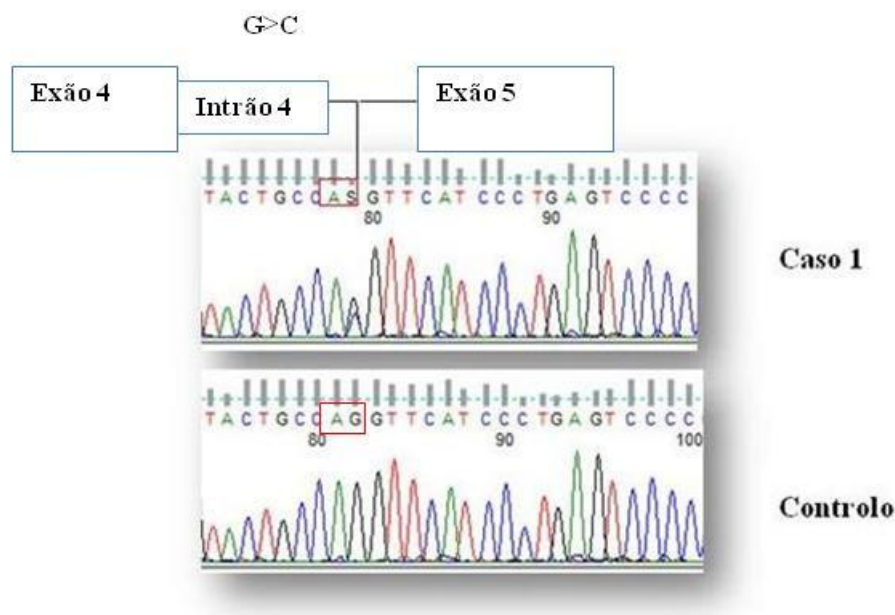
**Figura 3.10 – Mutação c.67\_69delTTC.** Representação parcial da sequência do exão 1 do gDNA do gene *SLC22A5* no caso 7 onde está destacada a mutação c.67\_69delTTC em heterozigotia, comparada com o controle normal. Heredograma da família do caso 7

Embora no caso 7 esteja confirmado o diagnóstico em fibroblastos com um valor de *uptake* de carnitina de 11,8% do controlo e a oxidação dos ácidos gordos estar comprometida, só foi identificada esta mutação em heterozigotia, no estudo do gDNA. Foram identificadas como portadoras desta mutação a mãe e a irmã, sem estas terem dados bioquímicos de suspeição (C0=18.9 e C0=35.9 para valor de referência >19.24µM respectivamente). Do pai não houve possibilidade de obter sangue para análise neste estudo. Neste caso torna-se necessário o estudo do cDNA para se poder concluir se estamos em presença de uma grande deleção no outro alelo, ou se estará alguma mutação presente na zona promotora do gene.

### 3.3.4. Mutação *splicing*

#### c.825-1G>C (Caso 1)

O *splicing* é um processo que envolve a remoção dos intrões do transcrito primário (pré-mRNA) dando origem ao mRNA maduro. Este processo é realizado por um complexo multiproteico designado spliceosoma. Fazem parte deste complexo, os *small nuclear ribonucleoproteins* (snRNPs) e outras proteínas auxiliares que reconhecem as extremidades conservadas dos intrões. Essas sequências são as de consenso flanqueadoras da junção intrão-exão, geralmente AG-GT mas também das regiões adjacentes (Burset *et al.* 2000). Neste caso foi identificada a alteração nova c.825-1G>C no intrão 4 (Figura 3.11), localizada no local de consenso de *splicing*, região flanqueadora da junção exão-intrão GA, em heterozigotia com a mutação c.136C>T. A análise bioinformática feita a partir do programa *Human Splicing Analyser v.2.3* (<http://www.umd.be/HSF/>) foi utilizada para a previsão do *score* para este local de *splicing*. A mutação encontrada fez diminuir o *score* de 90,04 para 61.09 com provável perda do local aceitador de *splicing*. Foi também utilizado o programa ESEFinder v.3.0 que confirma a possível perda de local de *splicing*.



**Figura 3.11 – Mutação c.825-1G>C.** Representação parcial da sequência do exão 5 e do local consenso no intrão 4 do gDNA do gene *SLC22A5* no caso 1 onde está destacada a mutação c.825-1G>C em heterozigotia, comparada com o controlo normal.

A análise bioinformática indica que esta variação faz perder a ligação da proteína SF2/ASF (*enhancer motif*) que é fundamental para a ocorrência de *splicing*. Este fenómeno de *splicing* pode dar origem ao *skipping* do exão ou á utilização de novos locais críticos de *splicing*. Não foi possível fazer o estudo familiar deste caso 1 de origem Belga por não ter sido enviado sangue dos pais.

### 3.4. Mutações encontradas no gene *CPT2*

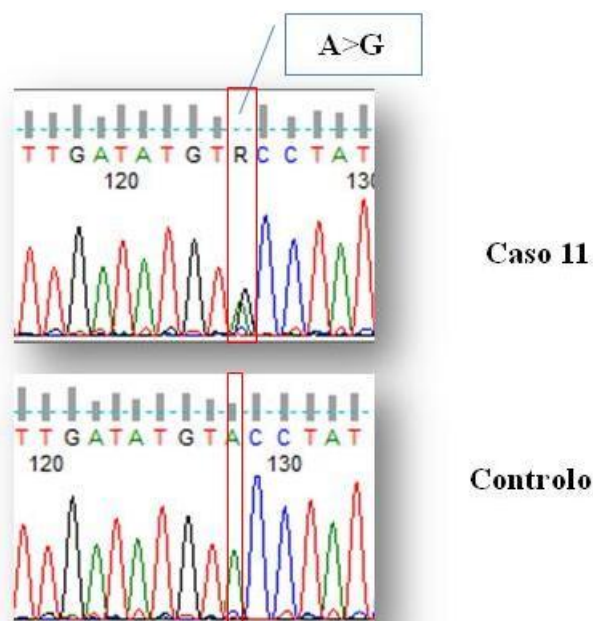
#### 3.4.1. Mutações *missense*

##### c.359A>G (caso 11)

A mutação c.359A>G que origina a troca de um resíduo polar de treonina, grande aminoácido aromático, por um pequeno aminoácido polar de cisteína (p.T120C) no exão 4 já tinha descrita na literatura (Figura 3.12). Este resíduo de tirosina 120 é rigorosamente conservado em todas as aciltransferases das diferentes espécies e ocorre no alongamento de 19 aminoácidos que são completamente conservados no rato e no humano (Finocchiaro *et*

al. 1991; McGarry and Brown 1997), o que é consistente com o papel fundamental deste aminoácido com o normal funcionamento da CPT2. Foi identificada em heterozigotia com a mutação c.1412T>C no caso 11. Foi também identificada no pai em heterozigotia. O estudo familiar é referido mais à frente quando é referida a mutação nova deste caso.

Foi feito doseamento enzimático, que revelou 28% da actividade da carnitina palmitoiltransferase 2.



**Figura 3.12 – Mutação c.359A>G.** Representação parcial da sequência do exão 4 do gDNA do gene *CPT2*, onde está destacada a mutação c.359A>G em heterozigotia comparada com o controlo normal.

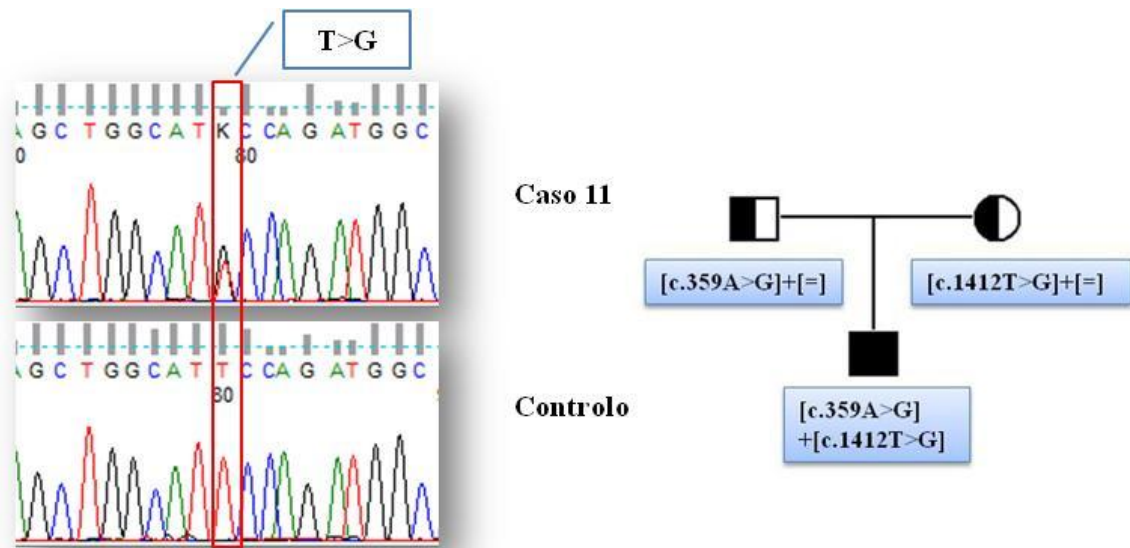
### c.1412T>G (Caso 11)

A mutação nova identificada no exão 4 c.1412T>G que origina a troca de um resíduo não polar de fenilalanina por um resíduo polar de cisteína (p.F471C), foi encontrada no caso 11 (Figura 3.13), bem como na sua mãe. Neste caso foram encontrados as alterações polimórficas M647V e V369I em heterozigotia.

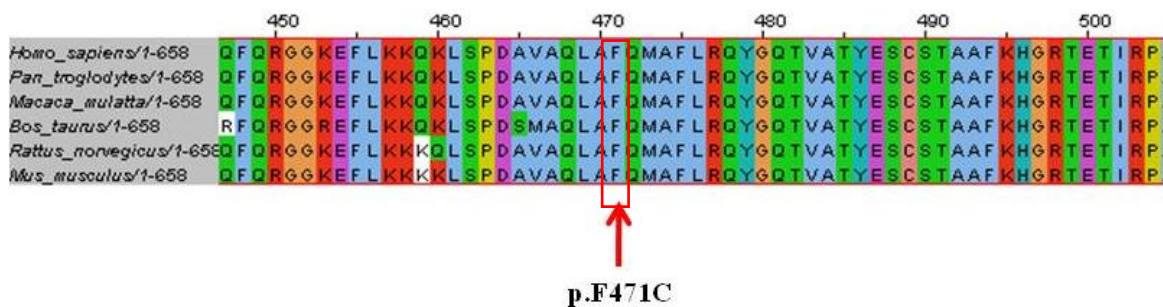
A avaliação do impacto desta mutação *missense* foi feita com base nas características dos aminoácidos trocados, no alinhamento de sequências homólogas de várias espécies diferentes, recorrendo ao *software ClustalX2* e à ferramenta bioinformática *Polyphen*

(*Polymorphism Phenotyping*) que baseia a análise na diferença de *scores* entre o aminoácido normal e aquele que foi substituído. Prevê o impacto da substituição de um aminoácido na estrutura e função de uma proteína e classifica o efeito de uma mutação *missense* em três categorias: *probably damaging*, *possibly damaging* e *benign*.

O alinhamento demonstrou que o aminoácido em questão é conservado nas espécies homólogas analisadas o que sugere que este resíduo aminoacídico poderá ser crítico para a função desta proteína (figura 3.14).



**Figura 3.13 – Mutação c.1412T>G.** Representação parcial da sequência do exão 4 do gDNA do gene *CPT2*, onde está destacada a mutação c.1412T>G em heterozigotia comparada com o controlo normal. Heredograma da família do caso 11.



**Figura 3.14 – Representação parcial do alinhamento do gene *CPT2* e de outras espécies evidenciando a conservação do resíduo de fenilalanina na posição 471.**

Relativamente ao resultado da diferença de *scores* obtida no *Polyphen* (Figura3.15), ou seja 2.416, ele corresponde a uma variação com probabilidade de patogenicidade, atendendo que esta escala varia entre o zero e um valor superior a dois.

Este resíduo situa-se no domínio C-terminal na hélice  $\alpha 15$ , numa sequência que não é comum às outras aciltransferases embora seja muito conservada nas outras espécies, o que pode indicar ser uma zona essencial para a estrutura e função desta proteína.

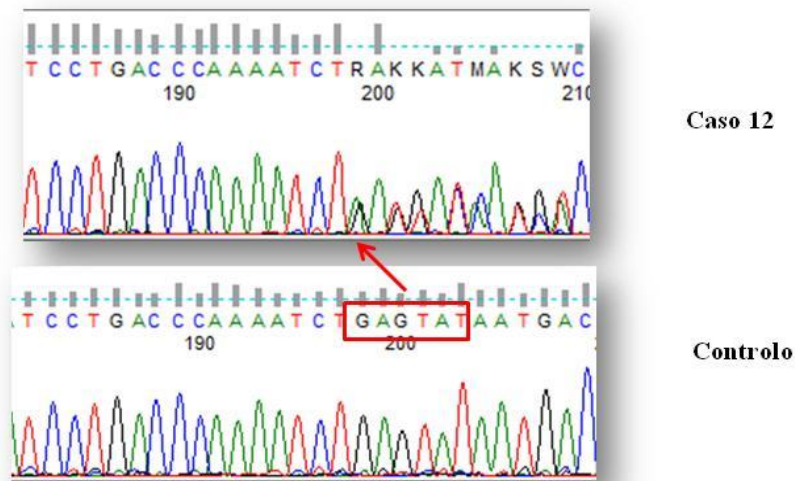
Query				
Acc number	Position	AA <sub>1</sub>	AA <sub>2</sub>	Description
P23786	471	F	C	RecName: Full=Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial; EC=2.3.1.21; 658 AA
Prediction				
This variant is predicted to be probably damaging				
Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data
probably damaging	FT alignment structure	alignment	N/A	PSIC score difference: 2.416
Remarks				
Cavity creation at buried site; normed accessibility: 0.02, volume change: -82				

Figura 3.15 – Resultado da análise feita através do *Poyphen* na previsão do efeito deletério da mutação F471C no gene *CPT2*.

### 3.4.2. Delecção de Codões

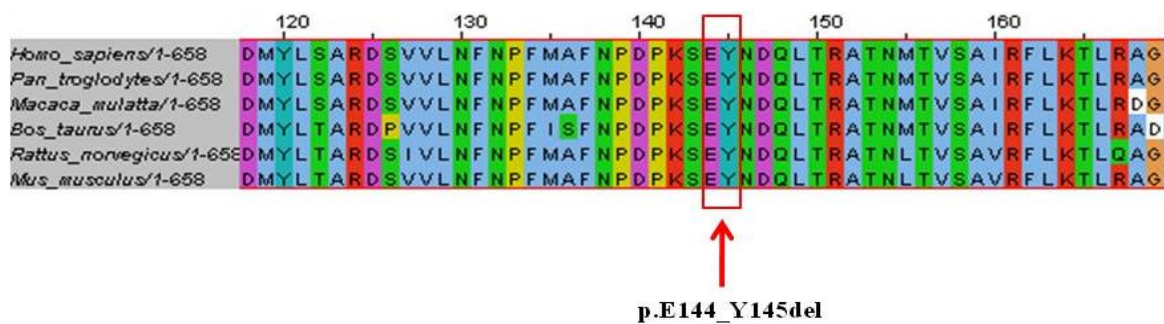
#### c.430\_435delGAGTAT (Caso 12)

No caso 12 foi identificada uma alteração nova que consiste na delecção da sequência de 6 bases GAGTAT no exão 4 (Figura 3.16), que origina a delecção de 2 codões (p.E144\_Y145del) em heterozigotia com a mutação c.725\_726insA. Esta delecção foi encontrada em heterozigotia na mãe, bem como na tia e na avó materna (Figura3.18).



**Figura 3.16 – Mutação c.430\_435delGAGTAT.** Representação parcial da sequência do exão 4 do gDNA do gene *CPT2*, onde está destacada a mutação c.430\_435delGAGTAT em heterozigotia comparada com o controlo normal.

Foi feito o alinhamento da sequência do gene *CPT2* com outras sequências homólogas de diferentes espécies a fim de avaliar a conservação destes aminoácidos recorrendo ao software *ClustalX2* (Figura 3.17).



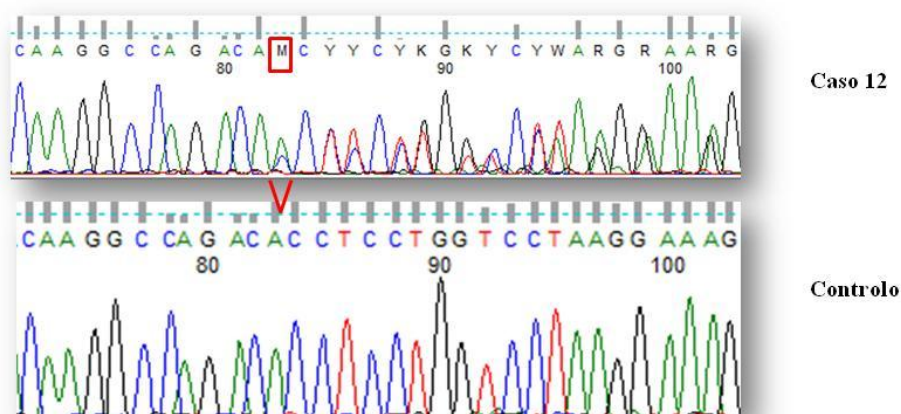
**Figura 3.17 – Representação parcial do alinhamento do gene *CPT2* e de outras espécies evidenciando a conservação dos resíduos de ácido glutâmico e tirosina na posição 144 e 145.**

Verificou-se que estes dois resíduos estão conservados nas várias espécies o que pode sugerir que estes serão críticos para a função desta proteína. Estes resíduos situam-se no domínio N-terminal no loop entre  $\beta 1$  e  $\alpha 6$ . Sabe-se que  $\beta 1$  medeia o contacto juntamente com  $\beta 16$  do domínio principal. Como estes resíduos estão bastante próximos de  $\beta 1$  poderam interferir na estrutura e consequentemente na função da proteína.

### 3.4.3. Mutações com alteração da grelha de leitura (*frameshift*)

#### c.725\_726insA (Caso 12)

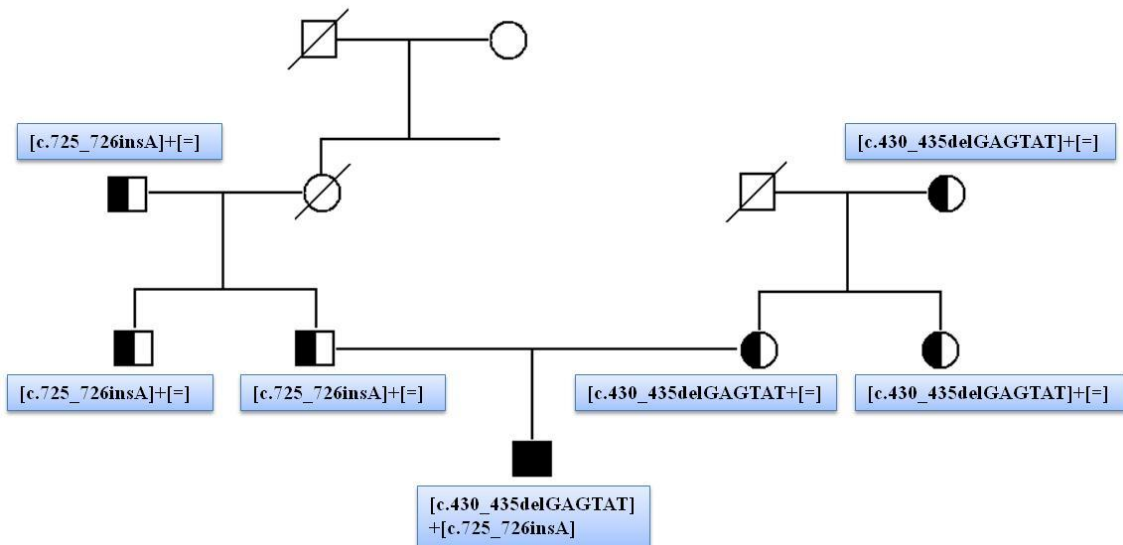
Esta nova alteração foi identificada no caso 12 em heterozigotia no exão 4 (Figura 3.18) e consiste na inserção de uma adenina na posição 242 que faz alterar um resíduo de histidina para um resíduo de glutamina, provoca uma alteração na grelha de leitura e resulta numa inserção de um codão stop 14 codões à frente (p.His242GlnfsX14). Muito provavelmente este transcrito é rapidamente eliminado por um mecanismo de controlo de qualidade da expressão génica chamado mecanismo de decaimento do mRNA mediado por mutações *nonsense* – NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*). Esta alteração provoca provavelmente uma proteína truncada sem qualquer actividade, pois a extensão da proteína truncada não inclui o resíduo catalítico (His372). Esta mutação foi encontrada também no pai, no tio e no avô paterno em condição de portadores.



**Figura 3.18 – Mutação c.725\_726insA.** Representação parcial da sequência do exão 4 do gDNA do gene *CPT2*, onde está destacada a mutação c.725\_726insA em heterozigotia comparada com o controlo normal.

Foi efectuado o doseamento enzimático em fibroblastos cutâneos e este doente que revelou 8.5% de actividade da carnitina palmitoiltransferase 2.

As mutações dos familiares estudados do caso 12 estão representadas no heredograma abaixo (Figura 3.19).



**Figura 3.19 – Heredograma da família do caso 12.**

Neste caso foram encontradas as alterações polimórficas M647V e V368I em heterozigotia. Os elementos da família do lado materno do caso índice apresentaram todos os polimorfismos M647V e V368I e do lado paterno só o avô é portador do polimorfismo V368I.

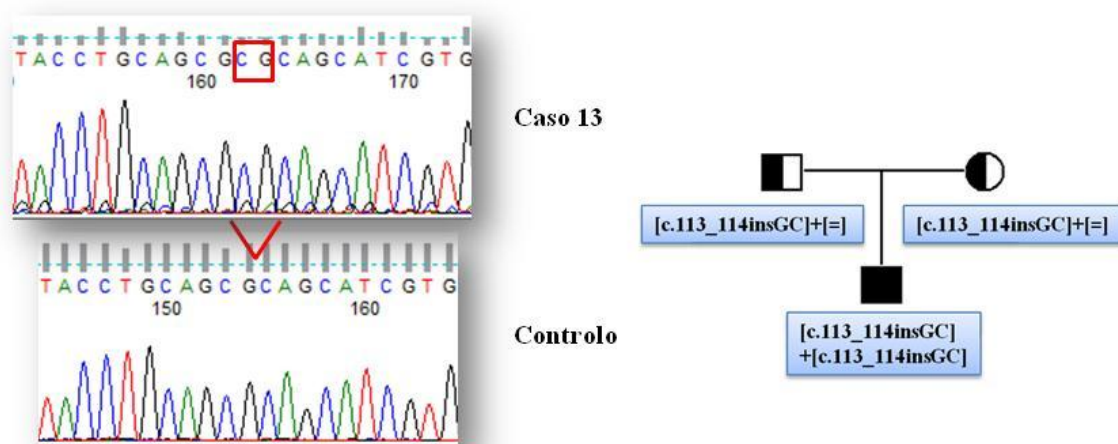
### **c.113\_114insGC (Caso 13)**

No caso 13 foi detectada a inserção GC já descrita no exão 1 em homozigotia (Figura 3.20). A previsão para esta mutação é a alteração da grelha e a introdução de um codão

stop prematuro 36 aminoácidos após o sitio da mutação (p.Ser38fs), resultando numa proteína de 72 aminoácidos em vez de uma de 658 aminoácidos.

Esta proteína severamente truncada deve ser instável e uma vez que lhe falta o domínio catalítico é esperado que seja enzimaticamente inactiva. Esta mutação é uma das poucas a serem identificadas no exão 1. Os pais foram identificados como portadores, o que exclui a possibilidade de hemizigotia.

O fenótipo esperado é grave uma vez que não é previsível a enzima ter qualquer actividade.



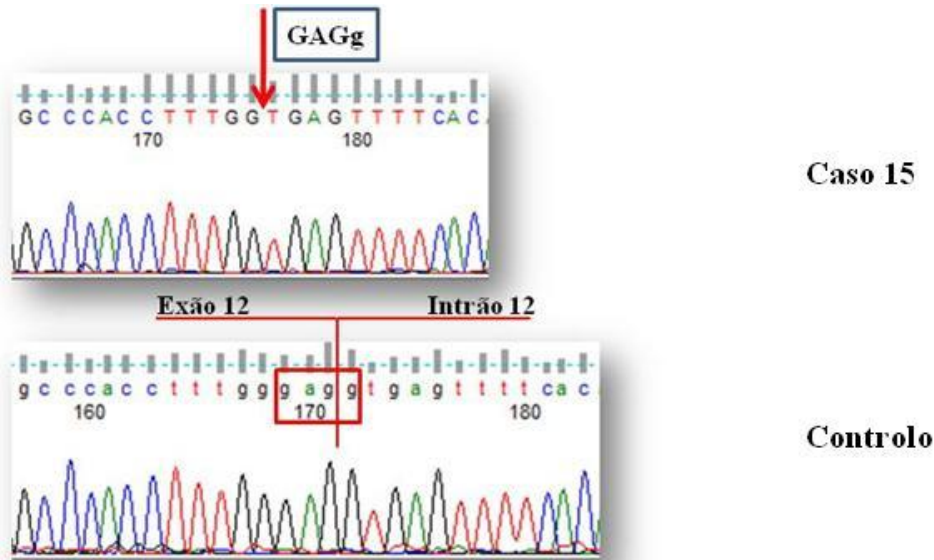
**Figura 3.20 - Mutação c.113\_114insGC.** Representação parcial da sequência do exão 1 do gDNA do gene *CPT2*, onde está destacada a mutação c.113\_114insGC em homozigotia comparada com o controlo normal. Heredograma da família do caso 13.

### 3.5. Mutação encontrada no gene *CPT1A*

#### c.1456-1458+1delGAGg (Caso 15)

Foi identificada uma mutação nova *splicing* em homozigotia, que consiste na deleção do último codão do exão 12 (p.486) mais o primeiro nucleótido g do intrão 12 do local de

consenso de *splicing*, região flangeadora da junção exão 12 - intrão 12 (Figura 3.21). A deleção de 4 pb altera a sequência consenso do sítio dador de *splicing*.



**Figura 3.21 – Mutação c.1456-1458+1delGAGg.** Representação parcial da sequência do exão 12 do gDNA do gene *CPT1A*, onde está destacada a mutação c.1456-1458+1delGAGg em homocigotia comparada com o controlo.

A análise bioinformática através do *Human Splicing Analyser* realizada para a previsão do *score* associado ao local da mutação indicou uma diminuição do *score* de 97.08 para 54.27, que resulta na perda do local dador de *splicing*. Além das sequências consenso referidas anteriormente, existem elementos exónicos e intrónicos que podem ser activadores – *exonic* e *intronic splicing enhancers* (ESEs e ISEs) ou repressores - *exonic* e *intronic splicing silencers* (ESSs e ISSs). A análise permitiu verificar que a alteração está incluída num local ESE e pode comprometer o *splicing* baseando-se na afinidade de proteínas humanas SR (SF2/ASF, SC35, SRp40 e SRp55) para reconhecerem esse local. O resultado da análise neste caso indica que a ligação à proteína SF2/ASF desaparece e a maquinaria de *splicing* pode não reconhecer este local. Muito provavelmente vai ser feito o *skipping* do exão e dar origem a uma proteína alterada. Esta mutação encontra-se numa região conservada que inclui resíduos provavelmente envolvidos no sítio activo. O estudo do cDNA seria útil para esclarecer melhor esta mutação.

Neste caso até à data de conclusão deste trabalho não foi possível ter os pais para estudo molecular. Foi efectuado o doseamento enzimático da acilcarnitina palmitoiltransferase 1 em fibroblastos cutâneos cultivados, que revelou 25% de actividade residual, que reforça a severidade desta mutação.

Este recém-nascido apresentou clínica no período neonatal, tendo lhe sido detectada uma cardiopatia dilatada, hipoglicemia e hipotonia com hepatomegalia ao terceiro dia de vida.

### 3.6. Casos negativos

Nos casos 4 e 14, não foram identificadas mutações nos 10 exões do gene *SLC22A5* e nos 5 exões do gene *CPT2*/9 exões do gene *CACT* respectivamente, bem como nas regiões flangeadoras exão-intrão. O método utilizado de sequenciação genómica pode não ter sido suficiente para detectar mutações que poderiam estar situadas em zonas intrónicas distantes dos locais de consenso de *splicing*, na região promotora e nas regiões não traduzidas (5'-UTR e 3'-UTR) que são zonas reguladoras de gene.

No caso 4 o perfil de acilcarnitinas indiciava que se estaria na presença de um doente com CUD, com base na carnitina livre baixa que apresentava para além do nível baixo de acilcarnitinas de cadeia longa. Foi feito um perfil de acilcarnitinas à mãe para excluir que esta fosse a doente, com base no facto de se saber que a carnitina é transferida da placenta para o feto durante a vida uterina e os níveis de carnitina livre nas crianças reflectirem os níveis das suas mães (Schimmenti *et al.* 2007). A mãe embora tivesse revelado uma carnitina livre normal foi também estudada a nível molecular sem terem sido observadas mutações. Esta criança faleceu com poucos dias de vida sem ter sido divulgada a causa. A razão para esta carnitina baixa pode ser de origem secundária a outras doenças metabólicas com comprometimento da  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos, defeitos da cadeia respiratória ou a excessiva perda renal de carnitina.

No caso 14 o perfil é conducente com CPT2/CACT, como não foram encontradas mutações nestes dois genes, poderemos estar na presença de outra DHM. A razão C16+C18:1/C2 das acilcarnitinas, usada como marcador na avaliação de casos suspeitos de CPT2/CACT estava acima dos valores normais. Esta razão parece ser bastante fiável para

rastrear estes casos, embora tenham sido descritos dois casos na literatura, uma glicogenose tipo Ib e uma criança com hipoglicemia que revelaram esta razão aumentada e sobreponível à distribuição de razões dos doentes com CPT2 (Shigematsu *et al.* 2003). Este caso revelou as alterações polimórficas M647V e V368I.

### 3.7. Correlação fenótipo / genótipo

Foram já descritos heterozigóticos para CUD, portadores de mutações *missense* ou mutações que provocam uma proteína truncada, que consistentemente têm apresentação fenotípica de carnitina livre baixa no sangue. Mutações que bloqueiam o transporte de carnitina *in vitro* são previsíveis de causar um fenótipo de carnitina livre baixa (Komlosi *et al.* 2009). Em contraste foi descrito que a mutação Met179Leu aumentava o transporte de carnitina *in vitro* em células *HEK* (*human embryonic kidney cells*), quando esta mutação num portador apresentava fenótipo de carnitina livre baixa. Este caso implica que deve haver outros mecanismos que reduzem a actividade do transportador da carnitina nomeadamente o efeito dominante negativo (Koizumi *et al.* 1999), que é causado pela interferência da proteína alterada (alelo mutado) na proteína normal produzida (alelo normal) (Zschocke 2008) que pode ser a situação do caso 3 deste estudo. A análise deste caso 3 pode ainda não estar completa devido ao estudo ter sido só feito em gDNA. Também as mães dos casos 5, 6 e 8 na condição de portadoras revelaram níveis de carnitina livre baixos (C0=9.3, C0=7.4, C0=12.6 respectivamente, para um valor de referência de C0>19.24µM), que podem ter haver com o facto de serem portadoras ou com a condição de stress metabólico devido ao parto e à amamentação. Os valores baixos de C0 encontrados nos familiares portadores das mutações c.844C>T e c.695C>T, estão de acordo com a literatura que refere mães heterozigóticas que refletem bioquimicamente uma redução significativa de *uptake* de carnitina nos fibroblastos (Vaz *et al.* 1999). Tem vindo a aumentar o reconhecimento de que mutações em heterozigotia de genes envolvidos na oxidação dos ácidos gordos podem causar sintomas clínicos. Foi descrito um caso de um paciente que era heterozigótico para uma mutação no gene *SLC22A5* e morreu de morte súbita inesperada. Foi demonstrado que tinha actividade reduzida do *uptake* de carnitina. Embora os heterozigóticos para mutações *OCTN2* sejam geralmente saudáveis com

performance cardíaca normal, podem vir a ter risco para cardiomiopatia na presença de factores de risco, como por exemplo a hipertensão (Xiaofei *et al.* 2002; Takahashi *et al.* 2007).

O caso 13 (CPT2) apresentou um quadro grave de hipoglicemia, hiperamonemia e miocardiopatia nos primeiros dias de vida que o fez passar um período de coma. A mutação em homozigotia que lhe foi encontrada previa um caso grave. Neste caso também foram detectadas massas renais bilaterais e alteração da função renal, como tinha já sido descrito na literatura, num caso que tinha sido detectado às 23 semanas de gestação numa ecografia fetal (Elpeleg *et al.* 2001).

As duas mutações novas do caso 12 uma inserção que origina uma proteína truncada e uma deleção de dois codões, foram responsáveis certamente pela baixa actividade residual doseada e poderão ser responsáveis por originar um quadro miopático ou metabólico. O estudo molecular efectuado à família do caso 12 permitiu identificar os portadores e possibilitar tratamento aos sintomáticos, uma vez que estão descritos casos (Orngreen *et al.* 2005).

A enzima CPT1A não se expressa no músculo-esquelético, por isso a apresentação clínica desta doença não inclui normalmente fenótipo miopático ou cardiomiopático como as outras doenças da oxidação dos ácidos gordos de cadeia longa. Contudo o caso 15 com a mutação nova (c.1456-1458+1delGAGg), apresentou logo no período neonatal uma cardiopatia. Na literatura há uma mutação descrita (P479L) também associada a um caso com apresentação predominantemente miopática (Bennett *et al.* 2004). Esta deleção que vai provocar certamente uma mutação *splicing* encontra-se no domínio C-terminal, e como já foi referido, nesta proteína é fundamental a interacção entre os dois locais N-terminal e C-terminal para a sensibilidade ao malonil-CoA, para além de partilharem o mesmo local de ligação á carnitina. A previsão é uma proteína não funcional que não reconhece o substrato.

## CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

---



## 4. CONCLUSÃO

A utilização de MS/MS na detecção dos casos estudados foi fundamental, uma vez que se partiu na grande maioria para a identificação de doentes assintomáticos. Os perfis e os valores obtidos estavam de acordo com o que estava descrito na literatura (Chace *et al.* 2003; Shigematsu *et al.* 2003; Chace and Kalas 2005; Garg and Dasouki 2006).

A implementação do estudo molecular destas patologias contribuiu para se poder fazer um diagnóstico destas crianças de uma forma mais abrangente e informativa, não necessitando de recorrer à biópsia de pele para ter a confirmação definitiva da patologia.

Em situações de mortes súbitas infantis, a cultura de fibroblastos torna-se inviável, então a análise molecular de DNA extraído da autópsia torna-se ideal para confirmar o diagnóstico e poder servir de aconselhamento genético familiar e oferecer pré-natal. Este quadro aplica-se a casos que não foram rastreados em diagnóstico precoce.

Permitiu calcular a frequência destas patologias e assegurar a caracterização da população nascida no período de 4 anos. Com base nos 400.000 recém-nascidos rastreados neste período foi calculada a frequência destas doenças no rastreio neonatal; CUD 1:80.000, CPT1 1:400.000, CPT2 1:200.000. Em termos de estudo molecular, foi um estudo pioneiro nesta área do conhecimento e tornou possível a caracterização destes doentes a partir de uma amostra de sangue seco.

As mutações já descritas encontradas nestes doentes associadas a fenótipos cardíacos e metabólicos permitiram que estes doentes fossem diagnosticados com poucos dias de vida o que contribuirá para um melhor prognóstico da doença. Relativamente às mutações novas encontradas e à tentativa de as correlacionar com o fenótipo esperado, vai ser mais uma contribuição para o entendimento de como as alterações nestes genes são responsáveis da doença.

## **5. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Estudar o defeito deletério das novas mutações que foram identificadas neste estudo recorrendo a estudos de mRNA e cDNA, através de culturas de fibroblastos, que em alguns doentes já foram feitas para efectuar a determinação enzimática residual. Desta forma encontrar também a possível mutação não encontrada em gDNA do caso 3 e 7.

Fazer uma avaliação da carnitina livre nas mães portadoras que revelaram níveis baixos, para poder concluir se estamos em presença de portadoras que manifestam sempre este nível de carnitina, ou este facto ser devido ao stress metabólico do parto e da amamentação.

## **BIBLIOGRAFIA**

---



## 6. BIBLIOGRAFIA

al Aqeel, A. I., M. S. Rashed, et al. (1999). "Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency is a treatable disease." J Inherit Metab Dis **22**(3): 271-5.

Albers, S., D. Marsden, et al. (2001). "Detection of neonatal carnitine palmitoyltransferase II deficiency by expanded newborn screening with tandem mass spectrometry." Pediatrics **107**(6): E103.

Amat di San Filippo, C. and N. Longo (2004). "Tyrosine residues affecting sodium stimulation of carnitine transport in the OCTN2 carnitine/organic cation transporter." J Biol Chem **279**(8): 7247-53.

Amat di San Filippo, C., M. Pasquali, et al. (2006). "Pharmacological rescue of carnitine transport in primary carnitine deficiency." Hum Mutat **27**(6): 513-23.

Amat di San Filippo, C., Y. Wang, et al. (2003). "Functional domains in the carnitine transporter OCTN2, defective in primary carnitine deficiency." J Biol Chem **278**(48): 47776-84.

Arduini, A., G. Zibellini, et al. (2001). "Participation of carnitine palmitoyltransferase in the synthesis of dipalmitoylphosphatidylcholine in rat alveolar type II cells." Mol Cell Biochem **218**(1-2): 81-6.

Bennett, M. J., R. L. Boriack, et al. (2004). "Novel mutations in CPT 1A define molecular heterogeneity of hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency." Mol Genet Metab **82**(1): 59-63.

Bonnefont, J. P., F. Demaugre, et al. (1999). "Carnitine palmitoyltransferase deficiencies." Mol Genet Metab **68**(4): 424-40.

Bonnefont, J. P., F. Djouadi, et al. (2004). "Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects." Mol Aspects Med **25**(5-6): 495-520.

Borthwick, K., V. N. Jackson, et al. (2006). "The mitochondrial intermembrane loop region of rat carnitine palmitoyltransferase 1A is a major determinant of its malonyl-CoA sensitivity." J Biol Chem **281**(44): 32946-52.

Britton, C. H., R. A. Schultz, et al. (1995). "Human liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I: characterization of its cDNA and chromosomal localization and partial analysis of the gene." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(6): 1984-8.

Brivet, M., A. Boutron, et al. (1999). "Defects in activation and transport of fatty acids." J Inherit Metab Dis **22**(4): 428-41.

Burset, M., I. A. Seledtsov, et al. (2000). "Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes." Nucleic Acids Res **28**(21): 4364-75.

Chace, D. H. and T. A. Kalas (2005). "A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing." Clin Biochem **38**(4): 296-309.

Chace, D. H., T. A. Kalas, et al. (2002). "The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism." Annu Rev Genomics Hum Genet **3**: 17-45.

Chace, D. H., T. A. Kalas, et al. (2003). "Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns." Clin Chem **49**(11): 1797-817.

Cheillan, D., S. Cognat, et al. (2004). "[Application of tandem mass spectrometry to neonatal screening of inherited metabolic diseases: focus on present developments]." Ann Biol Clin (Paris) **62**(3): 269-77.

Chen, S., A. Ogawa, et al. (1994). "More direct evidence for a malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase I interaction as a key event in pancreatic beta-cell signaling." Diabetes **43**(7): 878-83.

Cohen, I., F. Guillerault, et al. (2001). "The N-terminal domain of rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 contains an internal mitochondrial import signal and residues essential for folding of its C-terminal catalytic domain." J Biol Chem **276**(7): 5403-11.

Cohen, I., C. Kohl, et al. (1998). "The N-terminal domain of rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 mediates import into the outer mitochondrial membrane and is essential for activity and malonyl-CoA sensitivity." J Biol Chem **273**(45): 29896-904.

Costa, C., J. M. Costa, et al. (2003). "Mutational spectrum and DNA-based prenatal diagnosis in carnitine-acylcarnitine translocase deficiency." Mol Genet Metab **78**(1): 68-73.

Deschauer, M., T. Wieser, et al. (2005). "Muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency: clinical and molecular genetic features and diagnostic aspects." Arch Neurol **62**(1): 37-41.

Di Mauro, S. and P. M. Di Mauro (1973). "Muscle carnitine palmitoyltransferase deficiency and myoglobinuria." Science **182**: 929-931.

Djouadi, F., F. Aubey, et al. (2006). "Potential of fibrates in the treatment of fatty acid oxidation disorders: revival of classical drugs?" J Inherit Metab Dis **29**(2-3): 341-2.

Dobrowolski, S. F., J. T. McKinney, et al. (2005). "Validation of dye-binding/high-resolution thermal denaturation for the identification of mutations in the SLC22A5 gene." Hum Mutat **25**(3): 306-13.

Eaton, S., K. Bartlett, et al. (1996). "Mammalian mitochondrial beta-oxidation." Biochem J **320** ( Pt 2): 345-57.

Elpeleg, O. N., C. Hammerman, et al. (2001). "Antenatal presentation of carnitine palmitoyltransferase II deficiency." Am J Med Genet **102**(2): 183-7.

Esser, V., N. F. Brown, et al. (1996). "Expression of a cDNA isolated from rat brown adipose tissue and heart identifies the product as the muscle isoform of carnitine palmitoyltransferase I (M-CPT I). M-CPT I is the predominant CPT I isoform expressed in both white (epididymal) and brown adipocytes." J Biol Chem **271**(12): 6972-7.

Fernandes, J., J.-M. Saudubray, et al., Eds. (2006). Inborn Metabolic Diseases, springer.

Fingerhut, R., W. Roschinger, et al. (2001). "Hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency: acylcarnitine profiles in blood spots are highly specific." Clin Chem **47**(10): 1763-8.

Finocchiaro, G., F. Taroni, et al. (1991). "cDNA cloning, sequence analysis, and chromosomal localization of the gene for human carnitine palmitoyltransferase." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(2): 661-5.

Garg, U. and M. Dasouki (2006). "Expanded newborn screening of inherited metabolic disorders by tandem mass spectrometry: clinical and laboratory aspects." Clin Biochem **39**(4): 315-32.

Gempel, K., S. Kiechl, et al. (2002). "Screening for carnitine palmitoyltransferase II deficiency by tandem mass spectrometry." J Inherit Metab Dis **25**(1): 17-27.

Giannessi, F., P. Chiodi, et al. (2001). "Reversible carnitine palmitoyltransferase inhibitors with broad chemical diversity as potential antidiabetic agents." J Med Chem **44**(15): 2383-6.

Gobin, S., J. P. Bonnefont, et al. (2002). "Organization of the human liver carnitine palmitoyltransferase 1 gene (CPT1A) and identification of novel mutations in hypoketotic hypoglycaemia." Hum Genet **111**(2): 179-89.

Gobin, S., L. Thuillier, et al. (2003). "Functional and structural basis of carnitine palmitoyltransferase 1A deficiency." J Biol Chem **278**(50): 50428-34.

Greenberg, C. R., L. A. Dilling, et al. (2009). "The paradox of the carnitine palmitoyltransferase type Ia P479L variant in Canadian Aboriginal populations." Mol Genet Metab **96**(4): 201-7.

Hsiao, Y. S., G. Jogl, et al. (2006). "Crystal structure of rat carnitine palmitoyltransferase II (CPT-II)." Biochem Biophys Res Commun **346**(3): 974-80.

Huizing, M., V. Iacobazzi, et al. (1997). "Cloning of the human carnitine-acylcarnitine carrier cDNA and identification of the molecular defect in a patient." Am J Hum Genet **61**(6): 1239-45.

Iacobazzi, V., F. Invernizzi, et al. (2004). "Molecular and functional analysis of SLC25A20 mutations causing carnitine-acylcarnitine translocase deficiency." Hum Mutat **24**(4): 312-20.

Iacobazzi, V., M. A. Naglieri, et al. (1998). "The structure and organization of the human carnitine/acylcarnitine translocase (CACT1) gene2." Biochem Biophys Res Commun **252**(3): 770-4.

Iacobazzi, V., M. Pasquali, et al. (2004). "Response to therapy in carnitine/acylcarnitine translocase (CACT) deficiency due to a novel missense mutation." Am J Med Genet A **126A**(2): 150-5.

Illsinger, S., T. Lucke, et al. (2008). "Carnitine-palmitoyltransferase 2 deficiency: novel mutations and relevance of newborn screening." Am J Med Genet A **146A**(22): 2925-8.

Inano, A., Y. Sai, et al. (2004). "Functional regions of organic cation/carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5): roles in carnitine recognition." Drug Metab Pharmacokinet **19**(3): 180-9.

Indiveri, C., V. Iacobazzi, et al. (1997). "The mitochondrial carnitine carrier protein: cDNA cloning, primary structure and comparison with other mitochondrial transport proteins." Biochem J **321** ( Pt 3): 713-9.

Innes, A. M., L. E. Seargeant, et al. (2000). "Hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency presenting as maternal illness in pregnancy." Pediatr Res **47**(1): 43-5.

Isackson, P. J., M. J. Bennett, et al. (2008). "CPT2 gene mutations resulting in lethal neonatal or severe infantile carnitine palmitoyltransferase II deficiency." Mol Genet Metab **94**(4): 422-7.

Jlst, L., H. Mandel, et al. (1998). "Molecular basis of hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency." J Clin Invest **102**(3): 527-31.

Kerner, J. and C. Hoppel (1998). "Genetic disorders of carnitine metabolism and their nutritional management." Annu Rev Nutr **18**: 179-206.

Kerner, J. and C. Hoppel (2000). "Fatty acid import into mitochondria." Biochim Biophys Acta **1486**(1): 1-17.

Kerner, J. and C. Hoppel, L (2005). "Carnitine Palmitoyltransferase-I and Regulation of Mitochondrial Fatty Acid Oxidation." Monatshefte fur Chemie **136**: 1311-1323.

Koizumi, A., J. Nozaki, et al. (1999). "Genetic epidemiology of the carnitine transporter OCTN2 gene in a Japanese population and phenotypic characterization in Japanese pedigrees with primary systemic carnitine deficiency." Hum Mol Genet **8**(12): 2247-54.

Komlosi, K., L. Magyari, et al. (2009). "Plasma carnitine ester profile in homozygous and heterozygous OCTN2 deficiency." J Inherit Metab Dis.

Kompare, M. and W. B. Rizzo (2008). "Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders." Semin Pediatr Neurol **15**(3): 140-9.

Korman, S. H., H. R. Waterham, et al. (2005). "Novel metabolic and molecular findings in hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency." Mol Genet Metab **86**(3): 337-43.

Lahjouji, K., I. Elimrani, et al. (2002). "A heterozygote phenotype is present in the jvs +/- mutant mouse livers." Mol Genet Metab **76**(1): 76-80.

Lamhonwah, A. M., S. E. Olpin, et al. (2002). "Novel OCTN2 mutations: no genotype-phenotype correlations: early carnitine therapy prevents cardiomyopathy." Am J Med Genet **111**(3): 271-84.

Lamhonwah, A. M. and I. Tein (1998). "Carnitine uptake defect: frameshift mutations in the human plasmalemmal carnitine transporter gene." Biochem Biophys Res Commun **252**(2): 396-401.

Lamhonwah, A. M. and I. Tein (1999). "GFP-Human high-affinity carnitine transporter OCTN2 protein: subcellular localization and functional restoration of carnitine uptake in

mutant cell lines with the carnitine transporter defect." Biochem Biophys Res Commun **264**(3): 909-14.

Longo, N., C. Amat di San Filippo, et al. (2006). "Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle." Am J Med Genet C Semin Med Genet **142C**(2): 77-85.

Lopez-Vinas, E., A. Bentebibel, et al. (2007). "Definition by functional and structural analysis of two malonyl-CoA sites in carnitine palmitoyltransferase 1A." J Biol Chem **282**(25): 18212-24.

Louet, J. F., C. Le May, et al. (2001). "Regulation of liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by hormones and fatty acids." Biochem Soc Trans **29**(Pt 2): 310-6.

Martin, M. A., J. C. Rubio, et al. (2000). "Identification of novel mutations in Spanish patients with muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency." Hum Mutat **15**(6): 579-80.

McGarry, J. D. and N. F. Brown (1997). "The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis." Eur J Biochem **244**(1): 1-14.

Mitchell, G. A., S. Kassovska-Bratinova, et al. (1995). "Medical aspects of ketone body metabolism." Clin Invest Med **18**(3): 193-216.

Morillas, M., E. Lopez-Vinas, et al. (2004). "Structural model of carnitine palmitoyltransferase I based on the carnitine acetyltransferase crystal." Biochem J **379**(Pt 3): 777-84.

Musumeci, O., M. Aguenouz, et al. (2007). "Identification of the infant-type R631C mutation in patients with the benign muscular form of CPT2 deficiency." Neuromuscul Disord **17**(11-12): 960-3.

Ohashi, R., I. Tamai, et al. (2001). "Molecular and physiological evidence for multifunctionality of carnitine/organic cation transporter OCTN2." Mol Pharmacol **59**(2): 358-66.

Olpin, S. E., A. Afifi, et al. (2003). "Mutation and biochemical analysis in carnitine palmitoyltransferase type II (CPT II) deficiency." J Inherit Metab Dis **26**(6): 543-57.

Orngreen, M. C., M. Duno, et al. (2005). "Fuel utilization in subjects with carnitine palmitoyltransferase 2 gene mutations." Ann Neurol **57**(1): 60-6.

Pierre, G., A. Macdonald, et al. (2007). "Prospective treatment in carnitine-acylcarnitine translocase deficiency." J Inherit Metab Dis **30**(5): 815.

Prasad, C., J. P. Johnson, et al. (2001). "Hepatic carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1 A) deficiency in North American Hutterites (Canadian and American): evidence for a founder effect and results of a pilot study on a DNA-based newborn screening program." Mol Genet Metab **73**(1): 55-63.

Price, N., F. van der Leij, et al. (2002). "A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I." Genomics **80**(4): 433-42.

Quintana, L. P. and P. S. Crespo (2001). "Aproximación diagnóstica y tratamiento de los errores innatos de la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos." ANALES ESPAÑOLES DE PEDIATRÍA **55**: 524-534.

Quintana, L. P. and C. Sanjurjo (2006). Alteraciones de la  $\beta$ -oxidación y del sistema carnitina. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. Ergon: 21.

Ramsay, R. R., R. D. Gandour, et al. (2001). "Molecular enzymology of carnitine transfer and transport." Biochim Biophys Acta **1546**(1): 21-43.

Rinaldo, P., D. Matern, et al. (2002). "Fatty acid oxidation disorders." Annu Rev Physiol **64**: 477-502.

Rubio-Gozalbo, M. E., J. A. Bakker, et al. (2004). "Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency, clinical, biochemical and genetic aspects." Mol Aspects Med **25**(5-6): 521-32.

Rufer, A. C., R. Thoma, et al. (2006). "The crystal structure of carnitine palmitoyltransferase 2 and implications for diabetes treatment." Structure **14**(4): 713-23.

- Rytting, E. and K. L. Audus (2008). "Contributions of phosphorylation to regulation of OCTN2 uptake of carnitine are minimal in BeWo cells." Biochem Pharmacol **75**(3): 745-51.
- Saggerson, D. (2008). "Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells." Annu Rev Nutr **28**: 253-72.
- Schimmenti, L. A., E. A. Crombez, et al. (2007). "Expanded newborn screening identifies maternal primary carnitine deficiency." Mol Genet Metab **90**(4): 441-5.
- Schulze, A., M. Lindner, et al. (2003). "Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications." Pediatrics **111**(6 Pt 1): 1399-406.
- Scriver, Beaudet, et al. (2001). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, McGraw Hill.
- Shekhawat, P. S., D. Matern, et al. (2005). "Fetal fatty acid oxidation disorders, their effect on maternal health and neonatal outcome: impact of expanded newborn screening on their diagnosis and management." Pediatr Res **57**(5 Pt 2): 78R-86R.
- Shigematsu, Y., S. Hirano, et al. (2003). "Selective screening for fatty acid oxidation disorders by tandem mass spectrometry: difficulties in practical discrimination." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **792**(1): 63-72.
- Shoji, Y., A. Koizumi, et al. (1998). "Evidence for linkage of human primary systemic carnitine deficiency with D5S436: a novel gene locus on chromosome 5q." Am J Hum Genet **63**(1): 101-8.
- Sigauke, E., D. Rakheja, et al. (2003). "Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: a clinical, biochemical, and molecular review." Lab Invest **83**(11): 1543-54.
- Sim, K. G., J. Hammond, et al. (2002). "Strategies for the diagnosis of mitochondrial fatty acid beta-oxidation disorders." Clin Chim Acta **323**(1-2): 37-58.

Sim, K. G., V. Wiley, et al. (2001). "Carnitine palmitoyltransferase I deficiency in neonate identified by dried blood spot free carnitine and acylcarnitine profile." J Inherit Metab Dis **24**(1): 51-9.

Spiegel, R., A. Shaag, et al. (2007). "Severe infantile type of carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency due to homozygous R503C mutation." J Inherit Metab Dis **30**(2): 266.

Spiekerkoetter, U., G. Huener, et al. (2003). "Silent and symptomatic primary carnitine deficiency within the same family due to identical mutations in the organic cation/carnitine transporter OCTN2." J Inherit Metab Dis **26**(6): 613-5.

Spronsen, F. J., G. P. Smit, et al. (2005). "Inherited metabolic diseases and pregnancy." BJOG **112**(1): 2-11.

Stanley, C. A., S. DeLeeuw, et al. (1991). "Chronic cardiomyopathy and weakness or acute coma in children with a defect in carnitine uptake." Ann Neurol **30**(5): 709-16.

Taggart, R. T., D. Smail, et al. (1999). "Novel mutations associated with carnitine palmitoyltransferase II deficiency." Hum Mutat **13**(3): 210-20.

Takahashi, R., T. Asai, et al. (2007). "Pressure overload-induced cardiomyopathy in heterozygous carrier mice of carnitine transporter gene mutation." Hypertension **50**(3): 497-502.

Tamai, I., R. Ohashi, et al. (1998). "Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2." J Biol Chem **273**(32): 20378-82.

Tamai, I., R. Ohashi, et al. (2000). "Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice." J Biol Chem **275**(51): 40064-72.

Taroni, F., E. Verderio, et al. (1993). "Identification of a common mutation in the carnitine palmitoyltransferase II gene in familial recurrent myoglobinuria patients." Nat Genet **4**(3): 314-20.

- Taroni, F., E. Verderio, et al. (1992). "Molecular characterization of inherited carnitine palmitoyltransferase II deficiency." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(18): 8429-33.
- Tein, I. (2003). "Carnitine transport: pathophysiology and metabolism of known molecular defects." J Inherit Metab Dis **26**(2-3): 147-69.
- Thuillier, L., H. Rostane, et al. (2003). "Correlation between genotype, metabolic data, and clinical presentation in carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2) deficiency." Hum Mutat **21**(5): 493-501.
- Thuillier, L., C. Sevin, et al. (2000). "Genotype/phenotype correlation in carnitine palmitoyl transferase II deficiency: lessons from a compound heterozygous patient." Neuromuscul Disord **10**(3): 200-5.
- Tsuburaya, R., O. Sakamoto, et al. (2009). "Molecular analysis of a presymptomatic case of carnitine palmitoyl transferase capital I, Ukrainian (CPT I) deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening in Japan." Brain Dev.
- Urban, T. J., R. C. Gallagher, et al. (2006). "Functional genetic diversity in the high-affinity carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5)." Mol Pharmacol **70**(5): 1602-11.
- van der Leij, F. R., N. C. Huijkman, et al. (2000). "Genomics of the human carnitine acyltransferase genes." Mol Genet Metab **71**(1-2): 139-53.
- Vaz, F. M., H. R. Scholte, et al. (1999). "Identification of two novel mutations in OCTN2 of three patients with systemic carnitine deficiency." Hum Genet **105**(1-2): 157-61.
- Verderio, E., P. Cavadini, et al. (1995). "Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: structure of the gene and characterization of two novel disease-causing mutations." Hum Mol Genet **4**(1): 19-29.
- Vilarinho, L., H. Rocha, et al. (2006). "Rastreio Neonatal em Portugal: Alargamento a mais treze doenças." Acta Pediatrica Portuguesa **37**: 5.

Vladutiu, G. D., M. J. Bennett, et al. (2000). "A variable myopathy associated with heterozygosity for the R503C mutation in the carnitine palmitoyltransferase II gene." Mol Genet Metab **70**(2): 134-41.

Vockley, J. and D. A. Whiteman (2002). "Defects of mitochondrial beta-oxidation: a growing group of disorders." Neuromuscul Disord **12**(3): 235-46.

Wanders, R. J., P. Vreken, et al. (1999). "Disorders of mitochondrial fatty acyl-CoA beta-oxidation." J Inherit Metab Dis **22**(4): 442-87.

Wang, Y., S. H. Korman, et al. (2001). "Phenotype and genotype variation in primary carnitine deficiency." Genet Med **3**(6): 387-92.

Wang, Y., F. Taroni, et al. (2000). "Functional analysis of mutations in the OCTN2 transporter causing primary carnitine deficiency: lack of genotype-phenotype correlation." Hum Mutat **16**(5): 401-7.

Wang, Y., J. Ye, et al. (1999). "Mutations in the organic cation/carnitine transporter OCTN2 in primary carnitine deficiency." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2356-60.

Wataya, K., J. Akanuma, et al. (1998). "Two CPT2 mutations in three Japanese patients with carnitine palmitoyltransferase II deficiency: functional analysis and association with polymorphic haplotypes and two clinical phenotypes." Hum Mutat **11**(5): 377-86.

Woeltje, K. F., M. Kuwajima, et al. (1987). "Characterization of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system. II. Use of detergents and antibodies." J Biol Chem **262**(20): 9822-7.

woldegiorgis, G., J. Dai, et al. (2005). "Structure-Function Studies with the Mitochondrial Carnitine Palmitoyltransferase I and II." Monatshefte fur Chemie **136**: 1325-1340.

Woldegiorgis, G., J. Shi, et al. (2000). "Functional characterization of mammalian mitochondrial carnitine palmitoyltransferases I and II expressed in the yeast *Pichia pastoris*." J Nutr **130**(2S Suppl): 310S-314S.

Wu, X., W. Huang, et al. (1999). "Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter." J Pharmacol Exp Ther **290**(3): 1482-92.

Wu, X., P. D. Prasad, et al. (1998). "cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family." Biochem Biophys Res Commun **246**(3): 589-95.

Xiaofei, E., Y. Wada, et al. (2002). "Age-associated cardiomyopathy in heterozygous carrier mice of a pathological mutation of carnitine transporter gene, OCTN2." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **57**(7): B270-8.

Yamazaki, N., Y. Shinohara, et al. (1995). "High expression of a novel carnitine palmitoyltransferase I like protein in rat brown adipose tissue and heart: isolation and characterization of its cDNA clone." FEBS Lett **363**(1-2): 41-5.

Zammit, V. A. (2008). "Carnitine palmitoyltransferase 1: central to cell function." IUBMB Life **60**(5): 347-54.

Zschocke, J. (2008). "Dominant versus recessive: molecular mechanisms in metabolic disease." J Inherit Metab Dis **31**(5): 599-618.

Zytkovicz, T. H., E. F. Fitzgerald, et al. (2001). "Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the New England Newborn Screening Program." Clin Chem **47**(11): 1945-55.