



INVESTIGAÇÃO DA FISIOPATOLOGIA DO DANO COGNITIVO DA DEFICIÊNCIA DE MCAD

Clara Beltrão Valente¹; Kamyla Pereira dos Reis²; Caterina Donnini¹; Elen Lima³; Evellyn Cardoso¹; Leidiane Souza³; Vivian Hipólito¹; Viviane Ribeiro¹; Dr. Gustavo da Costa Ferreira⁴; Dr^a. Patrícia Fernanda Schuck⁴; Dr. Hercules Rezende Freitas^{1,4} (orientador)

¹Escola de Ciências da Saúde, Centro Universitário IBMR; ²Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro; ³Escola de Ciências da Saúde, Centro Universitário UNA Jataí, Goiás/GO, Brasil. ⁴Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

RESUMO

A deficiência da desidrogenase de acil-CoA de cadeia média (MCAD) é um distúrbio autossômico recessivo que faz parte do grupo dos Distúrbios da Oxidação dos Ácidos Graxos (DOAG). Indivíduos com deficiência de MCAD possuem redução na capacidade de oxidar ácidos graxos de cadeia média, ocasionando o acúmulo dos lipídios e seus derivados no sangue e em tecidos biológicos. Neste trabalho, foram avaliados os níveis de RNAm do gene ACADM em diferentes tecidos e estruturas do cérebro. Dessa forma, os dados da expressão da MCAD foram coletados, agrupados e analisados. Os dados obtidos neste trabalho auxiliarão no melhor entendimento da fisiopatologia da deficiência da MCAD.

PALAVRAS-CHAVE: ACADM; MCAD; Doenças metabólicas; Erros Inatos do Metabolismo; Neuropatias.

INTRODUÇÃO





A beta- oxidação é um processo catabólico que ocorre no interior da mitocôndria e consiste na principal rota para o metabolismo dos ácidos graxos. Quando o organismo é incapaz de oxidar os ácidos graxos para produzir energia por um mau funcionamento ou ausência de uma enzima específica, acontecem os erros inatos da beta-oxidação dos ácidos graxos (Camandola & Mattson, 2017).

A desidrogenase de acil-CoA de cadeia média (MCAD) é a primeira enzima da beta-oxidação de ácidos graxos de cadeia média e mutações no gene ACADM, que codifica sua expressão, podem causar a deficiência de MCAD, um erro inato do metabolismo na beta-oxidação de ácidos graxos causada por mutações no gene ACADM. É um distúrbio autossômico recessivo que pode ser prejudicial para a função celular e ao metabolismo do corpo todo (Matsubara et al., 1992).

Os ácidos graxos são uma das principais fontes de energia para o coração, o fígado e o músculo e como combustível para o ciclo de Krebs produzindo coenzimas que serão posteriormente utilizadas para a produção de ATP. O seu acúmulo no sangue e em outros tecidos é prejudicial (Merritt & Chang, 1993).

Os pacientes com deficiência de MCAD tem como principais sintomas vômitos, letargia, tremores, convulsões e possuem risco de deficiência de energia, acidose metabólica e hipoglicemia quando expostos a jejum prolongado, podendo evoluir a coma e morte, sendo assim, o tratamento é evitar o jejum prolongado e a suplementação de carnitina quando necessário.

Atualmente existem poucos artigos descrevendo a relevância da oxidação de ácidos graxos para o sistema nervoso central (SNC) e outros tecidos do corpo humano, dificultando o entendimento do impacto da deficiência da MCAD nos mesmos.

No presente trabalho, avaliou-se os níveis de RNAm do gene ACADM em diferentes estruturas cerebrais e tecidos de humanos, roedores e porcos, a interação gênica ao ACADM e as manifestações clínicas associadas ao gene ACADM.

MÉTODOS





Os dados de expressão da MCAD em células e estruturas do sistema nervoso central foram coletados da base de dados *The Human Protein Atlas* (proteinatlas.org), recurso *online* que armazena informações sobre o genoma e o proteoma em diferentes níveis de organização biológica (órgãos, tecidos, células e organelas). Os dados gerados permitem explorar a expressão regional de proteínas de mamíferos, incluindo humanos e roedores. Os dados obtidos foram agrupados de acordo com a região cerebral, o sexo e a faixa etária, normalizados e expressos em nTPM (transcritos por milhão normalizados). Os valores de nTPM obtidos foram calculados em logaritmos de base 10 (log). Para ampliar o alcance do presente projeto e facilitar investigações futuras, desenvolveu-se um *script* de *data scraping* a partir dos arquivos XML extraídos do *The Human Protein Atlas* (HPA-XML parser).

Além da obtenção de dados do *The Human Protein Atlas*, as interações proteína-proteína de MCAD foram exploradas a partir de recursos da base *String* (string-db.org); redes genômicas incluindo MCAD foram investigadas usando a aplicação *geneMANIA* (genemania.org); resultados complementares de expressão de MCAD em diversos tecidos e faixas etárias foram extraídos da base *EMBL-ebi* (*EMBL's European Bioinformatics Institute*, ebi.ac.uk). Finalmente, dados de interesse clínico-funcional foram obtidos da base *OMIM* (omim.org).

Os resultados foram analisados utilizando-se da linguagem R (*R Studio*). A rejeição de hipóteses nulas foi aceita quando o valor de *p* produzido pelos testes de hipótese foi menor que 0,05 (5 %).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Expressão de MCAD no córtex cerebral

Inicialmente, dados do *The Human Protein Atlas* revelaram valores similares de expressão de mRNA para MCAD no córtex cerebral humano ($20 < x < 30$ nTPM), isso quando agrupados por sexo, idade ou hemisfério cerebral (figuras 1-3, respectivamente).



Considerando os resultados indicados, é possível inferir que a expressão de MCAD, ao menos em tecidos neurais de indivíduos adultos, não é diferencialmente expressa em homens ou mulheres e, portanto, não deveria implicar em manifestações clínicas distintas em algum dos sexos. De forma similar, é de se esperar que a fisiopatologia das desordens relacionadas à MCAD venha a emergir de maneira bilateral no córtex. Quanto à expressão por idade, nota-se que, apesar de existir significativa variabilidade em dadas faixas etárias, as medidas de expressão se mantêm consistentemente em torno da tendência central do mRNA no cérebro humano.

Figura 1. Expressão de RNAm (MCAD) em córtex humano, normalizada por sexo.

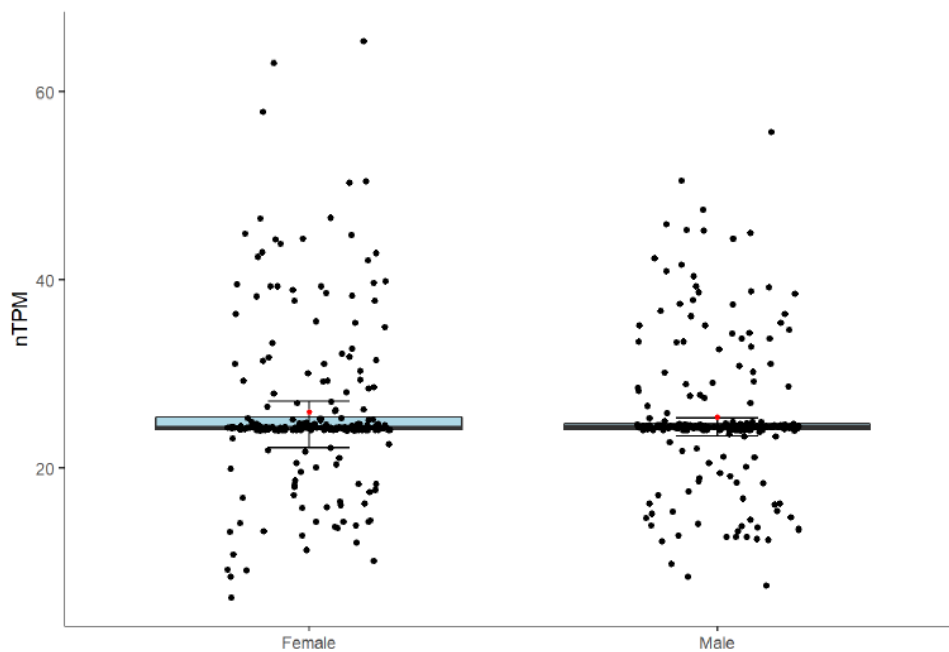


Figura 2. Expressão de RNAm (MCAD) em córtex humano, normalizada por idade.



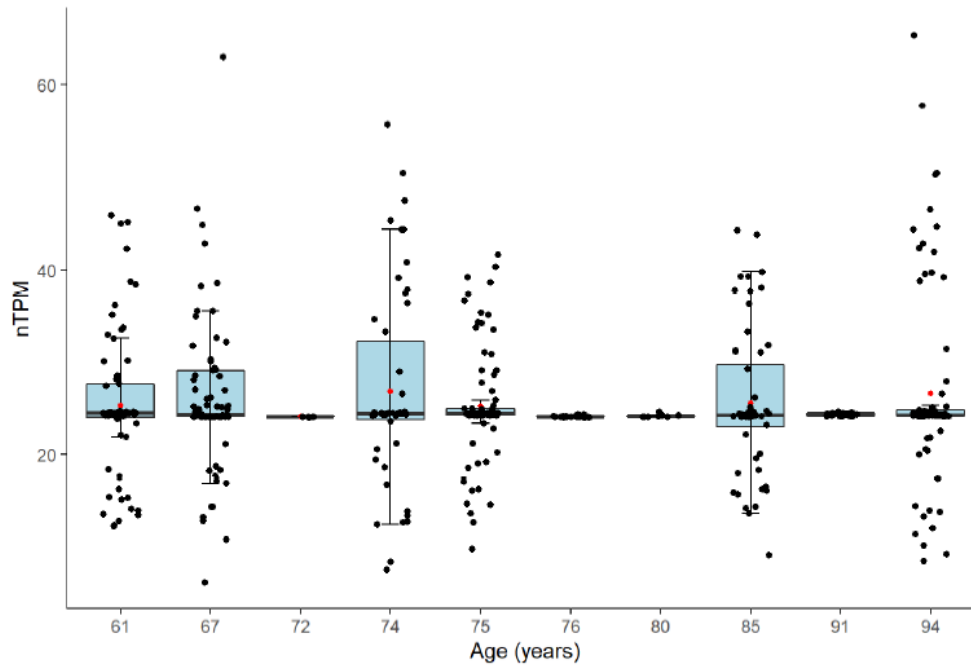
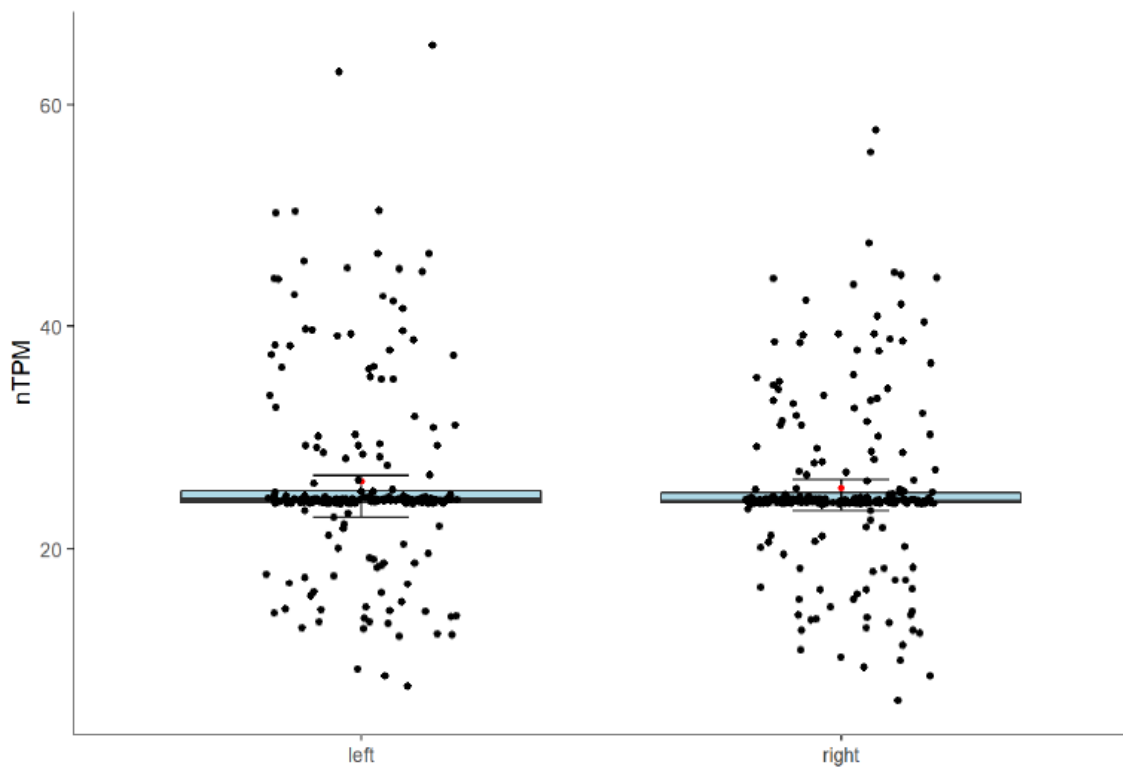


Figura 3. Expressão de RNAm (MCAD) em córtex humano, normalizada por hemisfério.





Quando os dados de expressão cortical foram segmentados por sub-região, por outro lado, constatou-se áreas de expressão consistentemente maior (> 25 nTPM) ou menor (< 22 nTPM) que os valores medianos encontrados no córtex como um todo (figura 4). Como é possível notar na figura 5, as áreas do cérebro de maior expressão são o córtex frontotemporal e os giros orbitofrontal medial, orbitofrontal superior e subcaloso, regiões fortemente vinculadas ao processamento cognitivo, emocional e de tomada de decisões (Fettes et al., 2017).

O córtex frontotemporal está associado ao processamento cognitivo e de emoções. Evidências sugerem que alterações frontotemporais se manifestam em episódios psicóticos de pacientes diagnosticados com esquizofrenia (Gutiérrez-Galve et al., 2010). Ambos os giros orbitofrontais estão associados a perdas funcionais que envolvem neurodegeneração, como a esclerose lateral amiotrófica (Ma et al., 2020). O giro subcaloso, por sua vez, atua como regulador supressivo de respostas amigdalares a estímulos ambientais promotores de ansiedade (Vermetten & Lanius, 2012).

Figura 4. Expressão de mRNA para MCAD em áreas cerebrais em córtex humano.



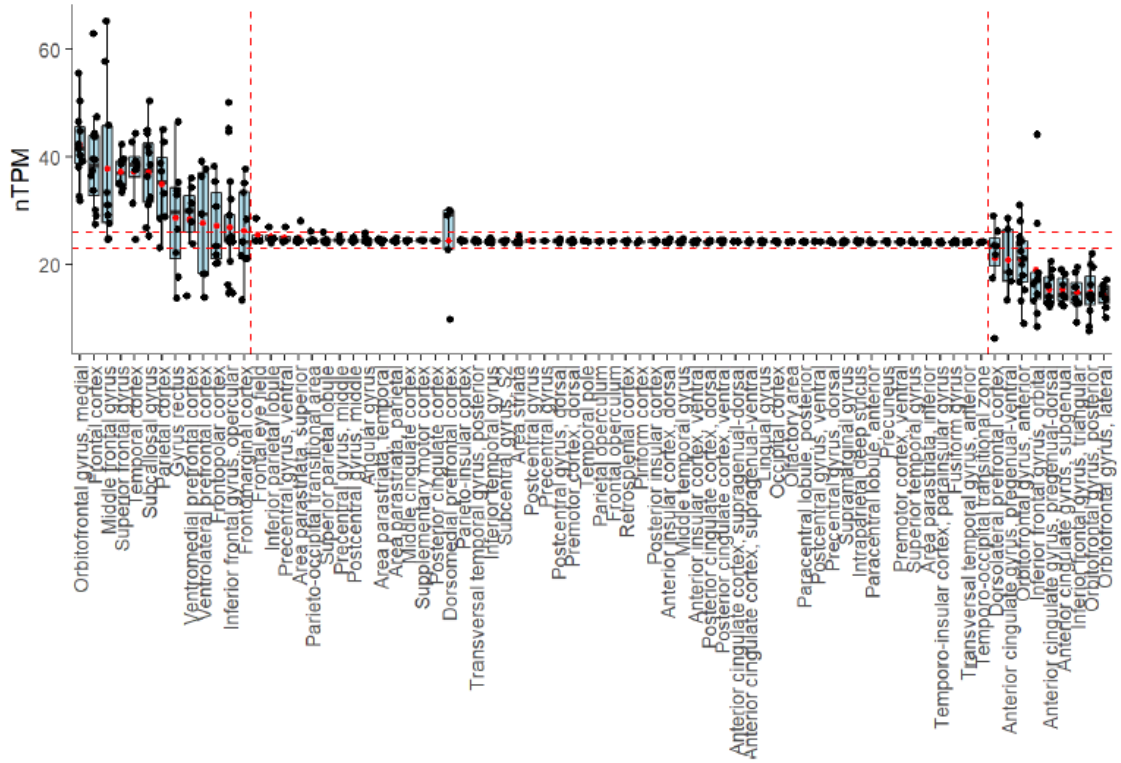
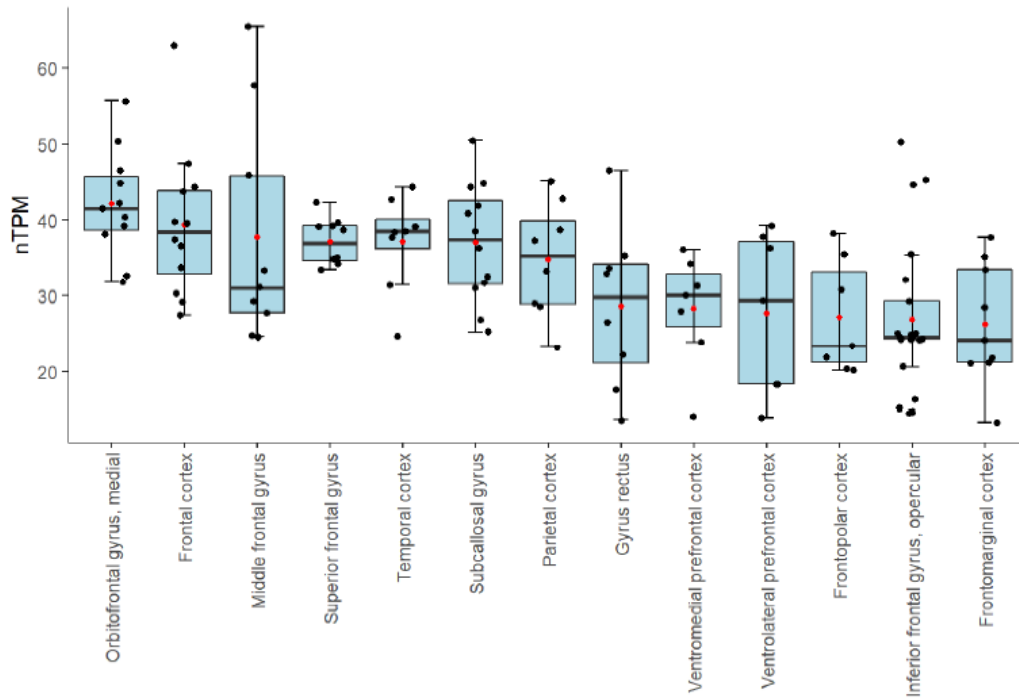


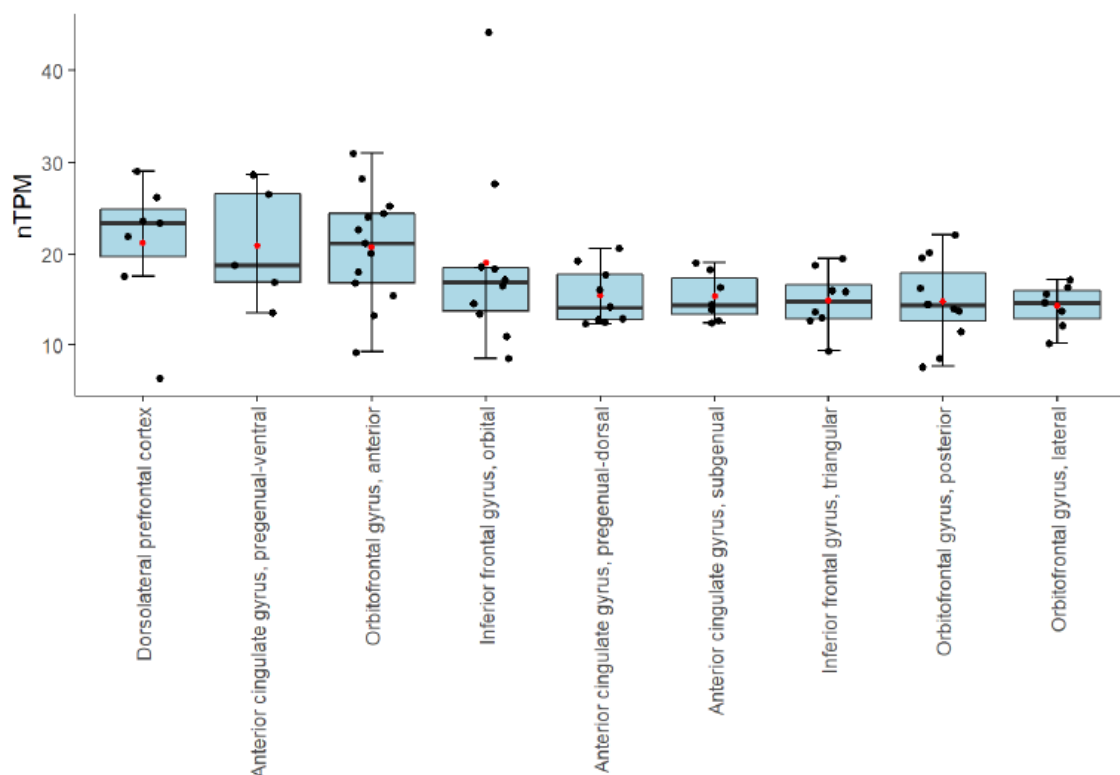
Figura 5. Áreas de maior expressão de mRNA para MCAD no córtex humano.





Por outro lado, a figura 6 indica que as menores expressões do gene ACADM se manifestam nos giros orbitofrontal lateral, posterior, giro inferior frontal triangular e no córtex cingulado anterior subgenual. O segmento lateral do córtex orbitofrontal parece estar relacionado metabolicamente à atividade inibitória sobre os comportamentos de adição (Goldstein et al., 2005). O segmento orbitofrontal posterior, por sua vez, é associado ao processamento de antecipação de ameaça e recompensa (Stawicka et al., 2022). O giro inferior frontal triangular, ou *pars triangularis*, é de importância funcional para a área de Broca, associando-se à compreensão de linguagem proposicional (Foundas et al., 1996). Finalmente, o córtex cingulado anterior subgenual é um importante regulador do humor; lesões nessa área são correlacionáveis a manifestações depressivas e anedonia (Rudebeck et al., 2014).

Figura 6. Áreas de menor expressão de mRNA para MCAD no córtex humano.





Quando comparada a outros organismos, a nTPM do gene ACADM humano é menor que a expressão em camundongos (> 35 nTPM) e maior que a de porcos (< 17 nTPM). A figura 7 apresenta o contraste entre as diferentes espécies (p de Kruskal-Wallis $< 0,0001$ e p de Dunnett $< 0,0001$ para todas as comparações), destacando a maior abundância de dados para tecidos humanos. No caso dos porcos, a maior expressão média de mRNA foi identificada no córtex motor (figura 8), enquanto o córtex frontal foi o mais proeminente em camundongos (figura 9).

Figura 7. Expressão de MCAD em córtex cerebral humano, de porco, e camundongo.

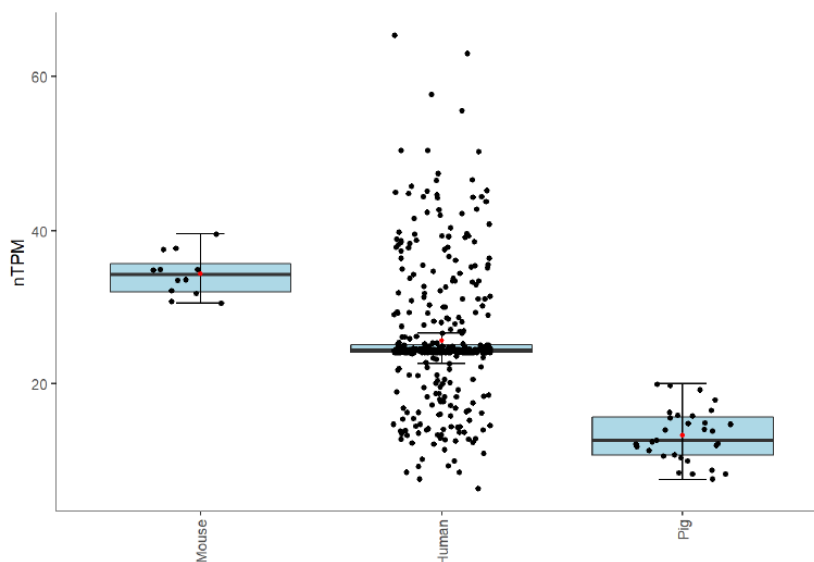


Figura 8. Expressão de RNAm (MCAD) em córtex cerebral de porco.



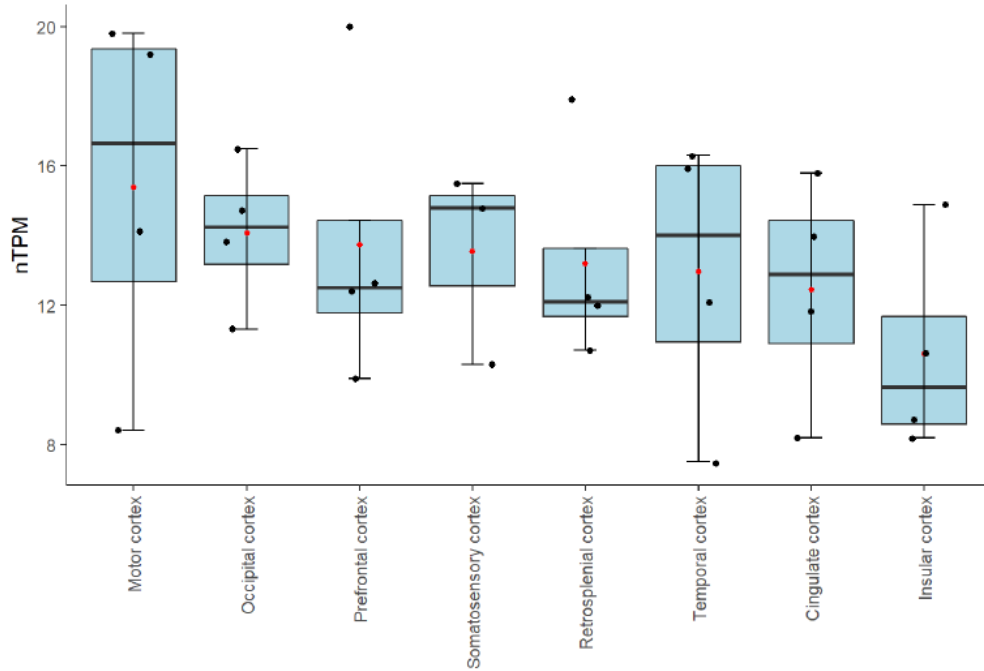
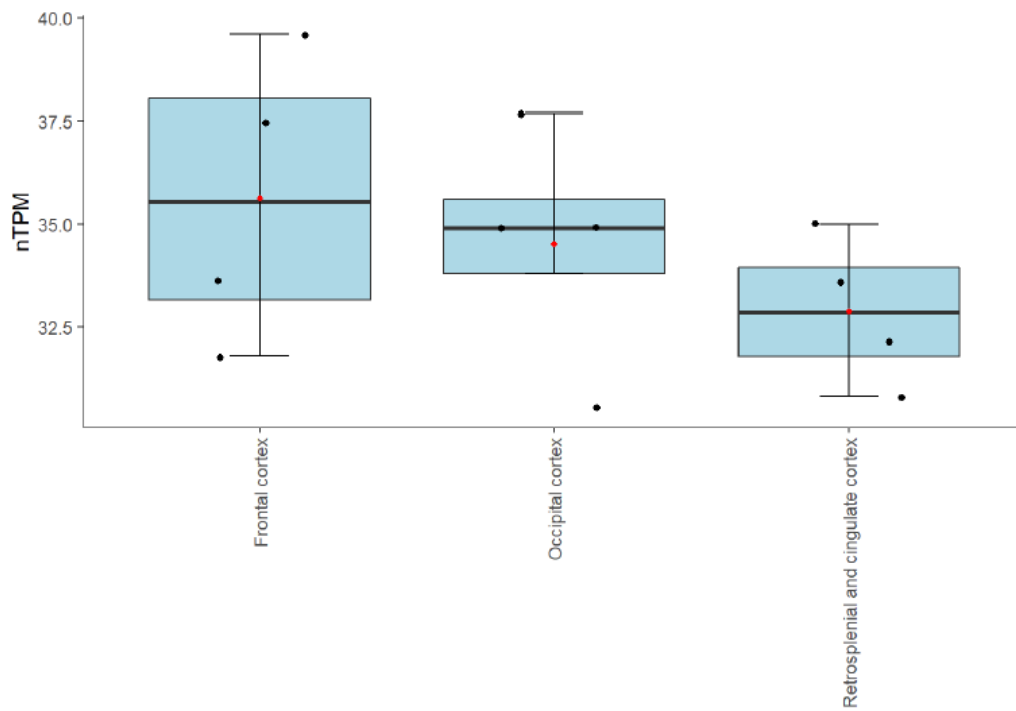


Figura 9. Expressão de RNAm (MCAD) em córtex cerebral de camundongos.



Expressão de MCAD em tecidos periféricos e no desenvolvimento





Além da expressão cortical de MCAD, dados de quantificação de nTPM em tecidos periféricos, durante o desenvolvimento pós-natal, foram analisados neste trabalho. No fígado (figura 10A), a expressão de MCAD parece se elevar de 25 nTPM a mais de 75 nTPM durante o desenvolvimento infantil, variando de maneira significativa durante a vida adulta e no envelhecimento. No coração, a expressão de MCAD permanece consistente entre 50 e 100 nTPM durante a infância, com larga variação na vida adulta e na senilidade (figura 10B). Finalmente, a expressão de MCAD nos rins permanece acima de 50 nTPM durante a infância, reduzindo para menos de 40 nTPM em idade escolar (figura 10C).

Diferente dos tecidos periféricos, a expressão de mRNA para MCAD decresce de forma aguda no tronco cerebral e no cerebelo (figuras 11A e 11B). Em ambos os casos, a expressão na quarta semana pós-natal é maior que 70 nTPM, e decai para menos de 50 nTPM após a 16ª semana pós-natal.

Figura 10. Expressão de RNAm (MCAD) em fígado, coração e rins humanos, por idade.

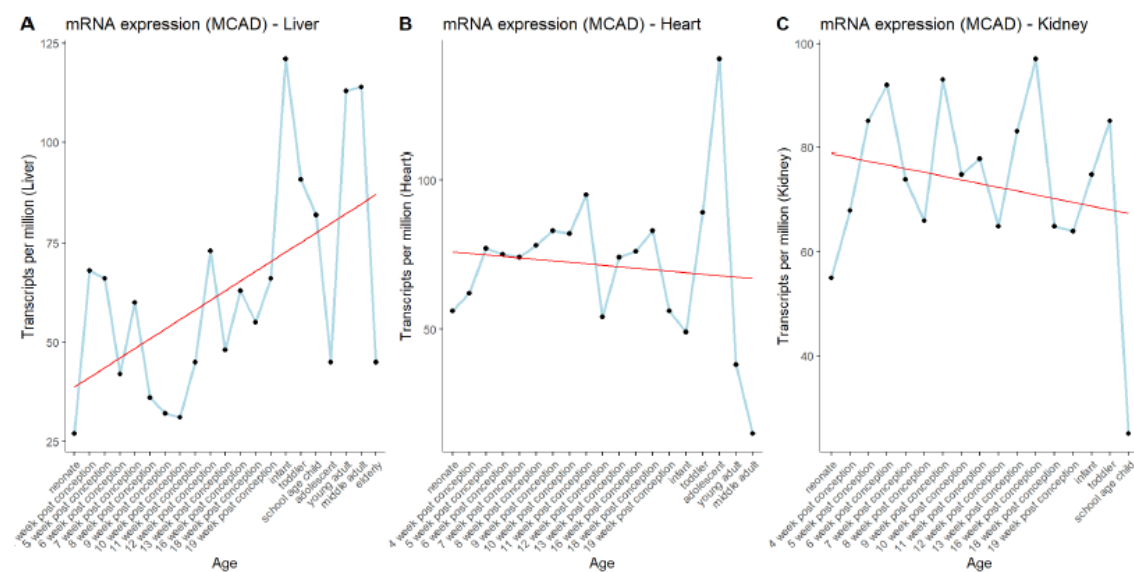
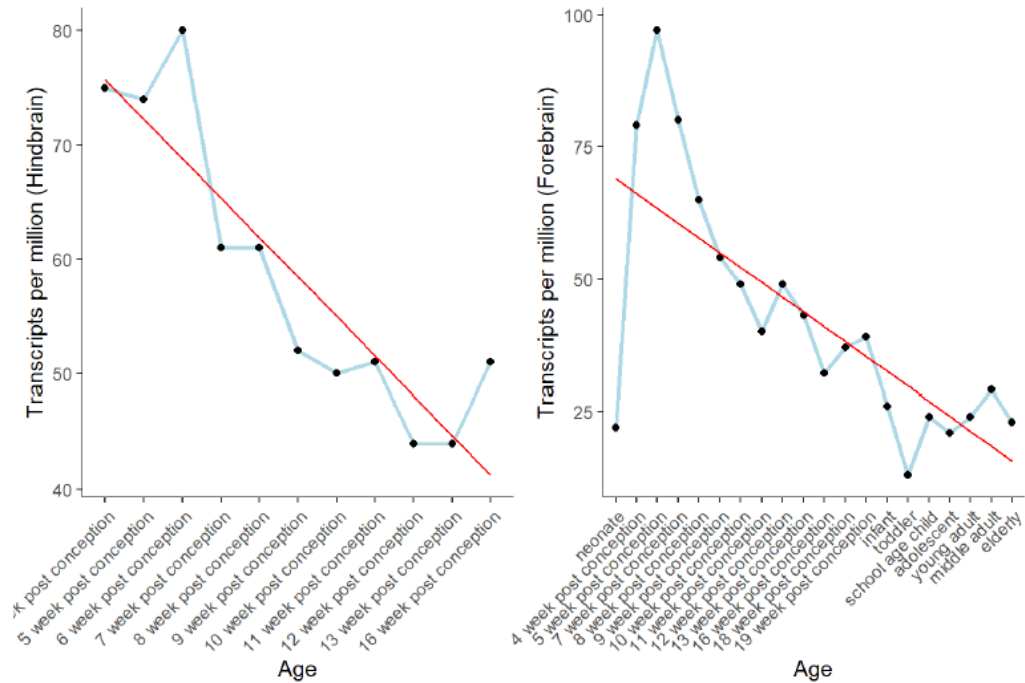


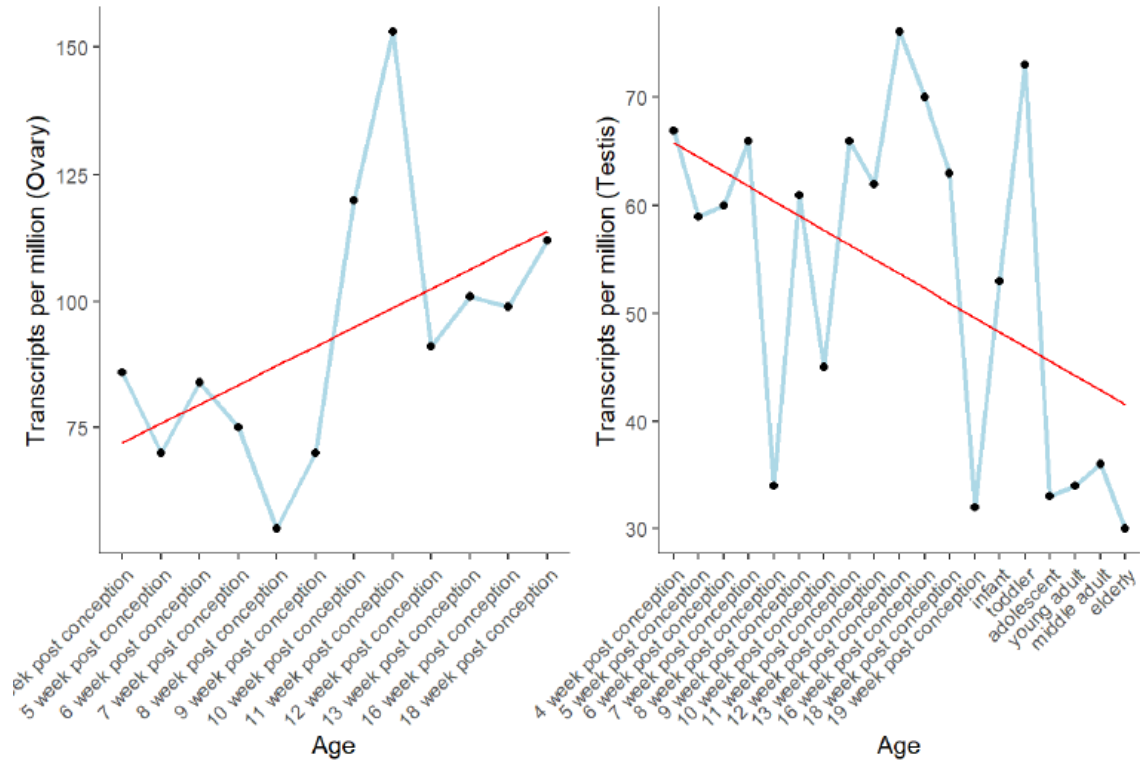
Figura 11. Expressão de RNAm (MCAD) em tronco e cerebelo humano, por idade.



Nos ovários, a expressão de MCAD parece se elevar para acima de 100 nTPM até a décima oitava semana pós-natal (figura 12A). Por outro, a expressão varia de maneira inconsistente durante os primeiros anos de vida e diminui para menos de 40 nTPM após a vida adulta (figura 12B).

Figura 12. Expressão de RNAm (MCAD) em ovário e testículo humanos, por idade.





Interações gênicas com o gene ACADM

Além da expressão de mRNA para MCAD, examinou-se, aqui, as principais interações gênicas com o gene ACADM. Como nota-se na figura 13, uma rede de interações primárias e secundárias (figura 13, esquerda) apresenta os principais genes associados estatística e experimentalmente ao ACADM (figura 13, direita).

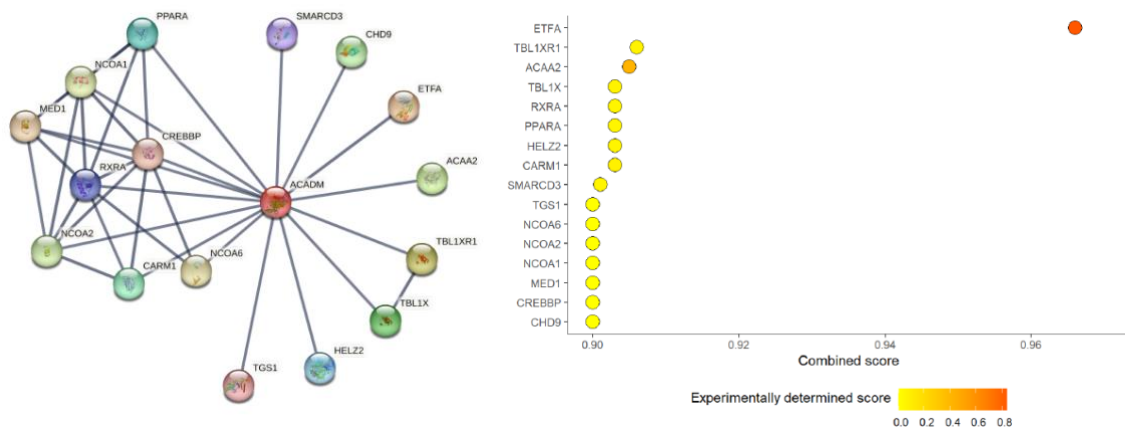
A figura 13, direita, indica o gene ETFA (*i.e.*, *electron transfer flavoprotein alpha*) com o mais fortemente associado ao ACADM (associação estatística e experimental). O gene ETFA expressa a flavoproteína alfa, ou ETF- α , que junto a flavoproteína ETF- β constituem a flavoproteína heterotrimérica transportadora de elétrons (ETF), aceptora de elétrons envolvidos na oxidação de ácidos graxos, aminoácidos, colina e outros substratos metabólicos (Husain & Steenkamp, 1983; Prasun, 1993; Sato et al., 1993).





A proteína ETF é funcional e fisicamente associada à MCAD para assegurar a transferência de elétrons derivado de flavinas, especialmente para mediar o processos de beta-oxidação (Parker, 2003). Complexos instáveis ETF-MCAD estão envolvidos na patogênese de diversas doenças inatas. Além disso, alterações em apenas um resíduo de aminoácido são capazes de elevar a produção de espécies reativas de oxigênio pela ETF (Rodrigues & Gomes, 2012). A enzima acetil-CoA aciltransferase 2, expressa pelo gene ACAA2, também interage de maneira funcionalmente relevante com MCAD, assegurando o bom funcionamento de uma das etapas da espiral de beta-oxidação. Seu funcionamento apropriado parece ser importante para inibir a atividade pró-apoptótica da proteína BNIP3 (Cao et al., 2008).

Figura 13. Resultados da interação gênica ao ACADM.

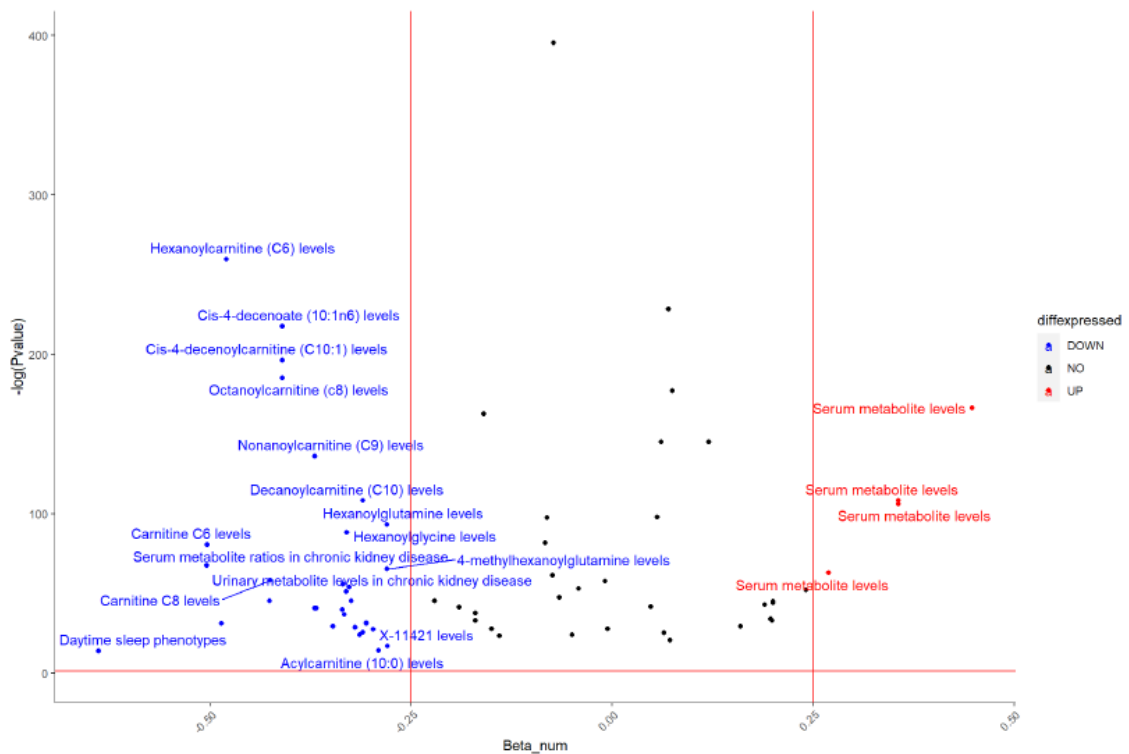


Finalmente, os principais fenótipos associados ao padrão genético ACADM foram identificados na figura 14. A figura, abaixo, ilustra um gráfico de vulcão relacionando o valor de p (como log inverso de p) ao valor da estatística beta.

Como se nota, MCAD está fortemente associado (beta negativo, em azul) a níveis plasmáticos de ácidos graxos e substratos envolvidos nos processos de beta-oxidação, como já observado experimentalmente (Chace et al., 1997). Adicionalmente, MCAD parece estar associado a alterações no sono diurno, possivelmente pelas manifestações de letargia e reflexos hipoglicêmicos do metabolismo em jejum nesses pacientes (Merritt & Chang, 1993).



Figura 14. Fenótipos associadas ao gene ACADM.



CONCLUSÕES

A presente investigação assegurou a análise de padrões de expressão do gene ACADM no córtex cerebral humano, ilustrando que o mRNA para a enzima é diferencialmente expresso em áreas funcionalmente relevantes do cérebro, especialmente aquelas vinculadas ao processamento cognitivo e emocional. Adicionalmente, a expressão de MCAD no tecido humano se mostrou menor que no tecido de camundongos, indicando que modelos experimentais de deficiência devem levar em consideração a maior importância fenotípica dessa proteína para roedores do que para humanos.

Dados sobre a expressão pós-natal de MCAD revelaram, em especial, que o gene está ativo de maneira diferenciada durante o desenvolvimento infantil, e de que sua presença tende a diminuir fortemente durante a vida adulta e o envelhecimento.



Adicionalmente, a expressão do mRNA no tronco cerebral e no cerebelo parece diminuir consistentemente durante as primeiras semanas do período pós-natal.

Dois genes, ETFA e ACAA2, foram identificados como estatística e experimentalmente relevantes para o adequado funcionamento dos mecanismos de oxidação de ácidos graxos e, como indicado na análise de interações gênicas, parecem ser fortemente associados à atividade do gene ACADM. Finalmente, os principais fenótipos associados ao ACADM parecem ter relação com níveis plasmáticos de substratos da espiral de beta-oxidação e com o controle do sono diurno.

REFERÊNCIAS

- Camandola, S., & Mattson, M. P. (2017). Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. *The EMBO Journal*, 36(11), 1474–1492. <https://doi.org/10.15252/emj.201695810>
- Cao, W., Liu, N., Tang, S., Bao, L., Shen, L., Yuan, H., Zhao, X., & Lu, H. (2008). Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 attenuates the apoptotic effects of BNIP3 in two human cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1780(6), 873–880. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.02.007>
- Chace, D. H., Hillman, S. L., Van Hove, J. L., & Naylor, E. W. (1997). Rapid diagnosis of MCAD deficiency: Quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, 43(11), 2106–2113.
- Fettes, P., Schulze, L., & Downar, J. (2017). Cortico-Striatal-Thalamic Loop Circuits of the Orbitofrontal Cortex: Promising Therapeutic Targets in Psychiatric Illness. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnsys.2017.00025>
- Foundas, A. L., Leonard, C. M., Gilmore, R. L., Fennell, E. B., & Heilman, K. M. (1996). Pars triangularis asymmetry and language dominance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(2), 719–722.
- Goldstein, R. Z., Alia-Klein, N., Leskovjan, A. C., Fowler, J. S., Wang, G.-J., Gur, R. C., Hitzemann, R., & Volkow, N. D. (2005). Anger and depression in cocaine addiction: Association with the orbitofrontal cortex. *Psychiatry Research*, 138(1), 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2004.10.002>
- Gutiérrez-Galve, L., Wheeler-Kingshott, C. A. M., Altmann, D. R., Price, G., Chu, E. M., Leeson, V. C., Lobo, A., Barker, G. J., Barnes, T. R. E., Joyce, E. M., & Ron, M.



A. (2010). Changes in the Frontotemporal Cortex and Cognitive Correlates in First-Episode Psychosis. *Biological Psychiatry*, 68(1), 51–60.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.03.019>

Husain, M., & Steenkamp, D. J. (1983). Electron transfer flavoprotein from pig liver mitochondria. A simple purification and re-evaluation of some of the molecular properties. *The Biochemical Journal*, 209(2), 541–545.
<https://doi.org/10.1042/bj2090541>

Ma, X., Lu, F., Chen, H., Hu, C., Wang, J., Zhang, S., Zhang, S., Yang, G., & Zhang, J. (2020). Static and dynamic alterations in the amplitude of low-frequency fluctuation in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *PeerJ*, 8, e10052.
<https://doi.org/10.7717/peerj.10052>

Matsubara, Y., Narisawa, K., & Tada, K. (1992). Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: Molecular aspects. *European Journal of Pediatrics*, 151(3), 154–159. <https://doi.org/10.1007/BF01954373>

Merritt, J. L., & Chang, I. J. (1993). Medium-Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency. In M. P. Adam, D. B. Everman, G. M. Mirzaa, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, K. W. Gripp, & A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1424/>

Parker, A. R. (2003). Binding of the human “electron transferring flavoprotein” (ETF) to the medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) involves an arginine and histidine residue. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 18(5), 453–462. <https://doi.org/10.1080/1475636031000138741>

Prasun, P. (1993). Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency. In M. P. Adam, D. B. Everman, G. M. Mirzaa, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, K. W. Gripp, & A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558236/>

Rodrigues, J. V., & Gomes, C. M. (2012). Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide generation by human electron-transfer flavoprotein and pathological variants. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(1), 12–19.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.016>

Rudebeck, P. H., Putnam, P. T., Daniels, T. E., Yang, T., Mitz, A. R., Rhodes, S. E. V., & Murray, E. A. (2014). A role for primate subgenual cingulate cortex in sustaining autonomic arousal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14), 5391–5396. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317695111>



Sato, K., Nishina, Y., & Shiga, K. (1993). Electron-transferring flavoprotein has an AMP-binding site in addition to the FAD-binding site. *Journal of Biochemistry*, 114(2), 215–222. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124157>

Stawicka, Z. M., Massoudi, R., Oikonomidis, L., McIver, L., Mulvihill, K., Quah, S. K. L., Cockcroft, G. J., Clarke, H. F., Horst, N. K., Wood, C. M., & Roberts, A. C. (2022). Differential Effects of the Inactivation of Anterior and Posterior Orbitofrontal Cortex on Affective Responses to Proximal and Distal Threat, and Reward Anticipation in the Common Marmoset. *Cerebral Cortex*, 32(7), 1319–1336. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhab240>

Vermetten, E., & Lanius, R. A. (2012). Chapter 18—Biological and clinical framework for posttraumatic stress disorder. In M. J. Aminoff, F. Boller, & D. F. Swaab (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 106, pp. 291–342). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52002-9.00018-8>

FOMENTO

O trabalho teve a concessão de Bolsa pelo Programa Ânima de Iniciação Científica ProCiência e apoio financeiro da FAPERJ e CNPQ. Todas as atividades desenvolvidas foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob supervisão da Professora Dra. Patricia Fernanda Schuck.

