



Universidade de Aveiro

2020

**Júlia Alexandra  
Martins Gomes**

**ABORDAGEM AO DIAGNÓSTICO BIOQUÍMICO E  
MOLECULAR DE DOENÇAS HEREDITÁRIAS DO  
METABOLISMO**



**Júlia Alexandra  
Martins Gomes**

**ABORDAGEM AO DIAGNÓSTICO BIOQUÍMICO E  
MOLECULAR DE DOENÇAS HEREDITÁRIAS DO  
METABOLISMO**

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 Doutora Lúcia Lacerda, Geneticista Laboratorial da Unidade de Bioquímica Genética, do Centro de Genética Médica Doutor Jacinto Magalhães-Centro Hospitalar e Universitário do Porto, e da Doutora Catarina Marques, Investigadora do Departamento de Biologia, da Universidade de Aveiro.

## **O júri**

Presidente

**Professor Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves**  
Professor Auxiliar c/ Agregação, Universidade de Aveiro

Arguente

**Doutora Marisa Alexandra Rego Encarnação**  
Investigadora, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

Orientadora

**Doutora Lúcia Maria Wanzeller Guedes de Lacerda**  
Técnico Superior de Saúde-ramo de Genética, Assistente Principal, Centro Hospitalar e  
Universitário do Porto

## **agradecimentos**

Agradeço antes demais aos meus pais, pelo apoio incondicional. Quero deixar os especiais agradecimentos à minha orientadora, Dra. Lúcia, pela orientação, ajuda e o carinho no desenvolvimento deste trabalho. À Dra. Dulce, por me ter confiado a atividade assistencial bioquímica de défices congénitos de glicosilação, e aos restantes membros do laboratório que também ajudaram a concretizar este trabalho.

Por fim, agradeço aos meus amigos pelo apoio e ajuda.

**palavras-chave**

Doenças hereditárias do metabolismo, variações génicas, transferrina deficiente em carboidratos, aminoácidos, ácidos biliares, focagem isoelétrica, cromatografia de troca iónica, sequenciação pelo método de Sanger.

**resumo**

As doenças hereditárias do metabolismo DHM representam coletivamente um dos grupos mais comuns de doenças mendelianas, porque apesar de individualmente raras a sua prevalência coletiva é de cerca de 1 em 1000 nados vivos. Quando existe algum sinal ou característica clínica sugestivas de uma determinada DHM é possível efetuar a investigação metabólica apropriada para o estabelecimento do diagnóstico analítico. A confirmação molecular do diagnóstico é feita por sequenciação dirigida, tendo em vista a oferta de aconselhamento genético, diagnóstico pré-natal e seleção de abordagens terapêuticas às famílias afetadas. Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de procedimentos analíticos conducentes ao diagnóstico de DHM. Para o diagnóstico de aminoacidopatias efetuou-se a quantificação de aminoácidos livres no plasma por cromatografia de troca iónica. Para o diagnóstico de défices congénitos da glicosilação efetuou-se a análise das isoformas de transferrina por focagem isoelétrica. Finalmente, sendo a sequenciação génica uma metodologia essencial num laboratório dedicado ao diagnóstico de doenças genéticas, este trabalho teve também por objetivo o esclarecimento da etiologia molecular bem como o alargamento do espectro mutacional de DHM do grupo dos diabetes tipo MODY e das peroxissomais.

**keywords**

Inborn error of metabolism, gene mutation, carbohydrate deficient transferrin, amino acids, bile acids, isoelectric focusing, ion exchange chromatography, Sanger sequencing.

**abstract**

Inherited metabolic disorders IMD collectively represent one of the most common groups of Mendelian diseases, because despite being individually rare their collective prevalence is about 1 in 1000 live births. If there is any specific clinical or feature to suggest a particular inherited metabolic disease, appropriate metabolic investigations can be performed to support the diagnosis. The molecular confirmation of the diagnosis is made by targeted sequencing, with a view to offering genetic counseling, prenatal diagnosis and selection of therapeutic approaches to affected families.

This work aimed to develop analytical procedures leading to the diagnosis of DHM. For the diagnosis of amino acid diseases, the quantification of free amino acids in plasma was carried out by ion exchange chromatography. For the diagnosis of congenital glycosylation deficits, transferrin isoforms were analyzed by isoelectric focusing. Finally, since gene sequencing is an essential methodology in a laboratory dedicated to the diagnosis of genetic diseases, this work also aimed at clarifying the molecular etiology as well as widening the mutational spectrum of DHM in the group of MODY and peroxisomal ones.

# Índice

<b>Preâmbulo .....</b>	<b>1</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Défices Congênitos da Glicosilação.....</b>	<b>3</b>
1.1    N-glicosilação de proteínas .....	4
1.1.1    Defeitos na N-glicosilação de proteínas .....	6
i.    PMM2-CDG – Deficiência na Fosfomanomutase 2 .....	6
ii.   SLC35A2-CDG – Deficiência no Transportador de UDP-galactose .....	7
1.2    Transferrina: Propriedades e Deficiência em Carboidratos .....	8
<b>2. Aminoacidopatias.....</b>	<b>10</b>
2.1    Fenilcetonúria.....	11
2.2    Leucinose.....	13
2.3    Tirosinemia.....	16
<b>3. Outros Distúrbios Metabólicos Estudados .....</b>	<b>18</b>
3.1    Diabetes tipo MODY.....	18
3.1.1    GCK- MODY – Deficiência na Glucoquinase .....	19
3.2    Deficiência na Síntese dos Ácidos Biliares.....	19
3.2.1    Defeito Congênito na Síntese de Ácidos Biliares tipo 4 .....	20
<b>Abordagens Bioquímicas e Moleculares .....</b>	<b>22</b>
<b>1. Focagem Isoelétrica da Transferrina .....</b>	<b>22</b>
1.1    Obtenção dos Perfis de FIE.....	24
1.1.1    Solução de citrato de ferro (III) a 200 mM .....	24
1.1.2    Solução de coloração .....	24
1.1.3    Solução de descoloração.....	25
1.1.4    Preparação do gel de agarose .....	25
1.1.5    Saturação das amostras em Fe <sup>3+</sup> .....	25

1.1.6	Focagem Isoelétrica.....	26
1.1.7	Imunofixação.....	27
1.1.8	Lavagem e secagem do gel.....	27
1.1.9	Coloração.....	28
1.1.10	Análise da %CDT.....	28
<b>2.</b>	<b>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....</b>	<b>28</b>
2.1	Cromatografia de Troca Iônica.....	29
2.1.1	Cromatografia de Troca Catiônica de Aminoácidos Livres no Plasma .....	30
i.	Resina de Troca Iônica.....	31
ii.	Tampões de Lítio .....	31
iii.	Derivatização com Ninidrina .....	32
2.2	Quantificação de Aminoácidos livres no Plasma por IEC .....	34
2.2.1	Desproteínização do Plasma .....	34
2.2.2	Separação Cromatográfica .....	34
2.2.3	Análise dos Cromatogramas.....	35
<b>3.</b>	<b>Análise Molecular.....</b>	<b>35</b>
3.1	Reação em Cadeia da Polimerase .....	35
3.2	Sequenciação Automática.....	37
3.3	Estudo dos Genes <i>AMACR</i> e <i>GCK</i> .....	37
3.3.1	Amplificação do gDNA.....	38
3.3.2	Análise dos Produtos de DNA amplificados em Gel de Agarose.....	40
3.3.3	Purificação dos Produtos de PCR .....	40
3.3.4	Preparação de PCR Assimétrico para Sequenciação.....	40
3.3.5	Purificação dos Produtos Assimétrico para Sequenciação .....	41
3.3.6	Sequenciação dos Produtos de PCR por Eletroforese Capilar.....	41
3.3.7	Análise dos Cromatogramas de Sequenciação .....	41
	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>42</b>



<b>1. Percentagens Séricas da Transferrina Deficiente em Carboidratos.....</b>	<b>42</b>
<b>2. Cromatogramas de Aminoácidos Livres no Plasma .....</b>	<b>45</b>
<b>3. Estudos Moleculares.....</b>	<b>51</b>
3.1 Estudo do gene GCK .....	51
<b>Conclusão.....</b>	<b>53</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>55</b>

## Índice de Imagens

- Figura 1 | Etapas da síntese de N-glicanos nas vias secretórias.** No RE ocorre a transferência do glicano-lípido precursor ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  ligado a um fosfato dolicol) e a ligação glicosídica da GlcNAc à proteína nascente. Remoção de Glc por  $\alpha$ -glucosidases e de Man por ER  $\alpha$ -manosidases. Nas regiões *cis*, *medial* e *trans* do CG, ocorre a maturação por ação das  $\alpha$ -manosidades, GlcNAc-transferases,  $\beta$ 1,4 galactosiltransferases,  $\alpha$ 2,3 sialiltransferase e  $\alpha$ 2,6 sialiltransferase e produção de N-glicanos híbridos e complexos. Gal: galactose; Glc: glucose; GlcNAc: N-acetilglucosamina; Man: manose; OST: oligossacariltransferase;  $\alpha$ -Glc-I-II:  $\alpha$ -glucosidases I-II; ER  $\alpha$ -Man: ER  $\alpha$ -manosidades;  $\alpha$ -Man I-II:  $\alpha$ -manosidades I-II; GnT-I-IV: GlcNAc-transferases I-IV; Gal-T:  $\beta$ 1,4 galactosiltransferases;  $\alpha$ 2,3, Sialil-T:  $\alpha$ 2,3 sialiltransferase;  $\alpha$ 2,6 Sialil-T:  $\alpha$ 2,6 sialiltransferase<sup>3</sup>..... 5
- Figura 2 | Via da manose na biossíntese de N-glicanos, no citosol.** Representação do defeito citosólico – deficiência na PMM2 – e fosforilação dos açúcares pela ação da hexoquinase. HK: hexoquinase; GMPP: GDP-manose pirofosforilase<sup>11</sup>. Adaptado de Lonlay et al. (2009)..... 7
- Figura 3 | Representação tridimensional da transferrina sérica e dos locais de ligação ao  $\text{Fe}^{3+}$ .** A cadeia polipeptídica rearranja-se para formar 2 lóbulos homólogos - os terminais N e C - unidos por um pequeno péptido. Cada lóbulo divide-se em subdomínios com uma separação entre eles dedicada à ligação de  $\text{Fe}^{3+}$ . A molécula de transferrina consegue desta forma ligar-se a 2 iões de  $\text{Fe}^{3+}$  <sup>25</sup>..... 8
- Figura 4 | Representação das 8 isoformas da transferrina, com a tetrassialotransferrina destacada**<sup>23</sup>..... 9
- Figura 5 | Um guia para os 20 aminoácidos comuns.** Os aminoácidos distinguem-se de acordo com o tipo de estrutura química: alifática, aromática, acídica, básica, hidroxílica, contendo enxofre, amídica; dividem-se em não essenciais e essenciais; são simbolizados por uma abreviação de uma letra e um código de 3 letras; e os codões de DNA que os codificam<sup>27</sup>..... 11
- Figura 6 | Sistema da hidroxilação da fenilalanina.** Mutações no gene *PAH* reduzem a atividade da fenilalanina hidroxilase, resultando na acumulação tóxica no sangue e tecidos (PKU clássica). Alterações nos genes responsáveis pela regeneração e reciclagem do cofator  $\text{BH}_4$  podem reduzir por completo a sua atividade, aumentando os níveis de fenilalanina no sangue e tecidos (PKU variante). Phe: fenilalanina; Tyr: tirosina; PAH: fenilalanina hidroxilase; PCD: pterina-4 $\alpha$ -carbinolamina; DHPR: di-hidrobiopterina redutase; GTPCH: guanósina trifosfato ciclo-hidrolase; PTPS: piruvil tetra-hidropterina sintetase<sup>30</sup>. Adaptado de Nenad et al. (2013) ..... 12
- Figura 7 | Estrutura estereoquímica da (A) allo-isoleucina e (B) isoleucina**<sup>39,40</sup>..... 14

<b>Figura 8   Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada: leucina, isoleucina e valina.</b> BCKDC imprescindível na descarboxilação dos BCAAs leucina, isoleucina e valina e no catabolismo dos cetoácidos. Adaptado de DeArmond et al. (2017).....	15
<b>Figura 9   Processo catabólico da tirosina.</b> A enzima TAT, converte a tirosina em 4-hidroxilfenilpiruvato. 4-HPPD oxida o bioproduto em ácido homogentísico. FAH hidrolisa o ácido fumarilacetoacético em ácido fumárico e ácido acetoacético. Adaptado de Armond et al. (2017). .....	17
<b>Figura 10   Função fisiológica da AMACR no metabolismo peroxissomal. (A)</b> Após a oxidação das cadeias laterais do colesterol, a AMACR catalisa a conversão de (25R)-THCA-CoA em (25S)-THCA-CoA. <b>(B)</b> Depois do ácido fitânico ser oxidado em ácido pristânico, este é convertido no seu (S)-estereoisómero pela AMACR. Adaptado de <sup>55</sup> .....	21
<b>Figura 11   Esquema ilustrativo dos perfis da transferrina por focagem isoelétrica.</b> Os oligossacarídeos da transferrina normal (Ctrl – controlo, linha 1 – pessoas saudáveis) contêm 4 resíduos de ácido siálico (tetrassialotransferrina) em abundância. Em doentes com CDG são reveladas bandas com isoformas adicionais. Os CDG-tipo I (linha 2) exibem um padrão com as bandas dissialo, monossialo e assialotransferrina aumentadas, comparativamente com o Ctrl. Os CDG-tipo II (linha 3) mostram um aumento nas bandas trissialo, monossialo e assialotransferrina, em comparação com Ctrl. À direita, são apresentadas as respetivas isoformas <sup>11</sup> . .....	23
<b>Figura 12   Saturação de amostras com citrato férrico.</b> ....	26
<b>Figura 13   Phast-System.</b> ....	26
<b>Figura 14   Ilustração simplificada da separação molecular por HPLC.</b> As espécies moleculares injetadas, representadas por diferentes cores, encontram-se no começo da coluna. A eluição separa as moléculas de acordo com as propriedades físico-química, em diferentes momentos temporais, tornando-as detetáveis <sup>70</sup> .....	29
<b>Figura 15   Ilustração simplificada de separação iónica.</b> O analito de carga oposta permanece retido na matriz altamente negativa <sup>70</sup> .....	29
<b>Figura 16   Estrutura química da resina unida a grupos sulfatados (SO<sub>3</sub><sup>-1</sup>).</b> Adaptado de Csapó et al. (2008). ....	31
<b>Figura 17   Reação química da ninidrina com um aminoácido.</b> A desaminação oxidativa resulta na libertação de hidridantina, um aldeído com menos um átomo de carbono, amónia e dióxido de carbono. A hidridantina reage com a amónia e outra molécula de ninidrina, produzindo púrpura de Ruhemann a 570 nm <sup>73,75</sup> . ....	33
<b>Figura 18   Exemplo de um cromatograma de padrões de aminoácidos.</b> Adaptado de Phipps et al.	

(2019).....	33
<b>Figura 19   Amino-Acid Analyser.</b> ....	34
<b>Figura 20   Etapas da PCR. (A)</b> Fase de desnaturação. <b>(B)</b> Fase de <i>annealing</i> de <i>primers</i> na posição 5'. <b>(C)</b> Fase de elongação no sentido 5'->3'. Adaptado de Caetano-Anollés (2013).....	36
<b>Figura 21   Eletroferograma por sequenciação pelo método de Sanger</b> <sup>82</sup> .....	37
<b>Figura 22   Perfis das isoformas da Tf sérica de controlos e doentes. (A)</b> Exemplo de um perfil CDG-tipo 1 com alteração no gene <i>PMM2</i> . <b>(B)</b> Exemplo de um perfil CDG-tipo 2 com alteração no gene <i>SCL35A2</i> .....	42
<b>Figura 23   Perfil isoelétrico da transferrina de um doente com DCG-tipo II.</b> ....	44
<b>Figura 24   Perfil isoelétrico da transferrina de um doente com DCG-tipo I.</b> ....	44
<b>Figura 25   Perfil isoelétrico da transferrina de uma pessoa normal - controlo (A).</b> ....	44
<b>Figura 26   Perfil isoelétrico da transferrina de uma pessoa normal - controlo (B).</b> ....	45
<b>Figura 27   Perfil cromatográfico de aminoácidos plasmáticos sem alterações.</b> .....	47
<b>Figura 28   Perfil cromatográfico de aminoácidos plasmáticos em doente com PKU.</b> .....	48
<b>Figura 29   Perfil cromatográfico de aminoácidos plasmáticos em doente com leucinose.</b> .....	49
<b>Figura 30   Perfil cromatográfico de aminoácidos plasmáticos em doente com tirosinemia tipo 3.</b> .....	50
<b>Figura 31   Fragmento do gene GCK amplificado e sequenciado - exão 9 e respetivas zonas intrónicas flanqueantes.</b> .....	51
<b>Figura 32   Eletroferograma de um fragmento do gene GCK, com a variante NM_000162.5(GCK):c.1253+8C&gt;T em heterozigotia.</b> .....	52

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1   Programação do <i>Phast-System</i> na FIE. V: Voltagem; mA: Corrente; Watt: Potência; °C: temperatura de separação.....</b>	<b>27</b>
<b>Tabela 2   Parâmetros químicos dos tampões de lítio<sup>73</sup>.....</b>	<b>32</b>
<b>Tabela 3   Descrição dos <i>primers</i> desenhados para o estudo do gene <i>AMACR</i> (com cauda M13). .....</b>	<b>38</b>
<b>Tabela 4   Descrição dos <i>primers</i> desenhados para o estudo do gene <i>GCK</i> (com cauda M13)....</b>	<b>39</b>
<b>Tabela 5   Percentagem sérica das isoformas da transferrina. ....</b>	<b>43</b>
<b>Tabela 6   Valores de referência de alguns aminoácidos de acordo com a faixa etária. ....</b>	<b>46</b>

## Abreviaturas, siglas, acrónimos e símbolos

<b>AGCML</b>	Ácidos gordos de cadeia muito longa
<b>Asn</b>	Asparagina
<b>BASDs</b>	Deficiências na síntese dos ácidos biliares (bile acid synthesis disorders)
<b>BCAAs</b>	Aminoácidos de cadeia ramificada (branched-chain amino acids)
<b>BCKDC</b>	Complexo cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (branched-chain ketoacid dehydrogenase complex)
<b>BH<sub>4</sub></b>	Cofator tetra-hidrobiopterina
<b>CBB</b>	Coomassie brillante blue
<b>CDG</b>	Défices congénitos da glicosilação (congenital disorders of glycosylation)
<b>CDT</b>	Transferrina deficiente em carboidratos (carbohydrated deficient transferrin)
<b>CG</b>	Complexo de Golgi
<b>CGMJM</b>	Centro de Genética Médica Doutor Jacinto Magalhães
<b>CIEC</b>	Cromatografia de troca catiónica (cationic-exchange chromatography)
<b>ddNTPs</b>	Didesoxinucleótidos trifosfatados
<b>DHCA</b>	Di-hidroxicolestanóico
<b>DHM</b>	Doenças hereditárias do metabolismo
<b>DHPR</b>	Diidropterina redutase
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleotidos trifosfatados
<b>Dol-P</b>	Fosfato de dolicol (dolichol-phosphate)
<b>FAH</b>	Fumarilacetoacetato hidrolase
<b>FIE</b>	Focagem isoelétrica
<b>TIEF</b>	Focagem isoelétrica da transferrina (isoelectric focusing of transferrina)
<b>Gal</b>	Galactose
<b>Glc</b>	Glucose

<b>GlcNAc</b>	N-acetilglucosamina
<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol
<b>GTPCH</b>	Guanosina trifosfato ciclo hidrólase
<b>HPPD</b>	4-hidroxilfenilpiruvato dioxigenase
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência (high performance liquid chromatography)
<b>IEC</b>	Cromatografia de troca iónica (ion-exchange chromatography)
<b>Man-1-P</b>	Manose-1-fosfato
<b>Man-6-P</b>	Manose-6-fosfato
<b>MODY</b>	Maturity-Onset Diabetes of the Young
<b>MSUD</b>	Leucinose (maple syrup urine disease)
<b>N</b>	Azoto
<b>NGS</b>	Sequenciação de última geração (next generation sequencing)
<b>OST</b>	Oligossacariltransferase
<b>PAH</b>	Fenilalanina hidroxilase
<b>PCD</b>	Pterin-4- $\alpha$ -carbinolamina desidratase
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)
<b>PI</b>	Ponto isoelétrico
<b>Phe</b>	Fenilalanina (phenylalanine)
<b>PKU</b>	Fenilcetonúria (Phenylketonuria)
<b>PMM2</b>	Fosfomanomutase 2 (phosphomannomutase 2)
<b>PTPS</b>	6-piruvoil tetra hidropterina sintetase
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>SNP</b>	Polimorfismo de um único nucleótido (single nucleotide polymorphism)
<b>TEA</b>	Tampão Tris-Acetato-EDTA
<b>TAT</b>	Tirosina aminotransferase

<b>Tf</b>	Transferrina
<b>THCA</b>	Tri-hidroxicolestanóico
<b>Tyr</b>	Tirosina (tyrosine)
<b>UGT</b>	Transportador de UDP-galactose (UDP-galactose translocator)
<b>VUS</b>	Variantes de significado desconhecido (variant of uncertain significance)
<b>WES</b>	Sequenciação de exoma (whole exome sequencing)
<b>WGS</b>	Sequenciação do genoma (whole genome sequencing)
<b>% CDT</b>	Porcentagem de transferrina deficiente em carboidratos
<b>mM</b>	MiliMoles
<b>pmol</b>	Picomoles
<b>µl</b>	Microlitros
<b>µmol/L</b>	Micromoles/litros



## Preâmbulo

Os médicos definem e classificam as doenças de acordo com as manifestações mais proeminentes, especialmente dos sistemas de órgãos. Atualmente, focam-se na causa molecular e no papel que desempenham na patofisiologia, na atribuição dos nomes às doenças<sup>1</sup>.

A medicina genómica utiliza a análise genotípica para melhorar a qualidade dos cuidados médicos, nas vertentes de identificação pré-sintomática de suscetibilidade ou predisposição para determinadas doenças, estabelecimento de correlação com o fenótipo, intervenção preventiva pré-sintomática e seleção de abordagens terapêuticas. Desta forma, a análise genotípica tornou-se uma prática fundamental no diagnóstico, no aconselhamento e na gestão clinico-terapêutica das doenças mendelianas, onde um único gene desempenha um papel decisivo na determinação da doença<sup>2</sup>.

As doenças hereditárias do metabolismo são na sua grande maioria doenças monogénicas. Estas doenças apresentam um padrão de transmissão mendeliano, que tanto podem ser classificadas como autossómicas recessivas, autossómicas dominantes ou ligadas ao cromossoma X. São agrupadas de acordo com o sistema homeostático e metabolitos envolvidos na causa direta da doença, como os grandes grupos de defeitos no metabolismo de moléculas complexas (como por exemplo os défices congénitos de glicosilação, as doenças peroxissomais e as doenças do armazenamento lisossomal), o grande grupo de doenças que originam intoxicações agudas (como por exemplo as aminoacidopatias, as doenças do ciclo da ureia e acidemias orgânicas) e ainda o grande grupo das deficiências energéticas (como por exemplo os distúrbios na oxidação de ácidos gordos, as doenças mitocondriais e as doenças no metabolismo do piruvato e da gluconeogénese)<sup>3,4</sup>.

As DHM são determinadas pela alteração de um gene e a produção de uma proteína anormal ou insuficiente, que conduzem a uma acumulação tóxica de metabolitos ou à deficiência do produto final no organismo<sup>5,4</sup>. Apesar de individualmente raras, no seu conjunto constituem coletivamente mais de 1000 DHM, um grupo significativo de doenças genéticas de elevada morbidade e mortalidade, sobretudo na infância. Do ponto de vista epidemiológico verifica-se uma maior prevalência e incidência em grupos populacionais fechados ou etnias onde ocorre consanguinidade<sup>3,5</sup>.

De modo geral, a apresentação clínica inclui manifestações multissistémicas, de evolução crónica e progressiva podendo ser eventualmente identificadas numa fase tardia<sup>3,4</sup>.

Embora a maior parte das DHM não tenham tratamento, existem já abordagens terapêuticas para algumas delas, como sejam o transplante de medula óssea, a suplementação enzimática, a terapêutica com moléculas chaperonas ou moléculas inibidoras da síntese endógena de substrato e mais recentemente a terapia génica, esta ainda em fase de ensaios clínicos. Para algumas das DHM o diagnóstico precoce permite instituir restrição dietética<sup>6</sup>.

O CHUP é centro de referência nacional e europeu (rede MetabERN) para o diagnóstico e tratamento de algumas das DHM.

Nesta monografia descrevem-se abordagens de diagnóstico bioquímico e molecular de DHM, utilizadas na atividade assistencial da Unidade de Bioquímica Genética, do Centro de Genética Médica Jacinto Magalhães no CHUP. O trabalho de estágio laboratorial consistiu na aplicação das seguintes abordagens metodológicas:

- Focagem isoelétrica da transferrina sérica para diagnóstico de défices congénitos de glicosilação;
- Quantificação de aminoácidos livres plasmáticos por cromatografia de troca iónica, para diagnóstico de aminoacidopatias;
- Amplificação e sequenciação para o diagnóstico molecular de diabetes tipo MODY e doenças peroxissomais.

A monografia está dividida em 5 capítulos, que incluem, depois deste primeiro, uma introdução às diferentes DHM estudadas e um terceiro capítulo com as metodologias experimentadas no diagnóstico laboratorial. No quarto capítulo é feita uma apresentação e discussão de resultados e no último e quinto capítulo apresentam-se algumas conclusões sobre o interesse prático do trabalho desenvolvido.

## Introdução

Neste capítulo apresenta-se uma breve revisão sobre as patologias estudadas sob o ponto de vista analítico, nomeadamente os défices congénitos de glicosilação, as aminoacidopatias, os diabetes tipo MODY e as doenças peroxissomais.

### 1. Défices Congénitos da Glicosilação

Os défices congénitos da glicosilação (CDG) representam um grande grupo de doenças raras maioritariamente de transmissão autossómica recessiva, causadas por alterações em genes que afetam a biossíntese de glicoconjugados<sup>7,8</sup>.

Os glicoconjugados são formados durante o processo de glicosilação pela adição de cadeias de açúcares (glicanos) a moléculas proteicas e lipídicas, reorganizadas em estruturas dinâmicas com funções moduladoras da estrutura tridimensional das biomoléculas, assim como importantes funções fisiológicas. Os glicoconjugados podem ser glicoproteínas, glicolípidos, proteoglicanos e âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI)<sup>9,10,11</sup>.

A glicosilação é um processo enzimático que envolve modificações pós-traducionais de proteínas em várias etapas, no citoplasma, retículo endoplasmático (RE) e complexo de Golgi (CG). Ao longo do processo intervêm glicosiltransferases e glicosidases, que respetivamente adicionam e removem resíduos de açúcares, sendo este processo resultado de passos enzimáticos consecutivos, condicionados pela disponibilidade do substrato. Desta forma, a ocorrência de alterações em cada um destes níveis origina os defeitos na glicosilação<sup>9</sup>.

Os CDG apresentam um fenotipo bastante alargado, podendo afetar apenas um órgão ou vários sistemas de órgãos, prejudicando o desenvolvimento neurológico, muscular, endócrino, ósseo, oftalmológico, hematológico e o sistema hepático, entre outros<sup>7,12</sup>. Deste modo, são conhecidos mais de 110 CDG, categorizados de acordo com o tipo de defeito: N-glicosilação de proteínas; O-glicosilação de proteínas; glicosilação lipídica e glicosilação de âncoras de glicosilfosfatidilinositol; e defeitos em múltiplas vias de glicosilação e outras vias<sup>11</sup>.

Defeitos na N-glicosilação de proteínas são o principal tipo de CDG. Inicialmente, foram classificados como tipo 1 (CDG-I, defeitos na síntese/ligação) e tipo 2 (CDG-II, defeitos no processamento), mas atualmente a classificação baseia-se no nome do gene afetado seguido de “-

CDG”, abrangendo também as restantes categorias de CDG<sup>7,11,12</sup>.

### 1.1 N-glicosilação de proteínas

A N-glicosilação consiste na adição de glicanos a um átomo de azoto (N) nas cadeias laterais de asparagina (Asn) localizadas na região *consensus* Ans-X-Ser/Tre<sup>i</sup> da proteína nascente<sup>9</sup>.

Na região citoplasmática do RE forma-se inicialmente um lípido precursor composto por um núcleo ramificado de carboidratos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) e manose (Man) associado a um fosfato dolicol (Dol-P). Depois do lípido precursor ser transposto para o lúmen do RE são adicionados resíduos de manose e glucose (Glc), criando uma estrutura com 3 resíduos de glucose, 9 resíduos de manose e 2 resíduos de N-acetilglucosamina – Glc3Man9GlcNAc2. Quando a estrutura Dol-P-glicano é finalizada, uma oligossacariltransferase (OST) transfere o glicano para a proteína em formação na região *consensus*. De seguida, o glicoconjugado é sujeito a um controlo de qualidade envolvendo a eliminação dos resíduos de glucose (**Figura 1**)<sup>9</sup>.

A glicoproteína é seguidamente transferida para o CG, onde na região *cis* são removidos resíduos de manose e na região *media* e *trans* o glicoconjugado é reprocessado com a adição de GlcNAc, galactose (Gal), ácido siálico e fucose, formando N-glicanos híbridos e complexos. Os n-glicanos híbridos consistem num N-glicano parcialmente processado e composto por resíduos de manose e uma antena com GlcNAc. Os N-glicanos complexos apresentam entre duas a quatro antenas, podendo ter uma GlcNAc bisetada. Contudo, a composição final do N-glicano específico de um dado compartimento celular é influenciada pelos níveis de expressão de glicotransferases, pelo acesso aos locais de glicosilação e pelo tempo que a glicoproteína permanece no ER e CG<sup>9</sup>.

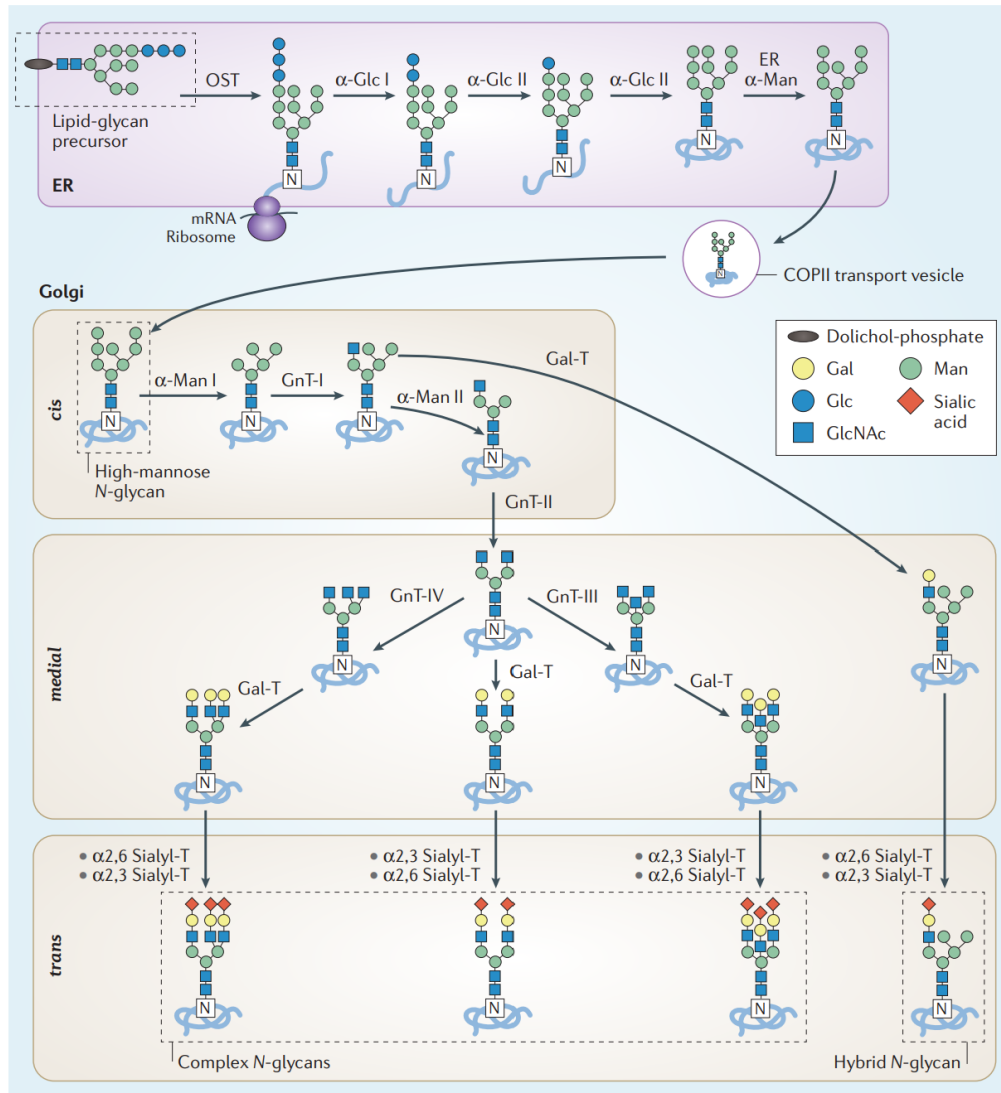
Posto isto, a ocorrência de defeitos na síntese/ligação de lípido-glicanos, no citosol e no retículo endoplasmático, são designados de CDG-tipo 1<sup>11,13</sup>. Por outro lado, erros durante a processamento de glicanos, no complexo de Golgi, são denominados de CDG-tipo 2<sup>14</sup>.

Dado o exposto os efeitos na N-glicosilação estão então associados à deficiência na síntese de N-glicanos, resultando em última instância na incorporação insuficiente de resíduos de ácido siálico em inúmeras glicoproteínas séricas<sup>12</sup>. A transferrina sérica é uma glicoproteína em abundância no organismo humano e, por esse motivo, torna-se fundamental no diagnóstico laboratorial deste tipo

---

<sup>i</sup> X representa qualquer aminoácido, exceto a prolina (Pro)

de CDG, sendo utilizada como um biomarcador bastante preciso na separação das glicofórmulas por focagem isoelétrica (FIE)<sup>11,12</sup>.



**Figura 1 | Etapas da síntese de N-glicanos nas vias secretórias.** No RE ocorre a transferência do glicano-lípido precursor ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  ligado a um fosfato dolícol) e a ligação glicosídica da GlcNAc à proteína nascente. Remoção de Glc por  $\alpha$ -glucosidases e de Man por ER  $\alpha$ -manosidases. Nas regiões *cis*, *medial* e *trans* do CG, ocorre a maturação por ação das  $\alpha$ -manosidases, GlcNAc-transferases,  $\beta$ 1,4 galactosiltransferases,  $\alpha$ 2,3 sialiltransferase e  $\alpha$ 2,6 sialiltransferase e produção de N-glicanos híbridos e complexos. Gal: galactose; Glc: glucose; GlcNAc: N-acetilglucosamina; Man: manose; OST: oligossacariltransferase;  $\alpha$ -Glc I-II:  $\alpha$ -glucosidases I-II; ER  $\alpha$ -Man: ER  $\alpha$ -manosidases;  $\alpha$ -Man I-II:  $\alpha$ -manosidases I-II; GnT-I-IV: GlcNAc-transferases I-IV; Gal-T:  $\beta$ 1,4 galactosiltransferases;  $\alpha$ 2,3, Sialil-T:  $\alpha$ 2,3 sialiltransferase;  $\alpha$ 2,6 Sialil-T:  $\alpha$ 2,6 sialiltransferase<sup>3</sup>.

### 1.1.1 Defeitos na N-glicosilação de proteínas

Os defeitos na N-glicosilação de proteínas são numerosos e esta classificação inclui o gene que pela presença de variantes patogênicas provoca alterações na via metabólica dando origem a um quadro clínico.

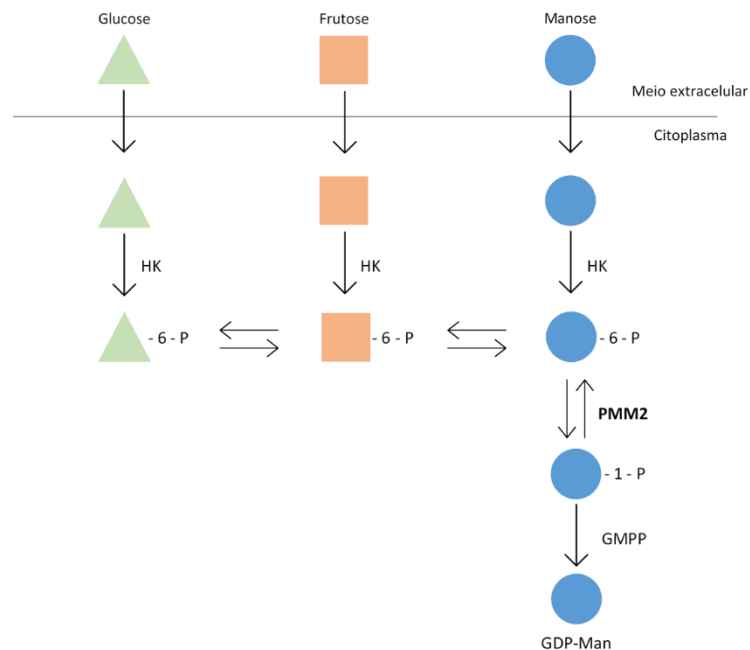
#### i. PMM2-CDG – Deficiência na Fosfomanomutase 2

A forma mais prevalente de CDG designa-se por PMM2-CDG (OMIM #212065), e resulta de alterações no gene que codifica a enzima fosfomanomutase 2 (*PMM2*, OMIM \*601785), que desempenha um papel essencial na biossíntese de N-glicanos<sup>9,15</sup>.

No citosol, inicialmente ativada pela frutose-6-fosfato, a PMM2 catalisa a conversão da manose-6-fosfato (Man-6-P) em manose-1-fosfato (Man-1-P). A Man-1-P é um precursor da síntese de GDP-Man (guanosinadifosfato manose), um dador de manose que é responsável pela construção de cadeias de oligossacarídeos proteicos (**Figura 2**)<sup>9,15</sup>. Assim, a deficiência em PMM2 causa uma redução na conversão de Man-6-P em Man-1-P e, conseqüentemente, uma diminuição significativa nas concentrações de GDP-Man que, por sua vez, provoca a hipoglicosilação de inúmeras glicoproteínas<sup>9,15,16</sup>.

A apresentação clínica da PMM2-CDG é bastante heterogênea, com fenótipos que variam desde o ligeiro ao grave, dando este último origem a morte no período neonatal. É uma doença multisistêmica com envolvimento do sistema nervoso central, com atraso de desenvolvimento psicomotor, hipotonia, atrofia cerebelar. Entre os outros sistemas e órgãos envolvidos temos também os sistemas hepático, gastrointestinal e endocrinológico<sup>9,15</sup>.

Atualmente, não existe terapia dirigida para PMM2-CDG, porém estão disponíveis estratégias terapêuticas para minorar os sintomas<sup>11,15</sup>. Por exemplo, a suplementação em Man-1-P mostrou ser uma terapia promissora em corrigir o defeito de glicosilação *in vitro*<sup>17</sup>. A utilização de chaperonas farmacológicas com o objetivo de estabilizar e reparar a conformação da proteína também demonstrou resultados muito promissores *in vitro* resultando na recuperação da atividade da PMM2<sup>18</sup>.



**Figura 2 | Via da manose na biossíntese de N-glicanos, no citosol.** Representação do defeito citosólico – deficiência na PMM2 – e fosforilação dos açúcares pela ação da hexoquinase. HK: hexoquinase; GMPP: GDP-manose pirofosforilase<sup>11</sup>. Adaptado de Lonlay et al. (2009).

ii. SLC35A2-CDG – Deficiência no Transportador de UDP-galactose

O gene *SLC35A2* (OMIM \*314375) codifica a enzima transportadora de UDP-galactose (UGT – UDP-galactose *translocator*). O gene pertence à família SLC35A transportadora de açúcar nucleotídico e está envolvido na transferência de galactose para o oligossacarídeo em formação<sup>19,20</sup>.

Pelo menos nove alterações foram identificadas no gene *SLC35A2* (OMIM #300896) capazes de modificar um único aminoácido na UGT ou alterar expressão génica da enzima, resultando numa atividade catalítica reduzida ou nula<sup>19</sup>. A partir de modelos baseados em células de mamíferos, foi demonstrado que a inativação da proteína SLC35A2 suprime o transportador de UDP-galactose, no complexo de Golgi, e, conseqüentemente, a síntese de glicanos permanece incompleta<sup>20</sup>.

O gene *SLC35A2* está associado ao cromossoma X e neste caso em específico as mulheres são as mais afetadas. Desta forma, a expressão do alelo variante é determinado pela inativação aleatória do cromossoma X<sup>20</sup>.

Os sintomas comuns são as convulsões, epilepsia, encefalopatia, fácies peculiar, anormalidades ósseas, hipotonia, deficiência intelectual, desenvolvimento atrasado, problemas visuais e olfativos.

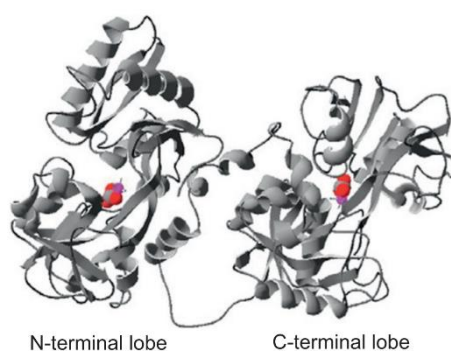
Não obstante, em alguns doentes a glicosilação torna-se normal na infância, sem melhorias nos sintomas, mas o motivo desta correção continua por ser investigada<sup>21</sup>. Além disso, um estudo realizado num doente que consistia na suplementação com galactose (1 g/kg/dia) provou normalizar o perfil de glicosilação da transferrina após seis meses<sup>22</sup>.

## 1.2 Transferrina: Propriedades e Deficiência em Carboidratos

A transferrina (Tf) sérica é uma N-glicoproteína transportadora de ferro (essencialmente produzida pelos hepatócitos), com um peso molecular de 79 kD. A Tf sérica pertence à família da transferrina, um grupo de glicoproteínas homólogas relacionadas evolutivamente que partilham a capacidade de se ligarem ao ferro reversivelmente<sup>23,24,25</sup>.

A Tf contém uma cadeia polipeptídica, com 679 resíduos de aminoácidos, e duas cadeias de polissacarídeos bi- ou tri-anténárias<sup>23,24</sup>. Tridimensionalmente, a estrutura é composta por dois lóbulos homólogos principais e organizados em 2 subdomínios, separados por um local que se destina à ligação de metais, o  $\text{Fe}^{3+}$  (**Figura 3**)<sup>25</sup>.

Por sua vez, a transferrina exhibe micro heterogeneidade quanto à quantidade de resíduos de ácido siálico nos terminais das cadeias de carboidratos, compreendendo 8 isoformas (**Figura 4**), sendo a tetrassialo a mais abundante em pessoas saudáveis<sup>26</sup>.



**Figura 3 | Representação tridimensional da transferrina sérica e dos locais de ligação ao  $\text{Fe}^{3+}$ .** A cadeia polipeptídica rearranja-se para formar 2 lóbulos homólogos - os terminais N e C - unidos por um pequeno péptido. Cada lóbulo divide-se em subdomínios com uma separação entre eles dedicada à ligação de  $\text{Fe}^{3+}$ . A molécula de transferrina consegue desta forma ligar-se a 2 íões de  $\text{Fe}^{3+}$ <sup>25</sup>.



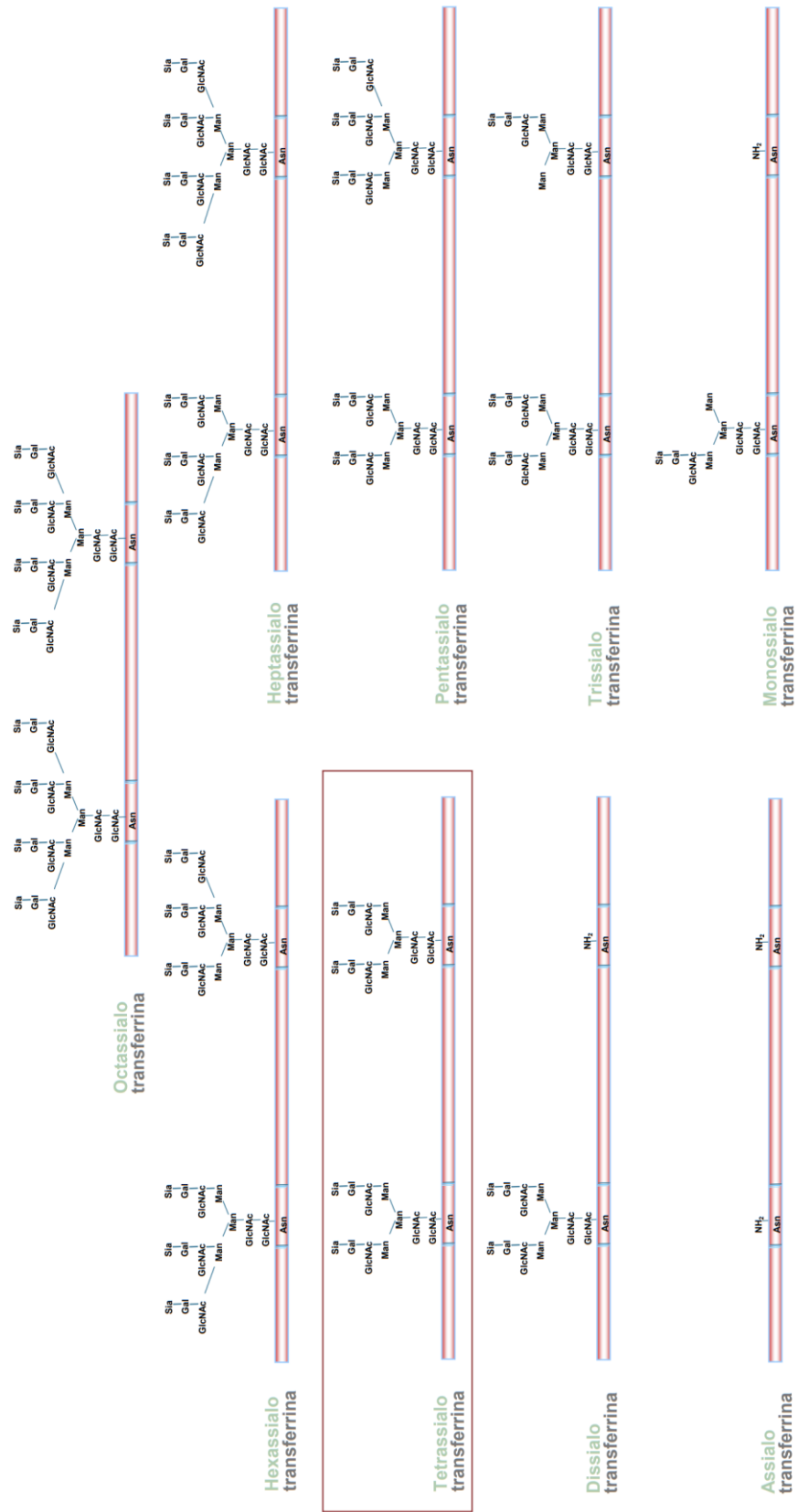


Figura 4 | Representação das 8 isoformas da transferrina, com a tetrassialotransferrina destacada<sup>23</sup>.

Contudo, erros na síntese de N-glicanos causam variações na percentagem das isoformas da Tf sérica, resultantes da incorporação deficiente de ácido siálico nos terminais das cadeias de açúcar. O termo transferrina deficiente em carboidratos (CDT – Carbohydrated deficient transferrin) aplica-se às isoformas assialo- (ácido siálico ausente), monossialo- (um ácido siálico), dissialotransferrinas (dois ácidos siálicos)<sup>12</sup>. Portanto, os CDG-I estão associados a um aumento nas isoformas assialo- e dissialotransferrinas e a uma diminuição da tetrassialotransferrina. Em contrapartida, os CDG-II apresentam um aumento nas isoformas mono- e/ou trissialotransferrina e uma redução na tetrassialotransferrina (**Figura 11**)<sup>11</sup>.

A Tf sérica tem sido o biomarcador adequado para o rastreio de defeitos na N-glicosilação de proteínas, bem como para monitorização da terapia<sup>7</sup>. Assim, a focagem isoelétrica é a técnica preferencialmente utilizada para determinar, semi quantitativamente, a percentagem sérica de transferrina deficiente em carboidratos<sup>12</sup>.

## 2. Aminoacidopatias

Mais de 500 aminoácidos são encontrados na natureza, mas o código genético humano codifica exclusivamente para 20. Estes aminoácidos dividem-se em essenciais e não essenciais. Os essenciais são adquiridos a partir da dieta, tais como a histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina. Em contrapartida, os não essenciais são aqueles que o organismo humano é capaz de sintetizar, nomeadamente a alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, ácido glutâmico, glutamina, glicina, prolina, serina e tirosina. Contudo, a arginina, glicina, cisteína, tirosina, prolina e a glutamina tornam-se “condicionalmente essenciais” na dieta quando o sistema imunitário fica debilitado (**Figura 5**)<sup>27</sup>.

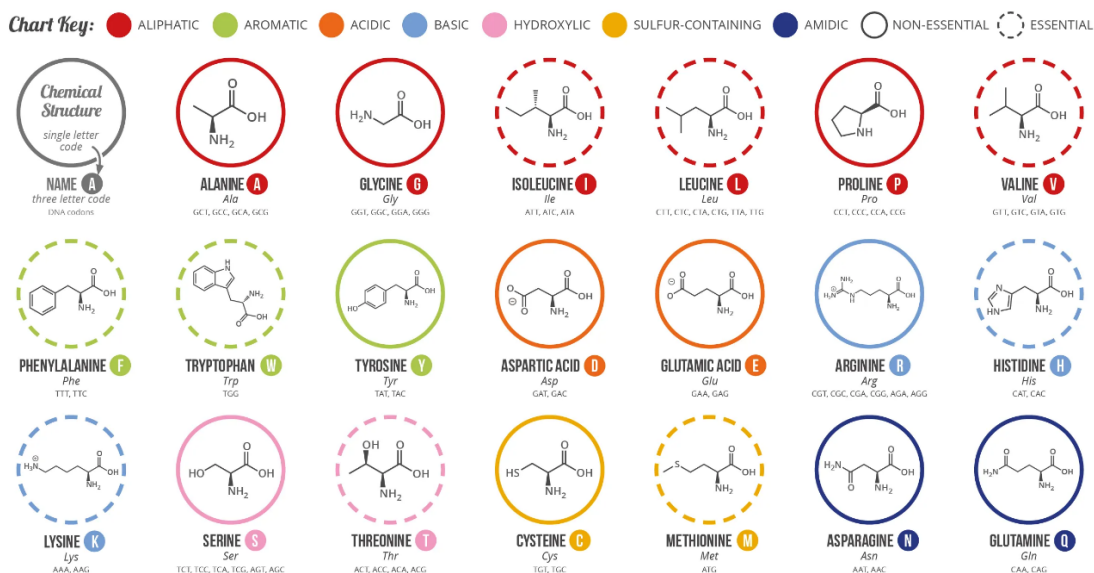
Alterações génicas que impossibilitam o catabolismo de proteínas detêm grande impacto na ingestão e absorção de aminoácidos essenciais e, conseqüentemente, inibição da síntese de proteínas no organismo, desencadeando um amplo espectro de distúrbios e patologias<sup>27</sup>.

As aminoacidopatias representam um grupo de doenças raras, na grande maioria, autossómicas recessivas do metabolismo proteico, resultantes de um bloqueio enzimático associado ao catabolismo de aminoácidos<sup>28</sup>. Conseqüentemente, os aminoácidos e os intermediários metabólicos tóxicos acumulam-se no sangue e na urina, manifestando grande variabilidade de sintomas, nomeadamente a letargia, crescimento comprometido, distúrbios digestivos,

neurológicos, motores e metabólicos<sup>29</sup>.

# A GUIDE TO THE TWENTY COMMON AMINO ACIDS

AMINO ACIDS ARE THE BUILDING BLOCKS OF PROTEINS IN LIVING ORGANISMS. THERE ARE OVER 500 AMINO ACIDS FOUND IN NATURE - HOWEVER, THE HUMAN GENETIC CODE ONLY DIRECTLY ENCODES 20. 'ESSENTIAL' AMINO ACIDS MUST BE OBTAINED FROM THE DIET, WHILST NON-ESSENTIAL AMINO ACIDS CAN BE SYNTHESISED IN THE BODY.



**Note:** This chart only shows those amino acids for which the human genetic code directly codes for. Selenocysteine is often referred to as the 21st amino acid, but is encoded in a special manner. In some cases, distinguishing between asparagine/aspartic acid and glutamine/glutamic acid is difficult. In these cases, the codes asx (B) and glx (Z) are respectively used.

**Figura 5 | Um guia para os 20 aminoácidos comuns.** Os aminoácidos distinguem-se de acordo com o tipo de estrutura química: alifática, aromática, ácida, básica, hidroxílica, contendo enxofre, amidica; dividem-se em não essenciais e essenciais; são simbolizados por uma abreviação de uma letra e um código de 3 letras; e os codões de DNA que os codificam<sup>27</sup>.

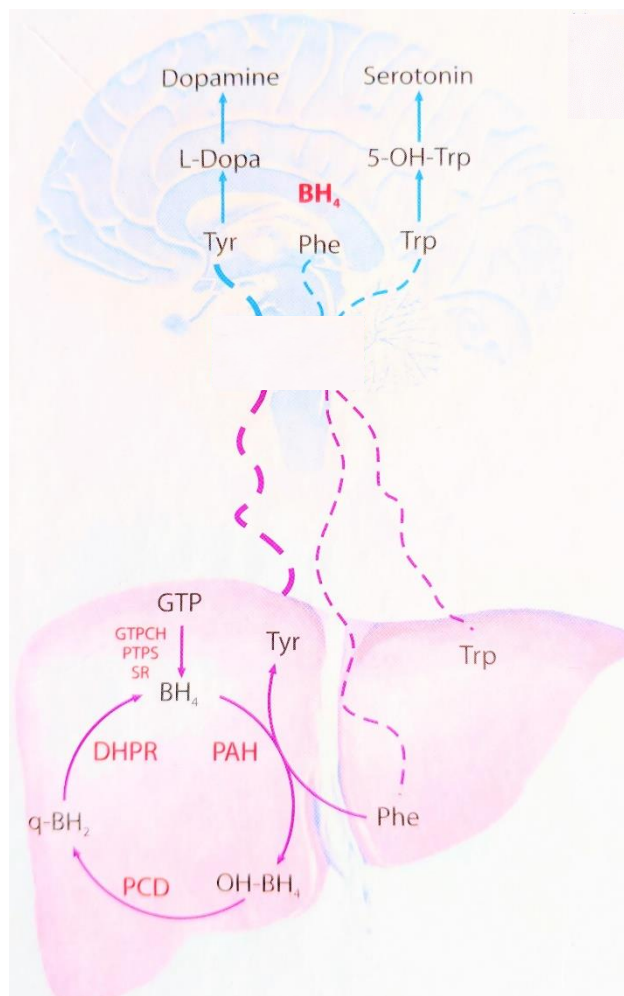
## 2.1 Fenilcetonúria

A fenilcetonúria (PKU – phenylketonuria, OMIM #261600) é o erro inato mais comum do metabolismo dos aminoácidos, com mais de 500 alterações identificadas no gene fenilalanina hidroxilase (PAH-phenylalanine hydroxylase, OMIM \*612349). A enzima PAH é responsável pela hidroxilação da fenilalanina (Phe – phenylalanine) em tirosina (Tyr – tyrosine), reação dependente do cofator tetra-hidrobiopterina (BH<sub>4</sub>). No entanto, a PKU também se manifesta por defeitos na biossíntese ou reciclagem do cofator BH<sub>4</sub>, com a PAH funcional (**Figura 6**)<sup>28,29</sup>.

A PKU é classificada em 3 subtipos: a PKU clássica (PAH está gravemente deficiente ou ausente), a hiperfenilalaninemia não PKU (PAH retém alguma atividade da enzima) e a PKU variante (deficiência do cofator BH<sub>4</sub>)<sup>30</sup>.

A deficiência em PAH induz a acumulação tóxica de fenilalanina e a redução dos níveis de tirosina,

no sangue e nos tecidos. Em doentes não tratados, a fenilalanina em excesso provoca erupções cutâneas eczematosas, degradação de mielina, hiperfenilalaninemia, acumulação de compostos transaminados (ácido fenilpirúvico, ácido fenilacético e fenilacetilglutamina) e a excreção dos mesmos nos fluídos corporais com odor característico. Por outro lado, a insuficiência em tirosina resulta na diminuição da síntese de melanina e de neurotransmissores como a serotonina e as catecolaminas, dopamina e norepinefrina<sup>29,31,32</sup>. A microcefalia, atrofia e calcificação cerebral, deficiência intelectual e o atraso no desenvolvimento são outros distúrbios neurológicos identificados em doentes não tratados<sup>32</sup>.



**Figura 6 | Sistema da hidroxilação da fenilalanina.** Mutações no gene *PAH* reduzem a atividade da fenilalanina hidroxilase, resultando na acumulação tóxica no sangue e tecidos (PKU clássica). Alterações nos genes responsáveis pela regeneração e reciclagem do cofator  $BH_4$  podem reduzir por completo a sua atividade, aumentando os níveis de fenilalanina no sangue e tecidos (PKU variante). Phe: fenilalanina; Tyr: tirosina; PAH: fenilalanina hidroxilase; PCD: pterina-4 $\alpha$ -carbinolamina; DHPR: di-hidrobiopterina redutase; GTPCH: guanósina trifosfato ciclo-hidrolase; PTPS: piruvil tetra-hidropterina sintetase<sup>30</sup>. Adaptado de Nenad et al. (2013)

As manifestações clínicas, como os problemas neurológicos, comportamentais, dermatológicos e a deficiência intelectual, podem ser prevenidas com sucesso pela detecção inicial em rastreio neonatal e a restrição alimentar de fenilalanina, pela redução dos níveis plasmáticos entre 160-360  $\mu\text{mol/L}$  (2-6 mg/dL)<sup>40,34</sup>.

A deficiência em BH<sub>4</sub> manifesta-se de quatro formas: deficiência na guanosina trifosfato ciclo hidrólase, GTPCH (codificada pelo gene *GCH1*, OMIM \*600225); deficiência na enzima 6-piruvil tetra hidropterina sintetase, PTPS (codificada pelo gene *PTS*, OMIM \*612719); deficiência na enzima diidropterina redutase, DHPR (codificada pelo gene *QDPR*, OMIM \*612676); deficiência na enzima pterin-4- $\alpha$ -carbinolamina desidratase, PCD (codificada pelo gene *PCBD1*, OMIM \*126090)<sup>35</sup>.

As enzimas GTPCH e PTPS estão envolvidas na síntese do cofator BH<sub>4</sub>, enquanto as enzimas PCD e DHPR são responsáveis pela sua regeneração. Alterações nos genes que as codificam originam modificações enzimáticas, interferindo com a disponibilidade de BH<sub>4</sub>. Como resultado, o cofator não é capaz de processar, juntamente com a PAH, a fenilalanina<sup>29,35,36</sup>.

Em doentes com PKU variante o tratamento baseia-se na suplementação em dopamina e biopterina, bem como em terapias capazes de compensar os níveis de neurotransmissores e de fenilalanina. A suplementação em BH<sub>4</sub> revelou ser uma terapia eficaz em doentes que apresentam hiperfenilalaninemia ligeira, sendo possível atenuar a restrição proteica<sup>28,29,32</sup>.

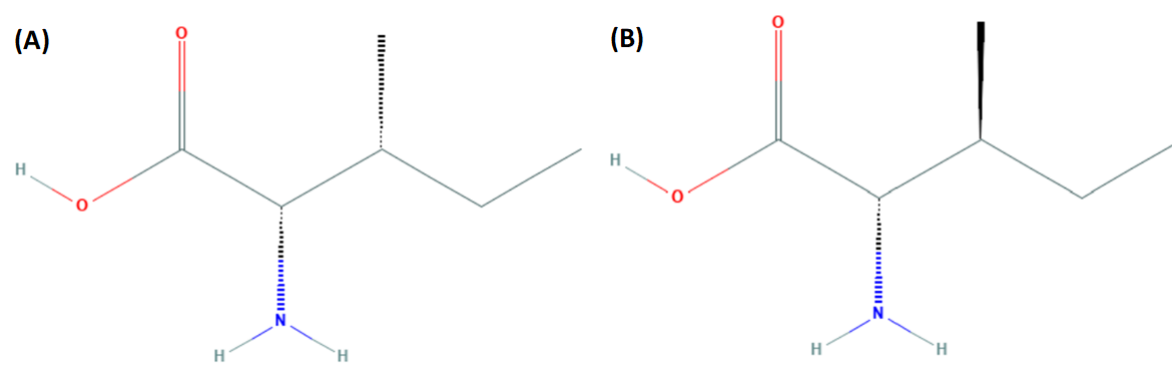
## 2.2 Leucínose

A leucínose (MSUD – Maple syrup urine disease, OMIM #248600) é caracterizada pela deficiência na enzima  $\alpha$ -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada, essencial no catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs – Branched-chain amino acids) isoleucina, valina e leucina. A doença resulta na acumulação de  $\alpha$ -cetoácidos, metabolitos  $\alpha$ -hidroxiácidos, allo-isoleucina e BCAAs, nos fluídos biológicos<sup>28,29</sup>.

O complexo cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (BCKDC – Branched-chain ketoacid dehydrogenase complex) descarboxila os  $\alpha$ -cetoácidos da valina (ácido  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvalérico), leucina (ácido  $\alpha$ -cetoisocapróico) e isoleucina (ácido  $\alpha$ -cetoisovalérico) em  $\alpha$ -metilbutiril-CoA, isovaleril-CoA e isobitiril-CoA, respetivamente. Estes compostos são catabolizados em acetoacetatos, acetil-CoA e succinil-CoA, onde participam seguidamente no ciclo de Krebs (**Figura 8**)<sup>29</sup>.

Os genes *BCKDHA* (OMIM \*608348), *BCKDHB* (OMIM \*248611) e *DBT* (OMIM \*248610) codificam proteínas que funcionam conjuntamente na formação do complexo enzimático BCKDC. Alterações nestes genes silenciam a atividade de BCKDC, aumentando os níveis dos BCAAs, allo-isoleucina e dos respetivos cetoácidos e a toxicidade nas células cerebrais<sup>33,37</sup>.

A L-allo-isoleucina é um constituinte raro do plasma humano, um aminoácido de cadeia ramificada e estereoisómero da L-isoleucina (**Figura 7**). A L-alloisoleucina é originada como subproduto da transaminação da isoleucina e utilizada como um biomarcador específico e sensível no diagnóstico de leucinoses, com valores plasmáticos superiores 5  $\mu\text{mol/L}$  (em pessoas saudáveis o valor é demasiado baixo para ser medido)<sup>38,39</sup>.



**Figura 7 | Estrutura estereoquímica da (A) allo-isoleucina e (B) isoleucina<sup>39,40</sup>.**

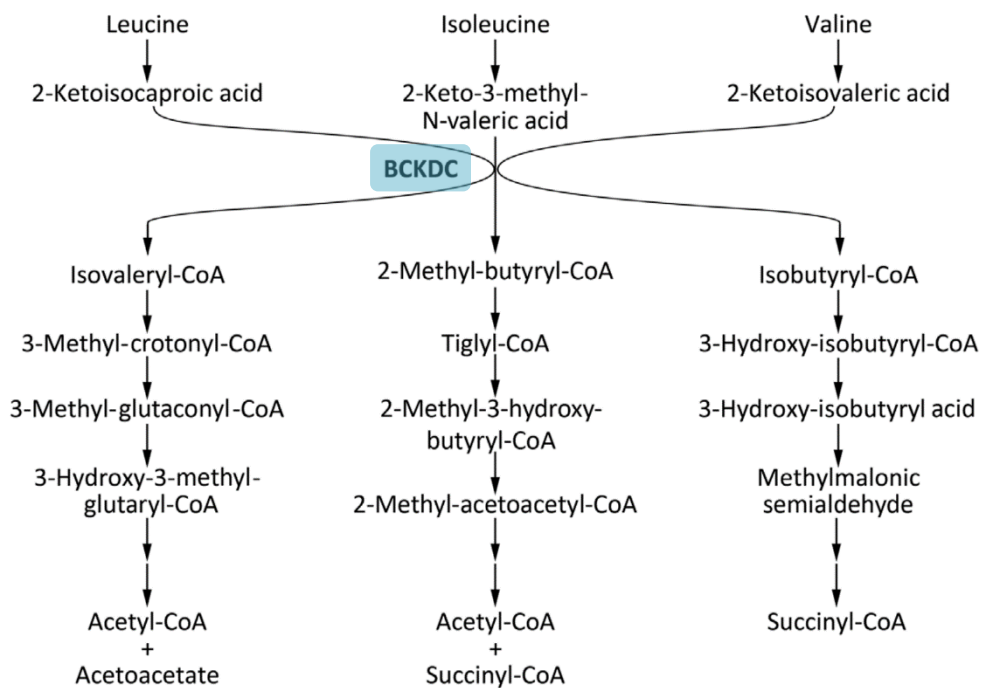
O quadro clínico compreende a disfunção neurológica, vómitos, letargia, movimentos anormais, atraso no desenvolvimento e odor exclusivo na urina. Caso o tratamento não seja imediatamente iniciado a leucinose pode gerar convulsões, coma e morte<sup>33,37</sup>. Porém, os sintomas e a severidade da doença dependem do nível da atividade enzimática residual. Assim, distinguem-se 4 categorias de leucinose: clássica, intermédia, intermitente e responsivos à tiamina<sup>33</sup>.

A leucinose clássica é a forma mais comum e de severidade elevada, devido à reduzida ou nula atividade do complexo enzimático. Os indícios aparecem nos primeiros dias de vida e incluem a letargia, dificuldade na ingestão, odor de xarope de bordo nos fluídos corporais, irritabilidade e envolvimento neurológico. Por isso, é importante seguir uma dieta restrita e controlada em BCAAs, mas o risco de descompensação metabólica continua a ser frequente<sup>33</sup>.

A leucinose intermédia possui uma atividade enzimática mais elevada que a forma anterior. Geralmente, as manifestações surgem entre os primeiros 5 meses e 7 anos de idade e incluem a letargia, atraso de crescimento, crises metabólicas agudas, convulsões, coma, danos cerebrais, entre outros<sup>33</sup>.

Doentes com leucinose intermitente são, por vezes, capazes de tolerar níveis normais de proteína na dieta e evidenciam um normal crescimento e desenvolvimento intelectual. Os sintomas apresentados são os mesmo da MSUD clássica<sup>33</sup>.

Indivíduos com leucinose responsivos à tiamina realizam um tratamento baseado em tiamina (vitamina B1), fundamental no funcionamento do BCKDC, melhorando a atividade enzimática residual e normalizando os níveis de BCAAs. A apresentação clínica assemelha-se à leucinose intermédia<sup>29,33</sup>.



**Figura 8 | Metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada: leucina, isoleucina e valina.** BCKDC imprescindível na descarboxilação dos BCAAs leucina, isoleucina e valina e no catabolismo dos cetoácidos. Adaptado de DeArmond et al. (2017).

Apesar da doença ser controlada com sucesso, os doentes estão sujeitos a um risco constante de desenvolverem descompensação metabólica aguda, muitas vezes desencadeada por infeções, jejum, stress psicológico e a um desequilíbrio entre a atividade residual inerente e o aumento do catabolismo de BCAAs de proteínas nos tecidos. A intervenção médica tem de ser imediata para reduzir a concentração de BCAAs, sobretudo a leucina, no sangue<sup>33</sup>.

O transplante hepático tornou-se bastante comum, principalmente em doentes com leucínose clássica, com resultados promissores. O transplante tem proporcionado atividade enzimática suficiente para catabolizar os BCAAs, suprimir os sintomas e propiciar uma dieta normal<sup>33</sup>.

### 2.3 Tirosinemia

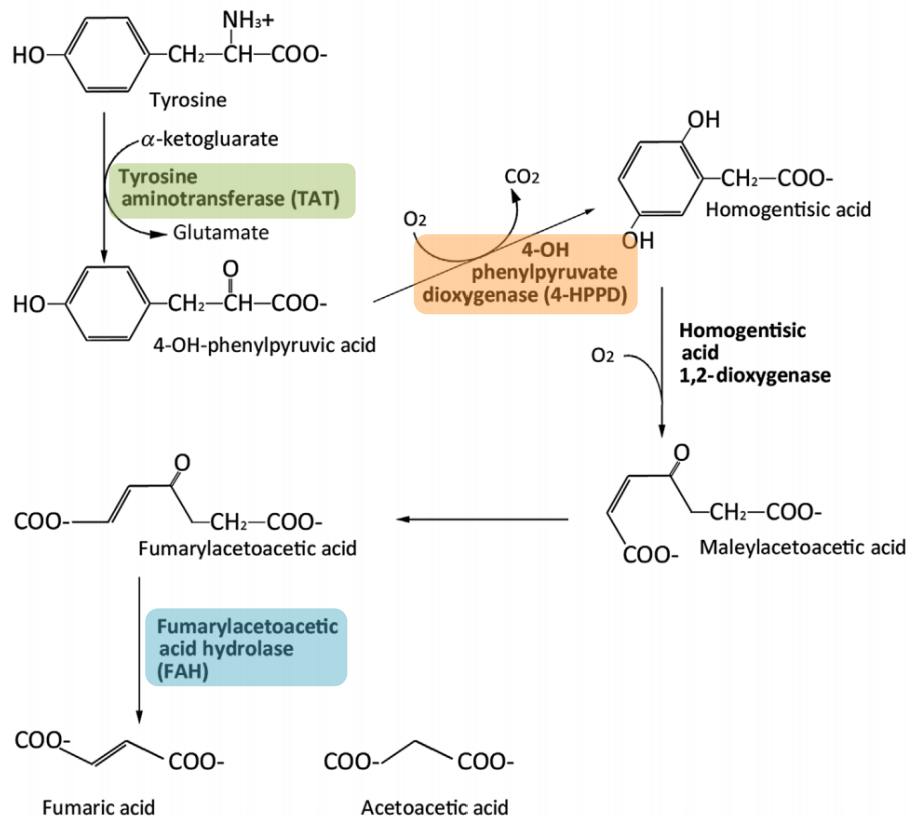
A tirosinemia é definida pela deficiência no catabolismo da tirosina, originada por alterações nos genes *TAT* (tirosina aminotransferase, OMIM \*613018), *HPPD* (4-hidroxilfenilpiruvato dioxigenase, OMIM \*609695) e *FAH* (fumarilacetoacetato hidrólase, OMIM \*613871) que codificam enzimas presentes em abundância no fígado. Como efeito, a tirosina e os respetivos metabolitos tóxicos acumulam-se no fígado, rins e sistema nervoso.<sup>29,41,42</sup>.

A tirosina é um aminoácido essencial, sintetizado *in vivo* a partir da fenilalanina, precursor dos neurotransmissores dopamina, norepinefrina e adrenalina e torna-se um aminoácido essencial em condições de PKU e na deficiência no metabolismo da biópterina. A tirosina ligada a péptidos é fundamental na catalisação de enzimas e de cascatas sinalizadoras. Quando fosforilada, regula vias de sinalização transmembranares importantes no crescimento celular<sup>29</sup>.

A tirosina aminotransferase é responsável por converter a tirosina no bioproducto 4-hidroxilfenilpiruvato que, por sua vez, é oxidado em ácido homogentísico pela 4-HPPD. O anel fenil é sucessivamente quebrado para formar maleilacetoacetato e fumarilacetoacetato. Estes bioproductos são, por fim, hidrolisados pela FAH para gerar ácido fumárico e ácido acetoacético (**Figura 9**)<sup>29,42,43</sup>.

A tirosinemia é dividida em tipo 1 (deficiência no gene FAH), tipo 2 (deficiência no gene TAT) e tipo 3 (deficiência no gene HPPD).<sup>29,41</sup>.





**Figura 9 | Processo catabólico da tirosina.** A enzima TAT, converte a tirosina em 4-hidroxiifenilpiruvato. 4-HPPD oxida o bioproduto em ácido homogentísico. FAH hidrolisa o ácido fumarilacetoacético em ácido fumarico e ácido acetoacético. Adaptado de Armond et al. (2017).

A tirosinemia tipo 1 (OMIM #276700), também designada de tirosinemia hepatorenal, é a forma mais grave. A deficiência na enzima FAH induz a acumulação tóxica de tirosina e de fumarilacetoacetato (convertido em succinilacetona e succinilacetoaceto) no fígado, rins e sistema nervoso. As concentrações da tirosina encontram-se entre 100 e 500  $\mu\text{M}$  e muitas vezes contidas no intervalo de referência  $<150 \mu\text{M}$  e, por isso, a succinilacetona torna-se um biomarcador de maior especificidade<sup>29,42</sup>.

Os sintomas surgem nos primeiros meses de vida e envolvem febre, diarreia, atraso de crescimento, amarelamento da pele e dos olhos, hepatomegalia, insuficiência renal, enfraquecimento ósseo, crises neurológicas repetitivas e risco elevado de desenvolverem cancro hepático<sup>29,41,42</sup>.

A tirosinemia tipo 2 (OMIM #276600) caracteriza-se por apresentar valores significativos de tirosina compreendidos entre os 1000 e 3000  $\mu\text{M}$  no diagnóstico inicial, para além da excreção urinária de produtos transaminados, 4-hidroxiifenilactato e 4-hidroxiifenilpiruvato. No começo da infância, os doentes exibem fotofobia, dor e vermelhidão visual, lacrimejamento excessivo, défice intelectual,

espessamento da pele e dor nas palmas das mãos e solas dos pés<sup>29,41</sup>.

A tirosinemia tipo 3 (OMIM #276710), a forma mais rara, exhibe concentrações de tirosina entre os 300 e 1000µM e a excreção urinária dos metabolitos hidroxifenilpiruvato e hidroxifenilactato. As manifestações clínicas detetadas são a deficiência intelectual, convulsões, perda periódica do equilíbrio e coordenação<sup>29,41</sup>.

O tratamento consiste na restrição alimentar de fenilalanina e tirosina com o intuito de manter os valores de tirosina entre os 500 e 600 µM e, assim, evitar a retenção da tirosina nos tecidos. Doentes com tirosinemia tipo 1 são também suplementados com NTBC, um inibidor competitivo da reação 4-HPPD. O medicamento tem a capacidade de bloquear o catabolismo da tirosina, evitando a acumulação de succinilacetona e prevenindo distúrbios hepáticos e renais. O transplante hepática torna-se possível quando existe insuficiência hepática, evidências de cancro no fígado e ineficácia do tratamento com NTBC<sup>29,42</sup>.

### 3. Outros Distúrbios Metabólicos Estudados

#### 3.1 Diabetes tipo MODY

A diabetes tipo MODY (Maturity-onset diabetes of the young, OMIM #606391) é um subtipo de diabetes *mellitus* monogénico e geneticamente heterogéneo. A MODY caracteriza-se por um histórico familiar com pelo menos 3 gerações afetadas por transmissão autossómica dominante e uma manifestação precoce associada com defeitos na secreção de insulina<sup>44,45</sup>.

A MODY apresenta diferentes alterações génicas identificadas em seis genes. Os genes *HNF4A*, *HNF1A*, *PDX1*, *HNF1B* e *NEUROD1* codificam fatores de transcrição (MODY1, 3, 4, 5 e 6, respetivamente) expressos nas células β pancreáticas, e o gene *GCK* (OMIM \*138079) codifica a enzima glucoquinase (MODY2) expressa nas células β pancreáticas e nos hepatócitos<sup>45,46</sup>.

A MODY exhibe níveis elevados de glucose na corrente sanguínea, resultante da redução da síntese de insulina. O grau de severidade da MODY varia de acordo com o gene afetado, podendo ser assintomático ou apresentar hiperglicemia progressiva, glicosúria, perda de peso, sede, infeções dérmicas recorrentes, entre outras<sup>45-47</sup>.

### 3.1.1 GCK- MODY – Deficiência na Glucoquinase

A glucoquinase apresenta um papel fundamental na regulação metabólica da glucose. Em células  $\beta$  pancreáticas, a enzima atua como um sensor dos níveis elevados de glucose, no sangue, e estimulador da secreção de insulina, pela conversão de glucose em glucose-6-fosfato. Nos hepatócitos, a GCK controla a concentração de glicogénio, bem como a taxa de glucose e gluconeogénese<sup>48,49</sup>.

Alterações no gene *GCK* comprometem a regulação da síntese de insulina pela diminuição do fluxo glicolítico das células  $\beta$  pancreáticas, resultando assim num fenótipo de hiperglicemia ligeira e estável, presente desde o nascimento<sup>45,49</sup>. O fenótipo ligeiro pode ser explicado pelo facto da glucoquinase manter uma atividade reduzida e ser capaz de estimular a secreção de insulina a partir de um novo limite máximo, mais elevado, de glucose no sangue<sup>50</sup>.

De modo geral, os doentes com MODY2 (OMIM #125851) não requerem de uma terapia farmacológica nem de restrições alimentares, visto que os seus perfis glicémicos apresentam valores idênticos aos recomendados em tratamento<sup>47</sup>.

### 3.2 Deficiência na Síntese dos Ácidos Biliares

As deficiências na síntese dos ácidos biliares (BASDs - Bile acid synthesis disorders) são um grupo de doenças metabólicas autossómicas recessivas, caracterizadas por défices enzimáticos na síntese de ácidos biliares<sup>51</sup>.

A síntese de ácidos biliares é a via central do catabolismo de colesterol, um processo com inúmeras reações enzimáticas decorridas no citosol, RE, na mitocôndria e nos peroxissomas. Estes compostos são moléculas indigestíveis, encontradas no fígado e no trato gastrointestinal, com várias funções vitais no organismo, tais como: a indução do fluxo biliar e secreção hepática de lípidos biliares; a digestão e absorção de colesterol e vitaminas lipossolúveis; a regulação homeostática de colesterol e, por último, a defesa do microbioma intestinal<sup>52</sup>.

Anomalias génicas que impossibilitam a degradação de colesterol e a produção de ácidos biliares funcionais resultam na acumulação destes compostos e de metabolitos intermediários, no organismo, para além da supressão do fluxo biliar e da absorção de vitaminas<sup>51</sup>.

O quadro clínico compõe doenças neurológicas progressivas, o aumento do baço e do fígado, cirrose e insuficiência hepática. Todavia, a administração oral de ácidos biliares primários e de vitaminas provou ser benéfica no restauro das funções hepáticas, num período reduzido. A transplantação hepática foi necessária em indivíduos cuja resposta ao tratamento foi insuficiente<sup>51</sup>.

### 3.2.1 Defeito Congênito na Síntese de Ácidos Biliares tipo 4

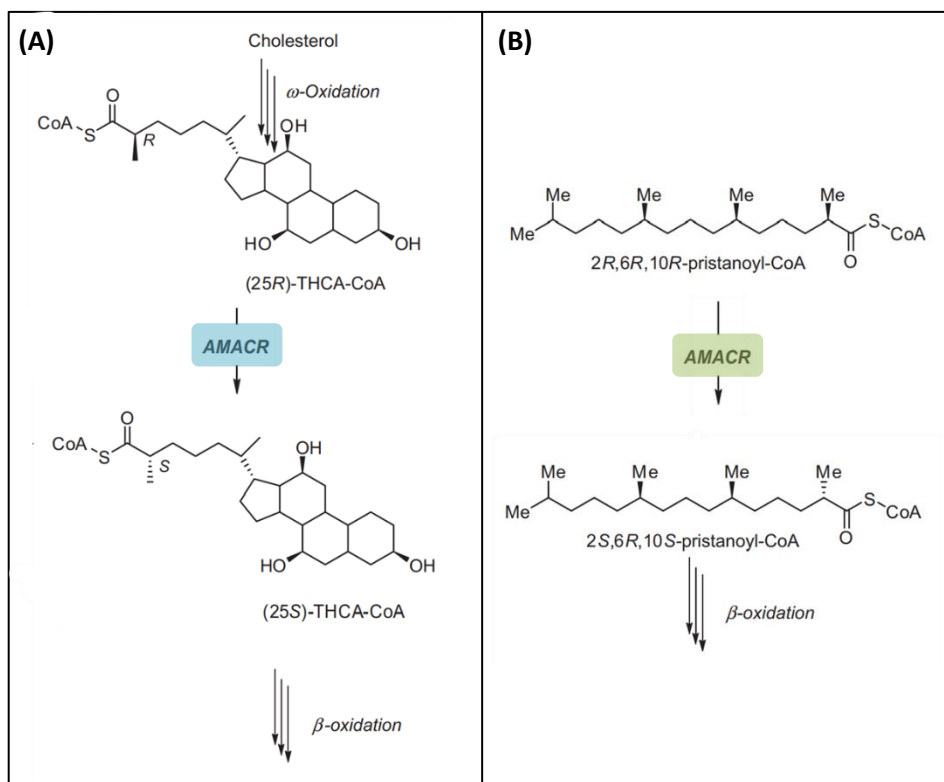
A conversão de colesterol em ácidos biliares primários (ácido cólico e ácido quenodesoxicólico) envolve inúmeras reações metabólicas, como a hidroxilação, a saturação de ligações duplas, a epimerização do grupo hidroxilo e a oxidação da unidade de carbono, catalisadas por enzimas localizadas no citosol, no retículo endoplasmático, na mitocôndria e nos peroxissomas<sup>52-54</sup>.

Os ácidos gordos de cadeia muito longa (AGCML), o ácido pristânico e os ácidos di- e tri-hidroxicolestanóico (DHCA e THCA) são exemplos de ácidos gordos que sofrem  $\beta$ -oxidação peroxissomal. Mas, para isso acontecer são indispensáveis a participação de enzimas capazes de degradar por  $\alpha$ - e  $\omega$ -oxidação estes ácidos gordos<sup>53,55</sup>.

A enzima  $\alpha$ -metilacil-CoA racemase, codificada pelo gene *AMACR* (OMIM \*604489) e expressa na mitocôndria e nos peroxissomas, é responsável por converter os R-estereoisómeros de ésteres CoA em S-estereoisómeros de ésteres CoA. Assim, a função fisiológica da *AMACR* é produzir S-estereoisómeros que funcionam como substratos específicos para as acil-CoA oxidases de cadeia ramificada, a primeira enzima catalisadora da  $\beta$ -oxidação peroxissomal<sup>55-57</sup>.

Os isómeros (25R)-DHCA-CoA e (25R)-THCA-CoA são produzidos pela  $\omega$ -oxidação da cadeia lateral do colesterol, onde os grupos terminais de metil são convertidos em ácidos carboxilos. Assim que a *AMACR* catalisa a conversão (R)-estereoisómeros em (S)-estereoisómeros, os (25S)-DHCA-CoA e (25S)-THCA-CoA sofrem  $\beta$ -oxidação e formam ácido quenodesoxicólico e ácido cólico, respetivamente (**Figura 10 A**)<sup>53,55,56</sup>.

A  $\alpha$ -oxidação consiste na conversão de ácido fitânico, derivado de fontes alimentares, em (2R)-pristanoil-CoA. Tal como os ácidos anteriores, este necessita da ação catalisadora da *AMACR* para ser convertido em (2S)-pristanoil-CoA e ser submetido à  $\beta$ -oxidação para produzir propionil-CoA (**Figura 10 B**)<sup>53</sup>.



**Figura 10 | Função fisiológica da AMACR no metabolismo peroxissomal. (A)** Após a oxidação das cadeias laterais do colesterol, a AMACR catalisa a conversão de (25R)-THCA-CoA em (25S)-THCA-CoA. **(B)** Depois do ácido fitânico ser oxidado em ácido pristânico, este é convertido no seu (S)-estereoisômero pela AMACR. Adaptado de<sup>55</sup>.

Alterações gênicas que resultam na deficiência enzimática da AMACR (OMIM #214950) provocam um aumento de (25R)-DHCA-CoA e (25R)-THCA-CoA no plasma e, conseqüentemente, a  $\beta$ -oxidação destes compostos não se concretiza, levando a uma redução significativa de ácidos biliares primários. Desta forma, crê-se que a deficiência em ácido cólico e ácido quenodesoxicólico contribui para um déficit vitamínico e colestase (supressão do fluxo biliar do fígado)<sup>53,57</sup>. A concentração de (2R)-pristanoyl-CoA também acumula significativamente no sangue, mas a sua relação com os sintomas identificados na deficiência em AMACR continua por ser estabelecido<sup>53,57</sup>.

As restantes manifestações clínicas identificadas são a neuropatia motora-sensorial, o declínio cognitivo, convulsões, encefalopatia, ataxia e deterioração da retina. Uma terapia baseada na suplementação vitamínica e ácido cólico provou corrigir as funções hepáticas num curto espaço de tempo e a hipótese de uma transplantação hepática só é imposta quando a resposta ao tratamento é nula<sup>51,57</sup>.

## Abordagens Bioquímicas e Moleculares

Este capítulo sumariza as técnicas, os materiais e a metodologia utilizadas neste trabalho. Inicialmente, é descrito a focagem isoelétrica da transferrina, essencial no diagnóstico de doentes com défices congénitos de glicosilação. Depois é abordada a cromatografia de troca iónica, método utilizado na quantificação de aminoácidos livres no plasma. Por fim, são apresentadas metodologias de diagnóstico molecular por sequenciação de DNA genómico.

### 1. Focagem Isoelétrica da Transferrina

A focagem isoelétrica (FIE) é definida como um método de separação eletroforético de moléculas anfotéricas, como proteínas e péptidos<sup>58</sup>. Para além disso, a FIE possui um elevado poder de resolução, eficiente em detetar micro heterogeneidades proteicas<sup>59</sup>.

No processo de separação, as moléculas anfotéricas são separadas de acordo com a sua carga, ou seja, quando sujeitas a um campo elétrico movem-se em direção ao respetivo eletrodo (cátodo ou ânodo), direção essa influenciada pela polaridade da carga molecular e esta pelo pH envolvente. Ora, quando os grupos moleculares carregados atingem o seu estado neutralizado é estabelecido o ponto isoelétrico (pI)<sup>58,59</sup>.

O pI é definido como um parâmetro físico-químico específico de uma molécula anfotérica quando esta atinge o estado de carga neutra no pH envolvente, ou seja, a molécula suspende a migração ao longo do campo elétrico permanecendo numa posição focada/condensada, desde que o gradiente de pH e o campo elétrico não sofram modificações<sup>58,59</sup>. No final, as moléculas tornam-se altamente concentradas nos seus pontos isoelétricos, apresentando uma significativa sensibilidade para a sua deteção<sup>58</sup>.

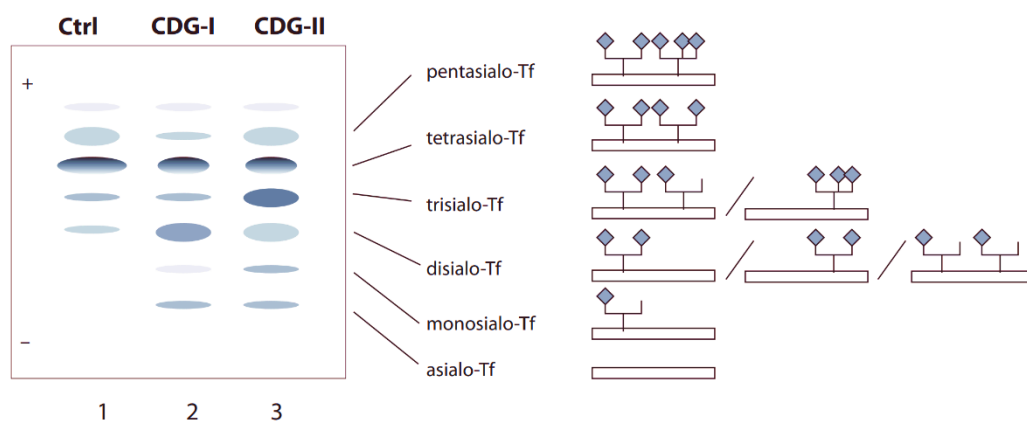
Contudo, os aminoácidos e péptidos de origem natural detêm um poder tampão insuficiente nos seus pontos isoelétricos. Por isso, foi necessário criar uma solução tampão de alta capacidade no seu ponto isoelétrico, a Anfolina<sup>®58</sup>.

A Anfolina<sup>®</sup> é uma mistura composta por 600-700 homólogos diferentes de poli-aminoácidos, com um espectro de pontos isoelétricos entre 3 a 10 de pH, de peso molecular <1 kDa e de natureza hidrofílica, não interagindo com proteínas<sup>58,60</sup>. Este produto é utilizado na focagem isoelétrica da transferrina com a função de produzir um gradiente de pH estável e linear quando sujeito a um

campo elétrico, para além de oferecer uma resolução seletiva das moléculas anfotéricas<sup>59,60</sup>.

Após a FIE estar completa, é possível visualizar 3 padrões: normal, tipo 1 e tipo 2 (**Figura 11**). Visto que o ácido siálico exibe carga negativa, a deficiente incorporação do mesmo torna as moléculas com uma carga mais positiva e, como resultado, os padrões de FIE da transferrina hipo-sialisada exibem desvios catódicos marcados pela ausência (tipo 1) e anormalidades estruturais (tipo 2) das cadeias de carboidratos<sup>12,61</sup>.

O perfil tipo 1, o mais frequente, é caracterizado por revelar um aumento das bandas dissialo e assialo-transferrinas e uma redução da tetrassialo-transferrina. Por outro lado, o perfil tipo 2 é descrito como a combinação entre o perfil tipo 1 e um aumento da trissialo-transferrina e, por vezes, da monossialo-transferrina<sup>61</sup>.



**Figura 11 | Esquema ilustrativo dos perfis da transferrina por focagem isoeletrica.** Os oligossacarídeos da transferrina normal (Ctrl – controlo, linha 1 – pessoas saudáveis) contêm 4 resíduos de ácido siálico (tetrassialotransferrina) em abundância. Em doentes com CDG são reveladas bandas com isoformas adicionais. Os CDG-tipo I (linha 2) exibem um padrão com as bandas dissialo, monossialo e assialotransferrina aumentadas, comparativamente com o Ctrl. Os CDG-tipo II (linha 3) mostram um aumento nas bandas trissialo, monossialo e assialotransferrina, em comparação com Ctrl. À direita, são apresentadas as respetivas isoformas<sup>11</sup>.

## 1.1 Obtenção dos Perfis de FIE

A amostra selecionada consiste numa colheita de sangue total cujo o soro separado foi conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 1.1.1 Solução de citrato de ferro (III) a 200 mM

Para além da forte afinidade que o ferro (III) demonstra pela transferrina, estudos verificaram a existência de pequenos complexos entre o ferro (III) e ligantes de ácidos orgânicos, como o citrato. O citrato possui habilidade de se complexar ao  $\text{Fe}^{3+}$  e mediar o carregamento do metal em transferrinas insaturadas em ferro<sup>62</sup>.

Desta forma, foi preparada uma solução de citrato de ferro (III) (Sigma) com o intuito de saturar as isoformas da transferrina. A solução permaneceu durante a noite no agitador magnético e envolvida em papel de alumínio de modo a ser evitada a redução de  $\text{Fe}^{3+}$  pela luz.

### 1.1.2 Solução de coloração

O *coomassie brillante blue* (CBB) R250 (Amersham Biosciences), um corante composto por trifenilmetano, é essencialmente utilizado na coloração de proteínas, uma vez que interage por ligações electrostáticas com aminoácidos básicos protonados (arginina, histidina e lisina) e por associações hidrofóbicas com resíduos aromáticos<sup>58</sup>.

Deste modo, foi necessário preparar uma solução de coloração com o objetivo de corar as bandas das isoformas da transferrina separadas após o processo de eletroforese. Antes da sua utilização, foi essencial filtrar a solução devido à presença de grânulos não dissolvidos do respetivo corante.



### 1.1.3 Solução de descoloração

O corante demonstra ligações de baixa afinidade com os poli-aminoácidos presentes na solução de Anfolina®. Por esse motivo, o CBB R-250 é capaz de penetrar a matriz do gel, sendo imprescindível etapas de descoloração<sup>63</sup>. Para tal preparou-se na *hotte* uma solução 35:10:65 de etanol (95%) (Panreac), ácido acético (Merk) e água bidestilada.

### 1.1.4 Preparação do gel de agarose

A agarose consiste em unidades repetidas de agarobiose. Abaixo dos 45°C forma um gel composto por ligações entre átomos de hidrogénio e cadeias de agarose de elevada porosidade, o que permite a difusão e a separação de macromoléculas de acordo com a densidade e carga iónica<sup>64-66</sup>. Desta forma, foi essencial proceder à sua preparação dissolvendo a *pharmacia agarose-IEF* (Amersham Biosciences) em água destilada numa placa de aquecimento, durante 10 minutos. Depois de dissolvida, adicionou-se a anfolina pH 5.0-7.0 (Amersham Biosciences) na solução, a uma temperatura de 76°C. A mistura foi agitada e vertida sobre o *gel-fix* (Serva) e deixada a solidificar à temperatura ambiente, durante 15 minutos. O gel de agarose foi mantido numa câmara húmida para ser utilizado no dia seguinte.

### 1.1.5 Saturação das amostras em Fe<sup>3+</sup>

A Tf sérica pode ser encontrada na sua forma livre em ferro (Fe<sub>0</sub>-Tf ou apo-Tf), carregada com um (Fe<sub>1</sub>-Tf) ou dois (Fe<sub>2</sub>-Tf – forma saturada) iões. A deficiência em Fe<sup>3+</sup> diminui a saturação da transferrina no ião, aumentando as outras formas no soro. Por essa razão, a saturação da transferrina em citrato férrico teve como intuito conferir que todas as isoformas possuam o mesmo teor em ferro e, assim, evitar variações de carga. Logo, o ponto isoelétrico depende exclusivamente da carga conferida pelo número de resíduos de ácido siálico de cada isoforma<sup>12,67</sup>.

Num tubo de ensaio, foram adicionados citrato férrico (200 mM), água destilada e soro. A mistura homogeneizada foi deixada a repousar à temperatura ambiente durante 30 minutos (**Figura 12**).

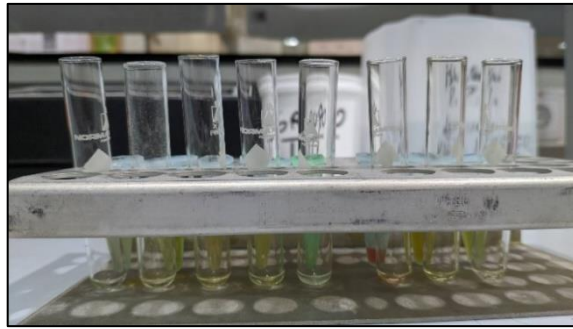


Figura 12 | Saturação de amostras com citrato férrico.

#### 1.1.6 Focagem Isoelétrica

O *Phast-System* é um equipamento de eletroforese semiautomático e de multitarefas, eficiente em executar até dois géis com as mesmas condições de controlo e separação, para além de oferecer até nove métodos de separação e de desenvolvimento que podem ser programados, editados e armazenados (Figura 13)<sup>68</sup>.



Figura 13 | *Phast-System*.

Na focagem isoelétrica, o meio do sistema fornece gradientes de pH estáveis e lineares com uma condutividade uniforme e temperaturas, correntes, voltagens e potências constantes. A reprodutibilidade é assegurada com o parâmetro volts/hora, pela regulação do tempo de separação/migração das proteínas no gel e o período da aplicação das amostras<sup>68</sup>. Assim sendo, foi programado um método de separação por focagem isoelétrica com as condições ideais listadas na Tabela 1

**Tabela 1 | Programação do *Phast-System* na FIE.** V: Voltagem; mA: Corrente; Watt: Potência; °C: temperatura de separação.

	Step	AVh	Amostra	V	mA	Watt	°C	AV/h
<b>Pré-focagem</b>	1			200	2.0	0.5	10	40
<b>Aplicação da amostra</b>	2	0	Down	100	0.5	0.5	10	10
<b>Focagem</b>	3	0	Up	200	1.0	1.0	10	65

Na placa de separação, foi colocado o gel de agarose sobre água destilada para assegurar a coesão entre o gel e a placa. Os elétrodos e o braço aplicador foram descidos e a pré-focagem foi iniciada. Em paralelo, pipetaram-se as amostras saturadas em citrato  $Fe^{3+}$  para os poços referentes ao pente aplicador. Quando a pré focagem atingiu os 29 AVh, foi aplicado o pente no braço aplicador na posição mais próxima do cátodo. A focagem isoelétrica decorreu até ser atingido os 115 AV/h.

#### 1.1.7 Imunofixação

O anticorpo (imunoglobulinas de coelho) (DAkoCytomation) contra a transferrina humana foi diluído em NaCl a 0.9 %. Com uma pipeta de Pasteur dobrada ao calor, a solução foi espalhada na área do gel onde são esperadas as bandas de proteínas.

#### 1.1.8 Lavagem e secagem do gel

O gel permaneceu em NaCl a 0,9% durante a noite, de modo a serem removidas proteínas não precipitadas. Para a eliminação dos sais, o gel foi mantido em água destilada durante 1 hora. Para a secagem foram necessárias duas folhas de *Whatman paper* pressionadas com várias folhas de papel de filtro sobre o gel.

### 1.1.9 Coloração

O gel foi submerso na solução de coloração por 10 minutos e mantido na solução de descoloração, por um tempo variável (até 15 minutos), até as bandas de proteínas se destacarem e o gel ficar transparente.

### 1.1.10 Análise da %CDT

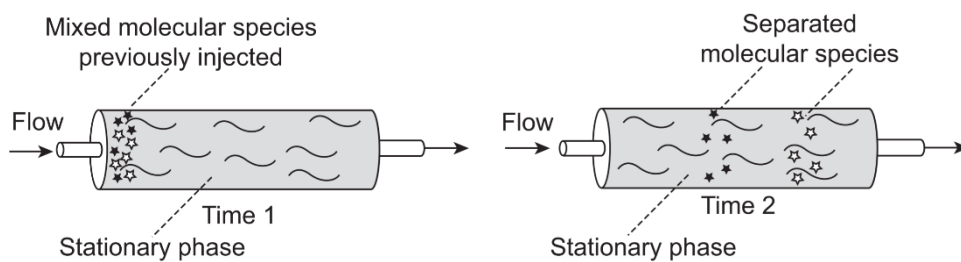
Procedeu-se à digitalização do gel utilizando o sistema *Gel Doc XR+ System* (Bio Rad) com uma fonte excitatória *Epi-with light*, que envolve a reflexão da luz pela amostra para produzir contraste<sup>69</sup>. A percentagem da transferrina deficiente em carboidratos foi determinada a partir do *Image Lab Software* (Bio Rad).

## 2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia é uma técnica de separação de diferentes espécies moleculares de uma mistura – os analitos e a matriz existentes numa amostra. Os analitos correspondem às espécies moleculares de interesse, enquanto que a matriz são os restantes constituintes da amostra<sup>70</sup>.

Inicialmente, as amostras são submetidas a uma fase móvel de fluxo (fase móvel líquida – cromatografia líquida) e, mais tarde, a uma fase estacionária. A última fase consiste na retenção de espécies moleculares fracas e fortes, e na libertação das mesmas para a fase móvel, em tempos distintos (**Figura 14**)<sup>70</sup>.

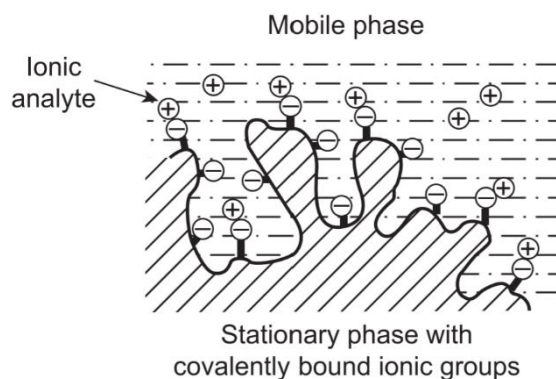
Na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – High performance liquid chromatography) a fase estacionária corresponde a uma coluna, preenchida com partículas porosas, e a fase móvel, também designada de eluente, move-se através da coluna auxiliada por uma bomba de elevada pressão. Quando a amostra é injetada, os solutos posicionam-se no ápice da coluna e, à medida que a fase móvel flui, as moléculas eluídas são detetadas por um sinal elétrico e convertidas num gráfico – cromatograma. A eluição dos componentes separados em tempos diferentes são representados por diferentes picos, chamados de tempos de retenção, no cromatograma<sup>70</sup>.



**Figura 14 | Ilustração simplificada da separação molecular por HPLC.** As espécies moleculares injetadas, representadas por diferentes cores, encontram-se no começo da coluna. A eluição separa as moléculas de acordo com as propriedades físico-química, em diferentes momentos temporais, tornando-as detetáveis<sup>70</sup>.

## 2.1 Cromatografia de Troca Iônica

A cromatografia de troca iônica (IEC – Ion Exchange Chromatography) é uma técnica de separação e purificação de biomoléculas com base nas diferenças de carga superficial líquida (**Figura 15**). Atualmente, é frequentemente utilizada na purificação de proteínas, péptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, entre outros, oferecendo elevado poder de resolução e alta capacidade de carregamento<sup>71</sup>.



**Figura 15 | Ilustração simplificada de separação iônica.** O analito de carga oposta permanece retido na matriz altamente negativa<sup>70</sup>.

As biomoléculas exibem diferentes graus de interação com os meios de cromatografia (resinas) carregados devido às propriedades de carga, como a distribuição e a densidade de carga superficial, bem como os grupos carregados dentro da molécula com valores pKa (constante de ionização de ácidos) variados. Desta forma, a IEC tira vantagem pela relação dependente entre a carga superficial líquida e o pH. Por outras palavras, a carga superficial líquida da biomolécula altera-se

gradualmente com a mudança de pH, até que seja atingido o ponto isoelétrico (estado neutralizado)<sup>71</sup>.

O meio de IEC possui uma matriz porosa de partículas esféricas com grupos iônicos, que tanto podem estar carregados positivamente ou negativamente, armazenadas numa coluna. A coluna é inicialmente equilibrada com a seleção de um pH e de uma força iónica (concentração salina) de solução tampão inicial, com a finalidade de preencher a porosidade da matriz, os espaços entre partículas e anular a ligação de impurezas. O equilíbrio é obtido quando os grupos carregados das fases estacionárias estão ligados a iões de carga oposta, como sódio ou cloreto do tampão inicial<sup>71</sup>.

Quando a amostra é introduzida, o tampão da mesma deve ter um pH e uma força iónica idêntica ao tampão inicial. Assim, as moléculas em solução unem-se aos grupos carregados da matriz, permanecendo imobilizadas na coluna, e as restantes que não se ligaram, moléculas não carregadas ou com a mesma carga do grupo iónico, são eluídas ao longo da coluna<sup>71</sup>.

As condições da coluna são seguidamente modificadas pelo aumento da força iónica do tampão ou pelo pH, com o objetivo de eluir as biomoléculas que antes se apresentavam ligadas à matriz. Ou seja, as moléculas de carga superficial reduzida são as primeiras a serem eluídas pela coluna com o aumento da força iónica e o pH. Logo, quanto maior for a carga superficial líquida da molécula maior é a força iónica exigida para a sua eluição<sup>71</sup>.

No final da separação e purificação, a coluna é regenerada com um tampão de força iónica elevada, removendo qualquer partícula unida à matriz, assegurando que a próxima corrida de amostras possua elevada capacidade nas fases estacionárias<sup>71</sup>.

#### 2.1.1 Cromatografia de Troca Catiónica de Aminoácidos Livres no Plasma

A um pH ácido (pH=2.2) todos os aminoácidos asseguram uma carga superficial líquida positiva e, por isso, a coluna cromatográfica é preenchida com resina de carga negativa – cromatografia de troca catiónica (CIEC – Cationic-exchange chromatography)<sup>72</sup>.

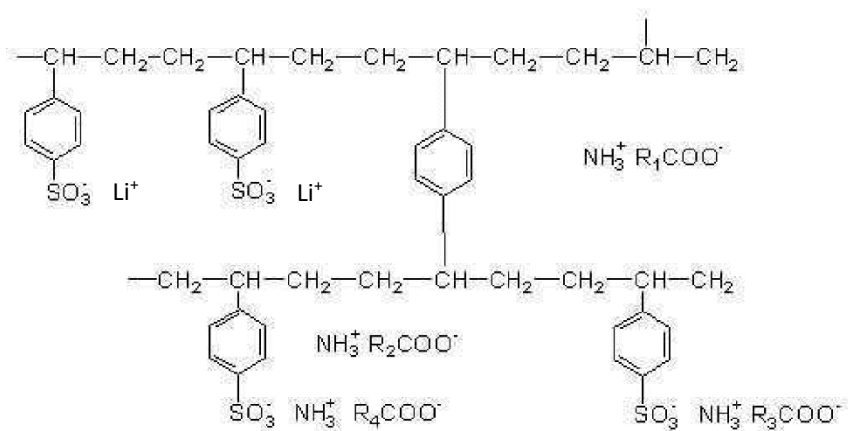
Quando a amostra é injetada, todos os aminoácidos posicionam-se no início da coluna cromatográfica e assim que as condições se alteram (aumento do pH e do tampão de eluição) os pontos isoelétricos são atingidos, onde a atração dos iões na resina diminui e os aminoácidos são eluídos ao longo da coluna. Deste modo, a retenção baseia-se na atração entre os iões na solução

e os locais carregados de carga oposta na fase estacionária. Assim, a separação é conseguida quando as diferentes moléculas apresentam forças iónicas distintas<sup>70</sup>.

i. Resina de Troca Iónica

A resina utilizada na análise de aminoácidos é sintetizada pela polimerização de estireno com a incorporação de grupos de divinilbenzeno. A concentração de divinilbenzeno está relacionada com a forma arredondada das partículas esféricas que compõem a matriz da resina, influenciando a rigidez, a capacidade de turgescência e a porosidade das fases estacionárias. Por sua vez, a matriz liga-se covalentemente a grupos sulfatados ( $\text{SO}_3^{-1}$ ) onde se obtém a troca catiónica (**Figura 16**)<sup>73,74</sup>.

Os iões que carregam carga oposta dos grupos positivos de tampões ou aminoácidos, designados de iões trocáveis, penetram e unem-se aos grupos carregados negativamente da matriz por ligações heteropolares<sup>72,73</sup>.



**Figura 16 | Estrutura química da resina unida a grupos sulfatados ( $\text{SO}_3^{-1}$ ).** Adaptado de Csapó et al. (2008).

ii. Tampões de Lítio

Os tampões de lítio são utilizados especialmente na determinação de aminoácidos livres em amostras fisiológicas, tais como plasma, urina e líquido cefalorraquidiano, e quando se justifica a separação dos aminoácidos glutamina, ácido glutâmico e ácido aspártico<sup>72,73</sup>.

São precisos 6 tampões eluentes cromatográficos e um de carregamento, cada um com parâmetros químicos distintos (**Tabela 2**) importantes na separação dos aminoácidos, no controlo da acidez, na purificação e regeneração da coluna, na reposição dos iões de Li<sup>+</sup> e na inibição do crescimento de microrganismos<sup>72,73</sup>.

O tampão de carregamento dilui as amostras e os padrões. O primeiro tampão elui os aminoácidos ácido cisteico, taurina, fosfoetanolamina, ácido aspártico, hidroxiprolina, treonina, serina, asparagina, ácido glutâmico e glutamina. O segundo tampão elui os aminoácidos ácido  $\alpha$ -amino adípico, prolina, glicina, alanina, citrulina, ácido  $\alpha$ -amino butírico e a valina. O terceiro tampão elui a cistina, metionina, cistationina, isoleucina leucina. O quarto tampão elui a tirosina, fenilalanina,  $\beta$ -alanina e o ácido  $\beta$ -amino butírico. O quinto tampão elui os aminoácidos ácido  $\gamma$ -amino butírico, ornitina, lisina, histidina, 1-metil histidina, 3-metil histidina e arginina. O último regenera remove as impurezas e a repõe os iões de lítio da coluna<sup>72,73</sup>.

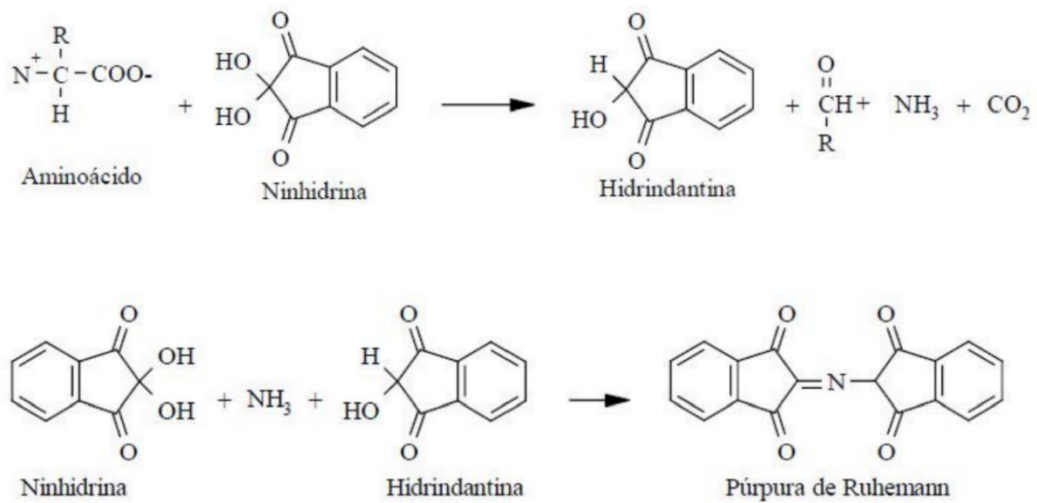
**Tabela 2 | Parâmetros químicos dos tampões de lítio<sup>73</sup>.**

Tampões							
	1	2	3	4	5	6	Carregamento
Li pH	2,80	3,00	3,15	3,50	3,55		2,20
Li M	0,2	0,3	0,5	0,9	1,65	0,3	0,1

### iii. Derivatização com Ninidrina

A ninidrina é um poderoso agente oxidante que reage com aminas primárias (-NH<sub>2</sub>) e secundárias (-NH-) pela desaminação oxidativa do grupo  $\alpha$ -amina, libertando amónia, dióxido de carbono, um aldeído com menos átomo de carbono e hidrindantina. A hidrindantina reage com a amónia e outra molécula de ninidrina, formando o complexo púrpura de Ruhemann a uma absorbância máxima de 570nm (**Figura 17**). Contudo, este produto de reação só é valido para aminoácidos com aminas primárias. No caso dos iminoácidos prolina e hidroxiprolina (contêm um grupo amina secundário) o produto de reação é uma substância amarela num comprimento de onda de 440nm<sup>73,74</sup>.

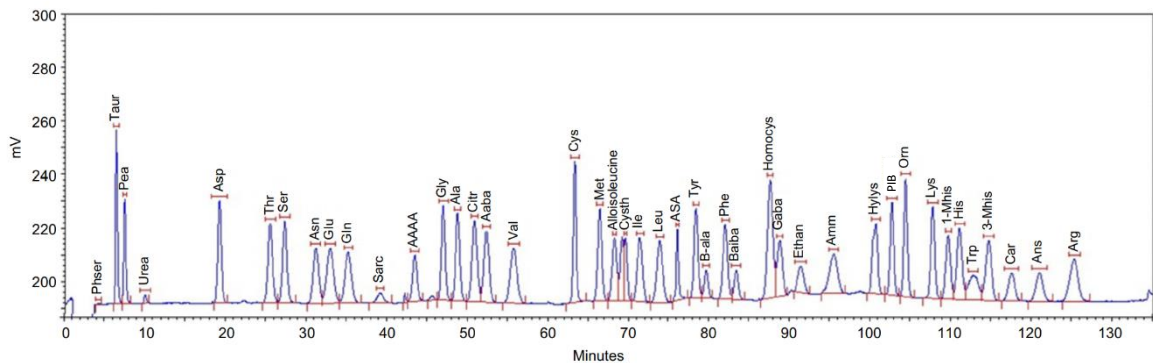




**Figura 17 | Reação química da ninidrina com um aminoácido.** A desaminação oxidativa resulta na libertação de hidriindantina, um aldeído com menos um átomo de carbono, amónia e dióxido de carbono. A hidriindantina reage com a amónia e outra molécula de ninidrina, produzindo púrpura de Ruhemann a 570 nm<sup>73,75</sup>.

O método de cromatografia de troca iónica é usualmente acoplado por um sistema de derivatização pós coluna cromatográfica. Esta técnica baseia-se na deteção e reação seletiva com os grupos amina dos aminoácidos pela ninidrina<sup>76</sup>.

Na coluna, o eluente e o reagente ninidrina são misturados e bombeados para uma bobina de reação. Esta ocorre a temperaturas elevadas para acelerar a reação entre o aminoácido e a ninidrina. A absorção é determinada num fotómetro de fluxo e registada no computador numa sequência de tempos de retenção com as quantidades dos aminoácidos detetados (**Figura 18**)<sup>72-74,76</sup>.



**Figura 18 | Exemplo de um cromatograma de padrões de aminoácidos.** Adaptado de Phipps et al. (2019).

## 2.2 Quantificação de Aminoácidos livres no Plasma por IEC

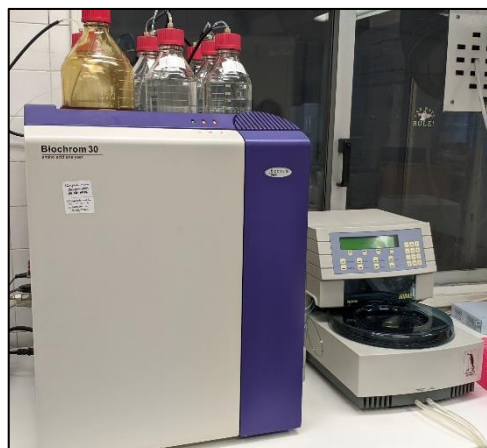
Os tampões e os reagentes de ninidrina foram disponibilizados pelo *Biochrom Lithium Buffer Kits and Ninhydrin Reagent Kits*.

### 2.2.1 Desproteinização do Plasma

Num tubo de fundo cónico, efetuou-se a precipitação das proteínas do plasma adicionando ácido sulfossalicílico desidratado. A mistura foi homogeneizada e permaneceu durante 10 minutos a 4 °C a precipitar. De seguida, a amostra foi centrifugada a 1600 xG por 10 minutos. O sobrenadante composto por aminoácidos livres no plasma foi ainda filtrado para a posterior análise cromatográfica.

### 2.2.2 Separação Cromatográfica

A cada amostra injetada foi previamente adicionado um padrão interno e os aminoácidos livres foram separados de acordo com o protocolo do fabricante. A cromatografia foi realizada numa coluna a 200x4.6 mm, com uma taxa de fluxo de tampão a 25 ml/h e de ninidrina a 20 ml/h (**Figura 19**). O padrão interno tem como objetivo confirmar a injeção total das amostras.



**Figura 19 | Amino-Acid Analyser.**

### 2.2.3 Análise dos Cromatogramas

A análise quantitativa de aminoácidos livres no plasma por IEC foi executada no *Biochrom 30 of Amino-Acid Analysers*.

## 3. Análise Molecular

Para a análise molecular dos casos estudados foram usadas as técnicas de amplificação do gDNA através de PCR e posterior análise através da sequenciação automática.

### 3.1 Reação em Cadeia da Polimerase

A reação em cadeia da polimerase (PCR – Polymerase chain reaction) é um método de amplificação exponencial de segmentos de DNA, que faz uso de *primers* complementares das sequências de DNA que se pretendem amplificar, dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatados - dATP, dGTP, dCTP, dTTP) e de uma *taq* polimerase termoestável<sup>ii77</sup>.

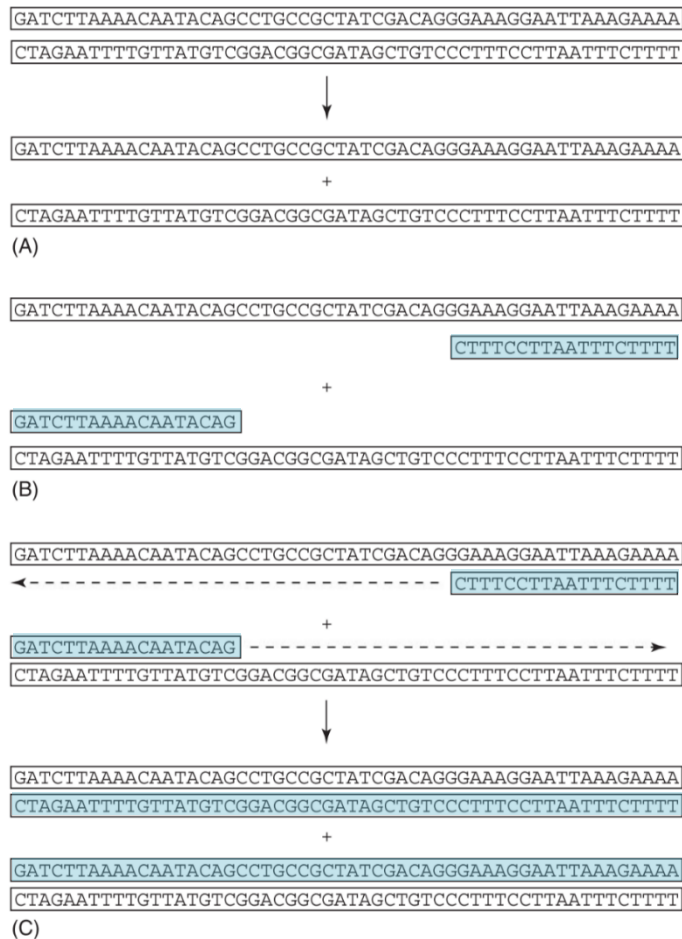
Durante a reação, a molécula de DNA é submetida a um ciclo térmico de aquecimento e arrefecimento. A primeira fase consiste na ativação da polimerase pelo aumento da temperatura na câmara de reação, tipicamente entre os 90 e 95 °C durante 10 minutos. O nível da temperatura é mantido por 20 segundos na fase de desnaturação, onde a dupla hélice é separada em duas cadeias simples pela quebra de ligação das pontes de hidrogénio. Durante a fase de *annealing*, os *primers* ligam-se por complementaridade às sequências nucleotídicas repetitivas, por um período de 20 segundos entre os 45 e 65 °C. A fase de alongação permite a ligação da polimerase às cadeias de DNA e a síntese de novas sequências complementares no sentido 5'-3', a uma temperatura entre os 68 e 72 °C durante 20 segundos ou até 2 minutos (**Figura 20**)<sup>77,78</sup>.

Na conclusão do primeiro ciclo, começa um novo a partir do DNA sintetizado anteriormente, amplificando 2<sup>n</sup> cópias de sequências de DNA após n, normalmente 25 a 40, ciclos. No último, as

---

<sup>ii</sup> A *taq* polimerase é uma DNA polimerase derivada da bactéria *Thermus aquaticus*, que permanece ativa acima da temperatura de desnaturação da molécula de DNA.

cadeias simples passam por uma fase de extensão, que garante a elongação total das sequências a uma temperatura ideal de 72 °C durante 10 minutos. Na fase final, a temperatura do termociclador é arrefecida até 4 °C com o objetivo de armazenar as amostras até serem removidas do termociclador<sup>77,78</sup>.



**Figura 20 | Etapas da PCR. (A)** Fase de desnaturação. **(B)** Fase de *annealing* de primers na posição 5'. **(C)** Fase de elongação no sentido 5'->3'. Adaptado de Caetano-Anollés (2013).

Os produtos de PCR são posteriormente validados por eletroforese em gel de agarose, com o intuito de confirmar se apresentam um tamanho esperado<sup>77,78</sup>. A separação eletroforética em gel de agarose é um método muito utilizado no estudo do DNA, pois permite a migração de moléculas carregadas ao longo de um campo elétrico. No gel, as cadeias de DNA amplificadas migram ao longo da matriz de agarose em direção ao polo positivo, visto que os grupos fosfatos estão negativamente carregados. Por sua vez, a taxa de migração é influenciada pelo tamanho e a conformação da

molécula de DNA, bem como a força iônica da solução tampão<sup>79,80</sup>.

### 3.2 Sequenciação Automática

A sequenciação pelo método de Sanger baseia-se na amplificação linear de uma sequência de DNA de interesse a partir de uma cadeia simples de DNA, *primers* de apenas um sentido, uma DNA polimerase, dNTPs e ddNTPS (didesoxinucleótidos trifosfatados)<sup>81</sup>.

Os ddNTPs são bases terminadoras fluorescentes com os grupos hidroxilo nas posições 2' e 3' da ribose ausentes. Durante a incorporação de nucleótidos à cadeia em elongação, os dNTPs e ddNTPs apresentam a mesma probabilidade serem adicionados à sequência pela DNA polimerase. Posto isto, a extensão da cadeia simples é interrompida assim que seja adicionado um ddNTP e, por essa razão, o produto final da reação vai apresentar moléculas de DNA de comprimentos variados marcados com um fluoróforo na extremidade 3'<sup>81,82</sup>.

Cada ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) detém uma fluorescência distinta, por exemplo, a arginina emite fluorescência verde, a guanina emite cor escura, a citosina emite fluorescência azul e a timina cor vermelha. A intensidade da fluorescência é detetada por um laser após eletroforese capilar, produzindo uma serie de picos correspondentes a cada ddNTP, criando uma sequência cromatográfica – eletroferograma (**Figura 21**)<sup>82,83</sup>.

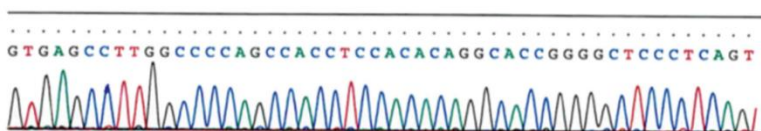


Figura 21 | Eletroferograma por sequenciação pelo método de Sanger<sup>82</sup>.

### 3.3 Estudo dos Genes *AMACR* e *GCK*

Os *primers* foram desenhados pela ferramenta do NCBI Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e marcados com uma sequência M13<sup>iii</sup>.

<sup>iii</sup> Sequência de 18 nucleótidos universal e complementar a fragmentos de DNA.

### 3.3.1 Amplificação do gDNA

Para cada fragmento de DNA a estudar, foi preparada uma mistura PCR com *primers* (Foward/Reverse) (10pmol/ $\mu$ l), *EmeraldAmp MAX PCR Master Mix* (que inclui um tampão de reação, *taq* polimerase, dNTPs, corante e um reagente de densidade) (Takara Bio Inc.) e gDNA. A mistura para amplificação por PCR foi submetida a um programa de 30 ciclos com as condições listadas nas **Tabela 3** e **Tabela 4**, no termociclador *Veriti Thermal Cycle*.

**Tabela 3 | Descrição dos primers desenhados para o estudo do gene *AMACR* (com cauda M13).**

Região	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de annealing (°C)	Sequência do primer (5'->3')
<b>Exão 1</b>	600	7' a 95°C; 30x [45'' a 95°C; 45'' a 62 °C; 1' a 72°C]; 7' a 72°C	<b>1F</b> tgtaaaacgacggccagtTCAGTCCCTGCAATTTAAGACT
			<b>1R</b> caggaaacagctatgaccTCGATCGAACGGCCAGG
<b>Exão 2</b>	423		<b>2F</b> tgtaaaacgacggccagtTGCTGTAAACATGCCATTAGCC
			<b>2R</b> caggaaacagctatgaccCATTTTGAACCCCATGCTCT
<b>Exão 3</b>	477		<b>3F</b> tgtaaaacgacggccagtCCTGTCTTGAGGGAAAGCCT
			<b>3R</b> caggaaacagctatgaccTCCTTGGAACCTGGCTTGAA
<b>Exão 4</b>	527		<b>4F</b> tgtaaaacgacggccagtACTGCTCTAACTCACTTTCTGG
			<b>4R</b> caggaaacagctatgaccTAAAAGCCATGGAAAATGCC
<b>Exão 5</b>	479		<b>5F</b> tgtaaaacgacggccagtTACAGTGGGCTCAGCATTCA
			<b>5R</b> caggaaacagctatgaccATCAAGCAAACCTGGAAGGCAG

pb: Pares de bases

°C: graus centígrados

Tabela 4 | Descrição dos *primers* desenhados para o estudo do gene *GCK* (com cauda M13).

Região	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de annealing (°C)	Sequência do <i>primer</i> (5'->3')
Exão 1	748	10' a 95°C; 32x [45'' a 95°C; 45'' a 62 °C; 1' a 72°C]; 7' a 72°C	1F tgtaaaacgacggccagtGCCCTCTCAGGAGCACAGTA
			1R aggaaacagctatgaccAAAGCTGGATGGGTCTGCCA
Exão 1a	450		1aF tgtaaaacgacggccagtATCCCTACCCCATGTTACAG
			1aRcaggaaacagctatgaccGGTAATCTGCAAAACCAAGGG
Exão 2	329		2F tgtaaaacgacggccagtCGCCTCTCCCACTGCTATC
			2R caggaaacagctatgaccGGCTTGGTGAAAGCGATAAGA
Exão 2a	376		2aF tgtaaaacgacggccagtTGTGCAGATGCCTGGTGACAG
			2aRcaggaaacagctatgaccTTCATTGCTCCCAGGAGATTC
Exão 3	328		3F tgtaaaacgacggccagtTTTGTAAATATCCGGGCTCAGTC
			3R caggaaacagctatgaccCACCTCCCCTCAGGACTA
Exão 4	307	4F tgtaaaacgacggccagtCCCTGAGGAATAGCTTGCT	
		4R caggaaacagctatgaccGCACATGGTATGGGGGCTAC	
Exão 5-6	552	5-6F tgtaaaacgacggccagtACCTCTCAAAGCTATGGGGC	
		5-6R caggaaacagctatgaccTAGTTTGGTCTCACCCAC	
Exão 7	463	7F tgtaaaacgacggccagtCCGCCTTCCATTGTTCCAG	
		7R caggaaacagctatgaccGGATGGAGCTTACGAACGGAT	
Exão 8	453	8F tgtaaaacgacggccagtTTGCTCCCGTGATTGACTTGAA	
		8R caggaaacagctatgaccACCAAGTCTGCAGTGCCCG	
Exão 9	542	9F tgtaaaacgacggccagtGAAACGCTTTGGCTGGGTGA	
		9R caggaaacagctatgaccGGGACGAGAAGAGGACTAC	
Exão 10	565	10F tgtaaaacgacggccagtTCGTAGTCTCTTCTCGTCCC	
		10R caggaaacagctatgaccCTGAGTGAGCAACTCCCTTC	

pb: Pares de bases      °C: graus centígrados

### 3.3.2 Análise dos Produtos de DNA amplificados em Gel de Agarose

Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose a 2% em tampão TAE (Tampão Tris-Acetato-EDTA), corado com *GelRed™* (corante fluorescente e ultrasensível utilizado na coloração de ácidos nucleicos) (Biotium)<sup>84</sup>. A eletroforese decorreu a 140 V durante 20 minutos e os fragmentos de DNA foram visualizados à luz ultravioleta no transiluminador (BioRad).

Desta forma, verificou-se a presença dos fragmentos de DNA amplificados, a ausência de contaminação e de DNA degradado.

### 3.3.3 Purificação dos Produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados por digestão enzimática de modo a eliminar *primers* e dNTPs não incorporados. Para isso, foi adicionada a mistura *ExoSap-IT* (que contém exonucleases e fosfatases alcalinas) (Affymetrix) a cada produto de PCR e a reação enzimática decorreu a 37 °C durante 30 minutos. Os produtos de reação foram posteriormente incubados durante 15 minutos a 80 °C para efetuar a inativação enzimática<sup>85</sup>.

### 3.3.4 Preparação de PCR Assimétrico para Sequenciação

Foi preparada uma reação de sequenciação que inclui o *Kit Big Dye™ Terminator cycle sequencing v3.1* (que contém dNTPs, ddNTPs marcados com fluorocromos, *taq* polimerase e um tampão de reação) (Applied Biosystems), os *primers forward* ou *reverse* (1,6 pmol/μl) e os produtos de PCR purificados.

No termociclador *Veriti Thermal Cycle*, o programa de PCR assimétrico foi constituído por 25 ciclos de ativação da polimerase/desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, desnaturação a 96 °C por 10 segundos, *annealing* a 50 °C por 5 segundos e extensão a 60 °C por 4 minutos.



### 3.3.5 Purificação dos Produtos Assimétrico para Sequenciação

Os produtos de sequenciação foram purificados utilizando colunas de resina *Shephadex G-50*, eliminando dNTPs e ddNTPs não incorporados e sais. As colunas foram centrifugadas a 5400 xG durante 4 minutos e o produto purificado foi evaporado no termobloco durante 20 minutos a 80°C.

A desnaturação do DNA foi efetuada por adição de formamida desionizada (*Hi-Di™ formamide*) aos produtos de PCR purificados. As colunas foram agitadas e deixadas a dissolver à temperatura ambiente durante 15 minutos.

### 3.3.6 Sequenciação dos Produtos de PCR por Eletroforese Capilar

A separação das sequências de DNA foi efetuada por eletroforese capilar no sequenciador *ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

### 3.3.7 Análise dos Cromatogramas de Sequenciação

As sequências foram alinhadas e comparadas com a sequência de referência para cada um dos genes reportadas no *browser* do genoma Ensembl, utilizando o *software SeqScape v2.5* (Applied Biosystems).

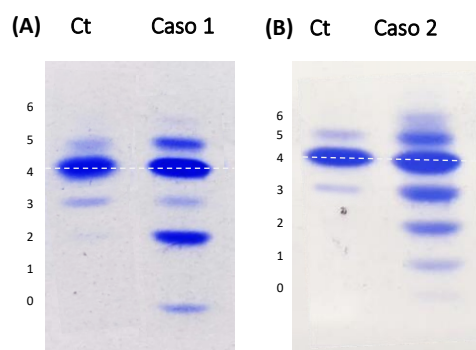
## Resultados e Discussão

Este capítulo apresenta e interpreta os resultados obtidos neste trabalho. Em primeiro lugar, são apresentados dois casos de doentes com défices congénitos de glicosilação. Em segundo, são exibidos cromatogramas de doentes com PKU, leucinose e tirosinemia. Por último, apresenta-se o eletroferograma de uma variante polimórfica no gene *GCK*.

### 1. Percentagens Séricas da Transferrina Deficiente em Carboidratos

As glicoproteínas são sintetizadas em abundância no fígado e, em particular, a transferrina sérica continua a ser a mais utilizada como um biomarcador não invasivo na análise de modificações fisiológicas hepáticas, como é o caso dos défices congénitos de glicosilação que estão fortemente relacionados com perfis atípicos da transferrina<sup>26</sup>.

O método de separação por focagem isoeletrica permitiu separar até 7 isoformas diferentes da Tf sérica nos géis que se apresentaram na **Figura 22**. Para a interpretação dos resultados, as isoformas deficientes em carboidratos são comparadas com os controlos estabelecidos na **Tabela 5**, onde numa pessoa não afetada o valor da dissialotransferrina tem de ser igual ou inferior a 2,6%.



**Figura 22 | Perfis das isoformas da Tf sérica de controlos e doentes. (A)** Exemplo de um perfil CDG-tipo 1 com alteração no gene *PMM2*. **(B)** Exemplo de um perfil CDG-tipo 2 com alteração no gene *SCL35A2*.

Tabela 5 | Percentagem sérica das isoformas da transferrina.

Transferrina (%)							
Isoformas	Assialo	Monossialo	Dissialo	Trissialo	Tetrassialo	Pentassialo	Hexassialo
<b>Controlo (A)</b>	-	-	2,1	10,1	57,8	25,2	4,7
<b>Controlo (B)</b>	-	-	2,4	10,2	58,0	13,5	16,5
<b>Caso 1</b>	7,0	-	23,4	4,5	49,5	15,6	-
<b>Caso 2</b>	2,0	5,9	14,3	20,2	36,8	10,0	10,1

Pela quantificação da percentagem de transferrina deficiente em carboidratos (% CDT) verificou-se que o caso 1 apresenta um perfil de CDG-tipo 1 (**Figura 24**), com as formas dissialo- e assialotransferrinas significativamente concentradas nos seus pontos isoelétricos. Comparativamente com o controlo (A) (**Figura 25**), verifica-se uma menor concentração da tetrassialotransferrina e aumento significativo das isoformas deficientes em carboidratos, como é esperado.

Pela análise molecular do gene *PMM2* verificou-se que o caso 1 apresenta uma variante causal, de deficiência na conversão da manose-6-fosfato (Man-6-P) em manose-1-fosfato (Man-1-P) pela fosfomanomutase 2, com resultante hipoglicosilação de glicoproteínas, como foi fundamentado no primeiro capítulo.

O caso 2 apresenta um perfil de TIEF compatível com um CDG-tipo 2 (**Figura 23**), pois apresenta uma concentração significativamente aumentada das isoformas trissialo-, dissialo-, monossialo- e assialotransferrina e uma diminuição da concentração da tetrassialotransferrina, comparativamente com o controlo (B) (**Figura 26**). Pela análise molecular do gene *SLC35A* verificou-se que o caso 2 apresentava uma variante causal de um defeito de maturação de glicanos no complexo de Golgi.

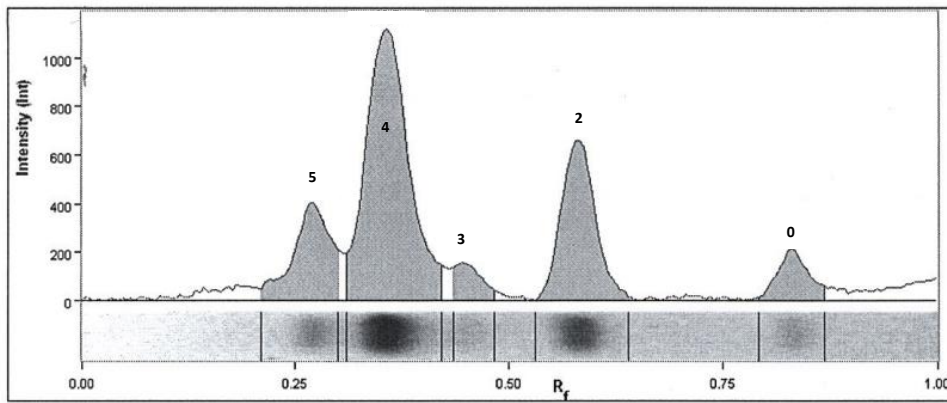


Figura 24 | Perfil isoeétrico da transferrina de um doente com DCG-tipo I.

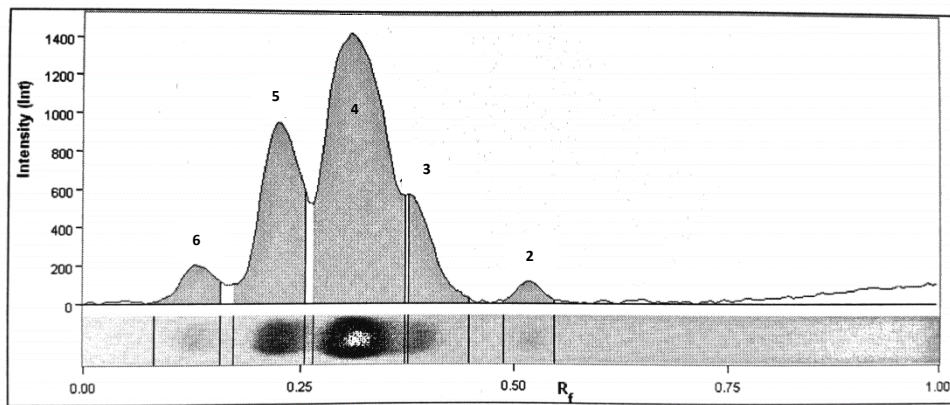


Figura 25 | Perfil isoeétrico da transferrina de uma pessoa normal - controlo (A).

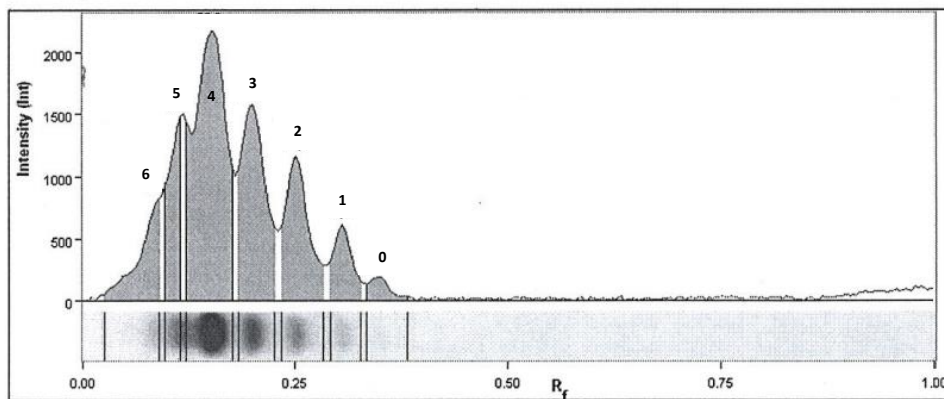


Figura 23 | Perfil isoeétrico da transferrina de um doente com DCG-tipo II.

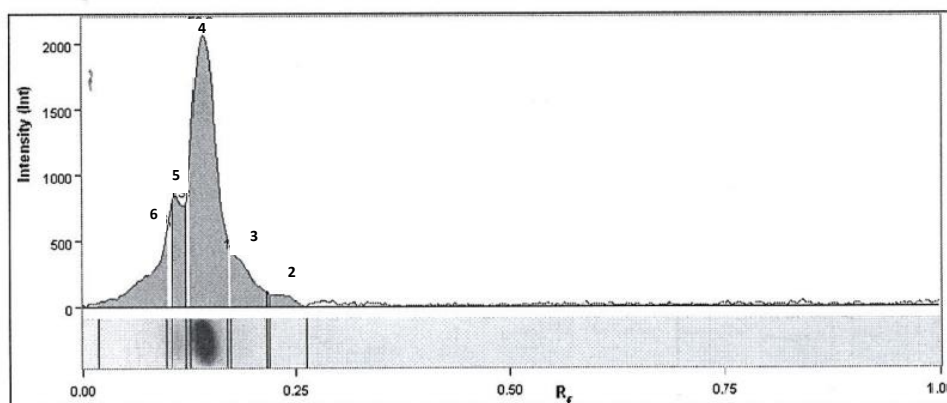


Figura 26 | Perfil isoelétrico da transferrina de uma pessoa normal - controle (B).

## 2. Cromatogramas de Aminoácidos Livres no Plasma

A análise dos resultados obtidos na cromatografia de aminoácidos livres no plasma permitiu obter um perfil normal que se apresenta na **Figura 27**. Nas **Figura 28**, **Figura 29** e **Figura 30**, são apresentados cromatogramas, representativos das aminoacidopatias descritas na introdução. Para interpretação destes resultados o valor da concentração de cada aminoácido é comparado com o intervalo de referência estabelecido para cada faixa etária (**Tabela 6**).

No perfil cromatográfico apresentado na **Figura 28** apresenta-se um doente com uma concentração de fenilalanina significativamente aumentada, relativamente ao intervalo de referência estabelecido para o grupo etário, enquanto a concentração plasmática de tirosina mantém-se contida no intervalo de referência para adultos. Este resultado é compatível com o diagnóstico de PKU e a análise molecular permitiu confirmar o diagnóstico pela identificação do genótipo do gene *PAH*.

No cromatograma da **Figura 29** apresenta-se um perfil compatível com o diagnóstico de leucínose. A allo-isoleucina, formada pela transaminação da isoleucina, é um biomarcador sensível em casos de leucínose e, neste em específico, apresentou concentrações plasmáticas significativamente aumentadas. As concentrações da valina, isoleucina e leucina também encontram aumentadas, relativamente com os valores referenciados para a faixa etária de adolescentes. O estudo molecular permitiu encontrar variantes causais.

Por fim, o terceiro cromatograma (**Figura 30**) apresenta-se um perfil de aminoácidos com um nível plasmático de tirosina significativamente aumentado, relativamente ao intervalo de referência definido para crianças, sendo compatível com um diagnóstico de tirosinemia. A análise molecular permitiu encontrar no gene *HPPD* duas variantes causais de tirosinemia tipo 3.

Tabela 6 | Valores de referência de alguns aminoácidos de acordo com a faixa etária.

Valores de Referência				
Aminoácidos Livres no Plasma ( $\mu\text{mol/L}$ )	Bebés (até 2 anos)	Crianças	Adolescentes (13 anos)	Adultos
Valina	133 - 273	79 - 267	142 - 278	144 - 269
Isoleucina	31 - 83	32 - 92	38 - 94	34 - 83
Leucina	64 - 164	53 - 149	76 - 168	78 - 160
Tirosina	34 - 82	14 - 114	40 - 92	35 - 84
Fenilalanina	35 - 67	26 - 70	38 - 78	39 - 74
Allo-isoleucina	1,2 - 3,4	-	-	-

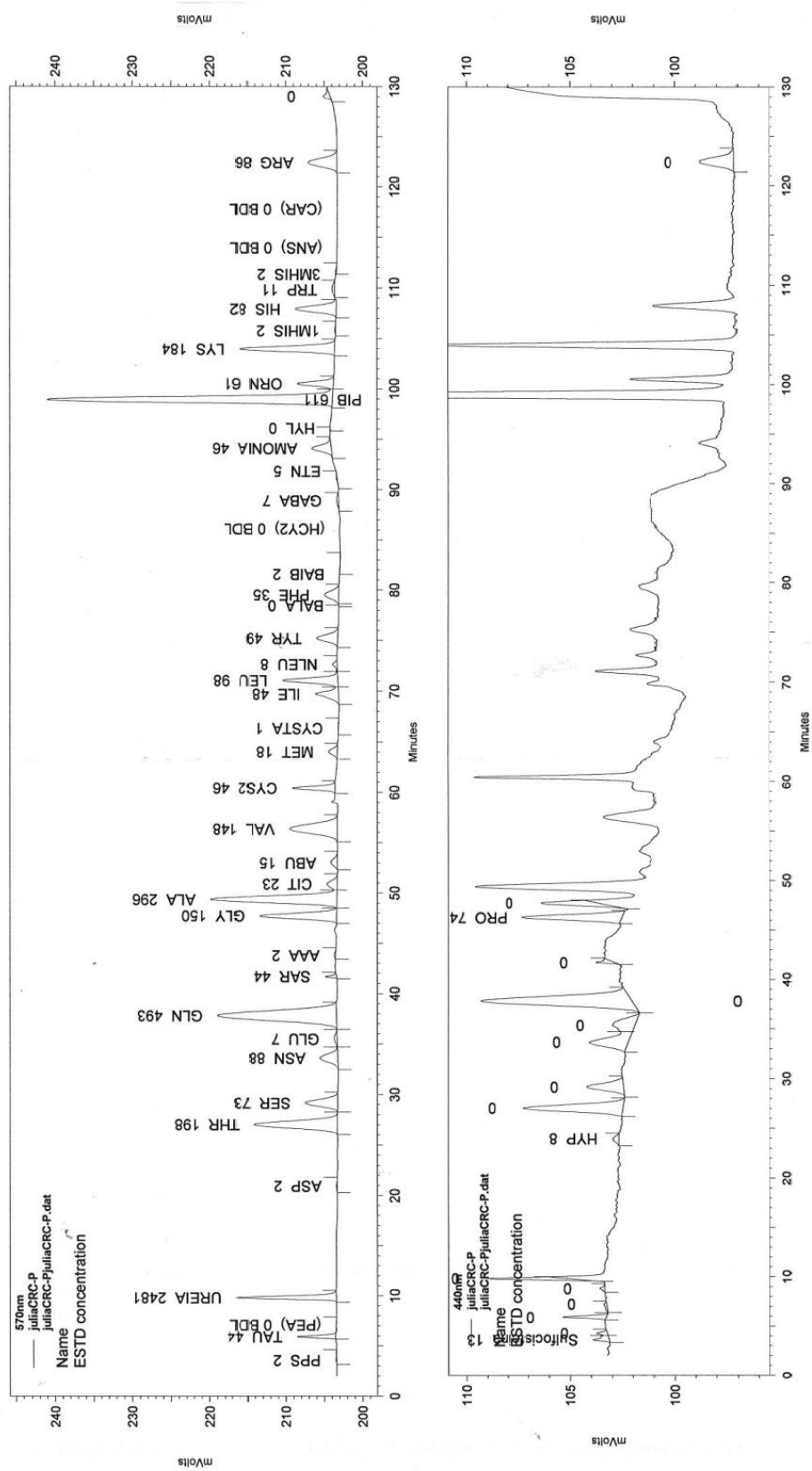


Figura 27 | Perfil cromatográfico de aminoácidos plasmáticos sem alterações.

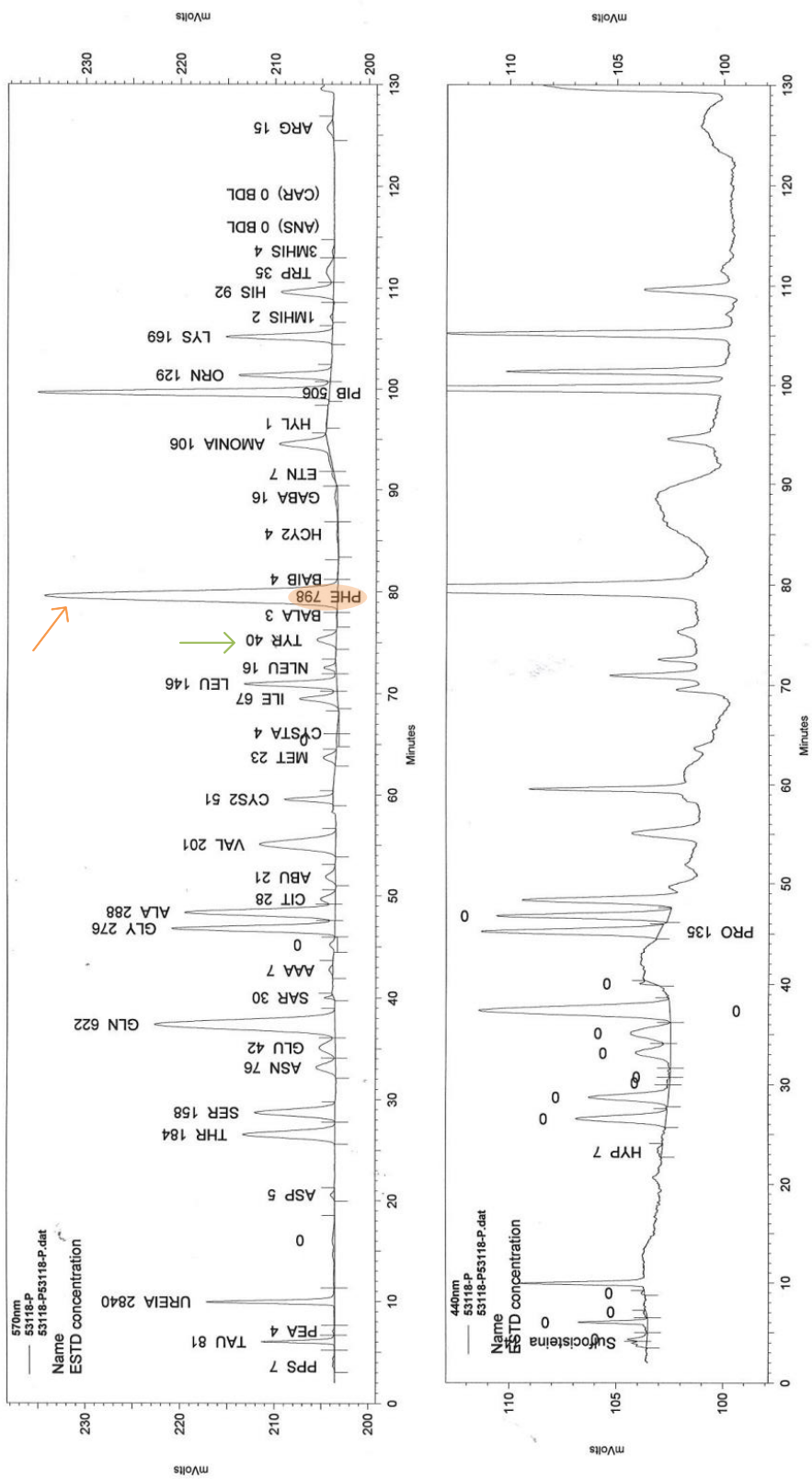


Figura 28 | Perfil cromatográfico de aminoácidos plasmáticos em doente com PKU.



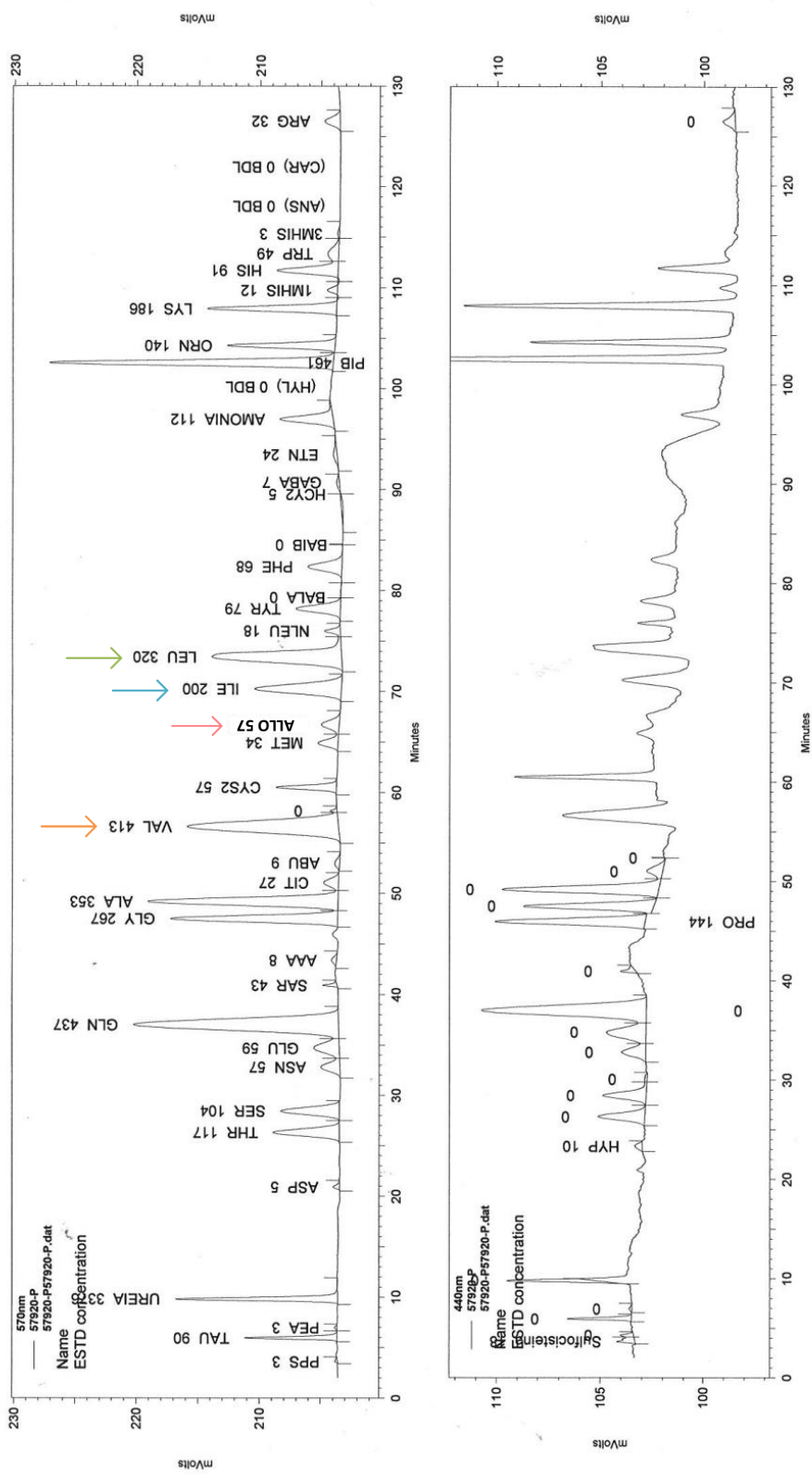


Figura 29 | Perfil cromatográfico de aminoácidos plasmáticos em doente com leucinoze.

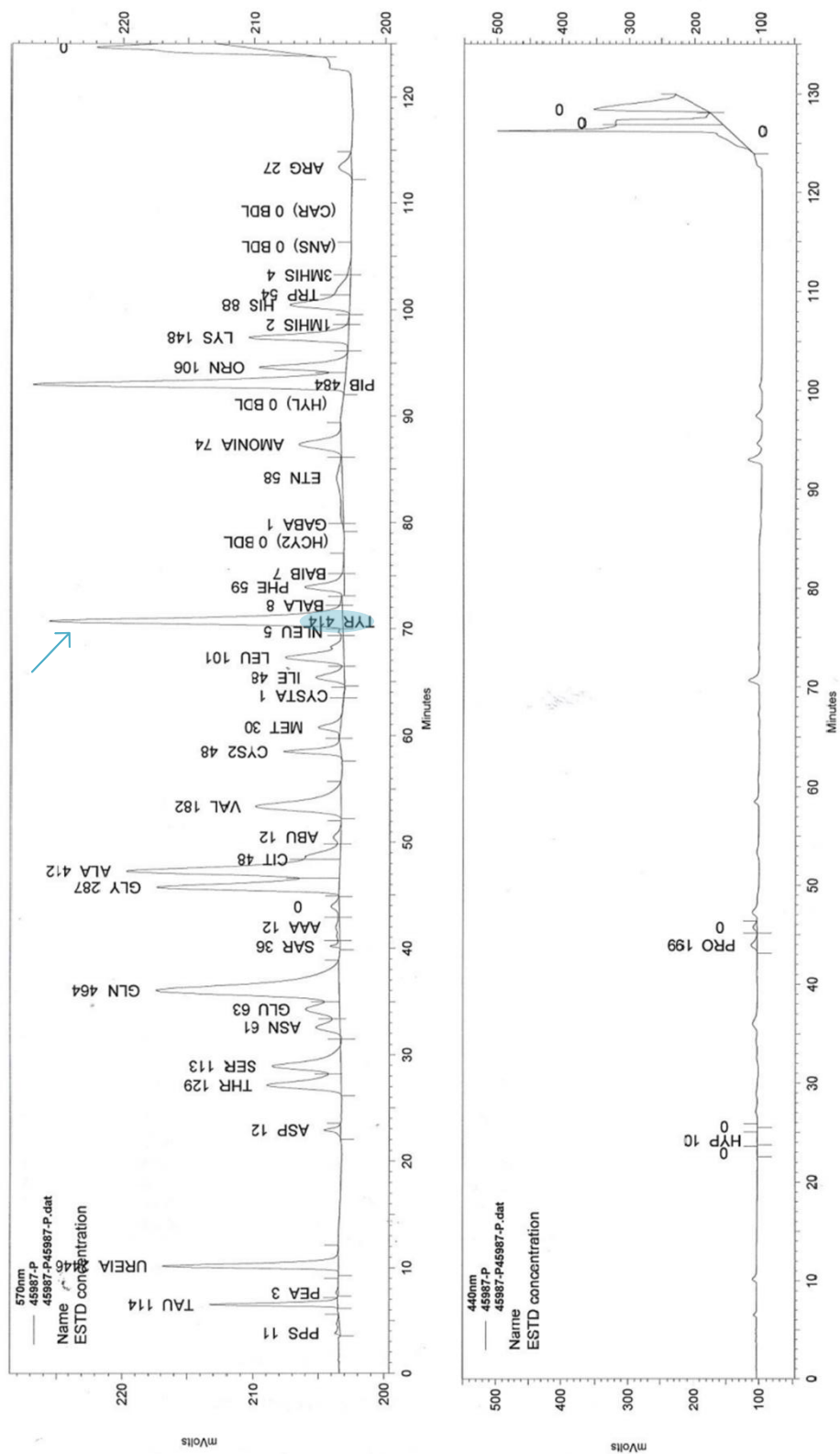


Figura 30 | Perfil cromatográfico de aminoácidos plasmáticos em doente com tirosinemia tipo 3.

### 3. Estudos Moleculares

Nos dois casos estudados, a análise molecular permitiu confirmar a presença de uma alteração génica, uma variante polimórfica de um nucleótido (SNP – Single nucleotide polymorphism) no gene *GCK*. Contudo, não foi detetada qualquer alteração no gene *AMACR*, continuando o doente sem diagnóstico.

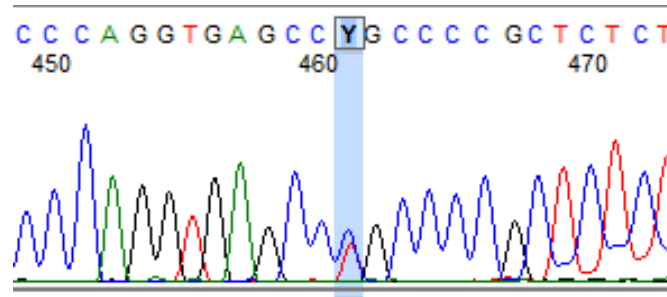
#### 3.1 Estudo do gene *GCK*

A análise dos resultados obtidos da sequenciação do gene *GCK* a partir de DNA genómico extraído de sangue total periférico, mostrou a presença de uma alteração na região intrónica flanqueante do exão 9 (**Figura 31**).

```
gaaacgctttggctgggtgaggtagcgggatcgccccatttctccagagaggggtcccggctcagcgagggaaagaggcccgctggggggacggct
ggccggggcccctccctggagaacgagagggccgcccctggagggggatggactgtcggagcgacactcagcgaccgccctacctctcccggcccgag
CGACACGGGGACCGCAAGCAGATCTACAACATCCTGAGCACGCTGGGGCTGCGACCCTCGACCACCGACTGCGAC
ATCGTGCGCCGCGCCTGCGAGAGCGTGTCTACGCGCGCTGCGCACATGTGCTCGGCGGGGCTGGCGGGCGTCATCA
ACCGCATGCGGAGAGCCGAGCGAGGACGTAATGCGCATCACTGTGGGCGTGGATGGCTCCGTGTACAAGCTGC
ACCCAGgtgagccgccccgctctctcctgtaaaagtggggcccaaaaagcgcgctccaaggttcttgcggtccaagctccaagattcgtag
tcctctctcgtcccc
```

Figura 31 | Fragmento do gene *GCK* amplificado e sequenciado - exão 9 e respetivas zonas intrónicas flanqueantes.

A alteração NM\_000162.5(GCK):c.1253+8C>T, que consiste na substituição de um resíduo de citosina por um resíduo de timina, encontra-se presente em heterozigotia (**Figura 32**).



**Figura 32** | Eletroferograma de um fragmento do gene *GCK*, com a variante NM\_000162.5(GCK):c.1253+8C>T em heterozigotia.

Esta variante está classificada na base de dados da ClinVar<sup>86</sup> como sendo de natureza polimórfica (dbSNP: rs2908274) e benigna, dado que:

A Illumina Clinical Services Laboratory efetuou um rastreio de predisposição para a MODY2 numa população saudável, tendo detetada a presença da variante c.1253+8C>T no gene *GCK*. Dado que esta alteração não tinha sido previamente reportada na *Human Gene Mutation Database* foi sujeita a um sistema de classificação automática, que utiliza dados como: a frequência da variante alélica, a prevalência da doença, a estimativa da penetrância e o modo de hereditariedade. Com base na pontuação obtida esta variante foi classificada como benigna para a doença<sup>86</sup>.

## Conclusão

As doenças hereditárias do metabolismo (DHM) representam coletivamente um dos grupos mais comuns de doenças genéticas, apesar de serem individualmente raras (<1: 2000) ou ultra-raras (<1: 2.000.000).

Muitos defeitos genéticos que estão na etiologia das DHM são deficiências enzimáticas em vias biossintéticas e metabólicas vitais. No entanto, as DHM também incluem defeitos de proteínas estruturais, proteínas de transporte, chaperonas e outras proteínas regulatórias pertencentes a um dado processo metabólico.

As DHM estão normalmente associadas a apresentações fenotípicas muito debilitantes e frequentemente fatais, incluindo epilepsia, déficit intelectual, cardiomiopatia, insuficiência hepática, miopatia e imunodeficiência. Assim é essencial obter um diagnóstico genético definitivo, que tem implicações clínicas, terapêuticas e psicológicas para os doentes e famílias. Apesar de sua gravidade, há várias DHM tratáveis ou passíveis de intervenção clínica, como seja a restrição dietética, a administração de metabolitos ou a terapia de suplementação enzimática, que reduzem a mortalidade, a morbidade e melhoram a qualidade de vida. Infelizmente, os doentes com DHM passam frequentemente por odisseias prolongadas até à obtenção de diagnóstico, devido à complexidade das apresentações clínicas e à complexa patofisiologia subjacente a uma doença metabólica.

A falta de características clínicas específicas, bem como de programas de rastreios neonatais são obstáculos para a obtenção de diagnósticos precoces. A heterogeneidade genética das DHM é outro fator importante pois os grupos mais comuns de DHM podem ser resultantes de centenas de mutações, ou seja, variantes causais. Nos últimos anos, o uso de tecnologias de sequenciação de última geração (NGS) ajudou a melhorar a taxa de diagnóstico de DHM e aumentou exponencialmente a taxa de descoberta de novas variantes genéticas.

Como a sequenciação por NGS está cada vez mais acessível e mais rápida, tem vindo a emergir como o método preferido de diagnóstico genético. Adicionalmente em muitos casos, pode evitar a necessidade de testes de diagnósticos invasivos como biópsias musculares ou hepáticas, limitando a exposição de doentes vulneráveis, principalmente crianças, à anestesia geral, que em alguns casos pode desencadear descompensação metabólica. A sequenciação de painéis de genes por NGS tem, no entanto, grandes desafios particularmente quando no que respeita à análise de variantes de significado desconhecido (VUS) ou à avaliação da potencialidade de genes candidatos ao

diagnóstico. A dificuldade de interpretação da causalidade de variantes é ainda mais complexa em doenças com grande heterogeneidade fenotípica.

A utilização de metodologias de diagnóstico bioquímico no estudo de vias metabólicas é determinante para estabelecimento da causalidade, ou seja, para confirmação se uma variante é patogênica ou não. A aplicação de tecnologia de análise de metabolitos é, portanto, essencial para a caracterização de manifestações fenotípicas associadas a um defeito genético específico. A análise de biomarcadores abrangentes e pesquisáveis representam complementos económicos e essenciais na interpretação dos achados do NGS. As metodologias analíticas apresentadas nesta monografia e aplicadas ao estudo metabólico de amostras biológicas como o sangue, a urina, o líquido cefalorraquidiano e o líquido amniótico, são recursos de diagnóstico essenciais para serem estudados em combinação com a sequenciação de painéis de genes, sequenciação de exoma (WES) ou do genoma (WGS). A adoção da metabolómica nas bases de dados de conhecimento biomédico é essencial na era da NGS e do WES/WGS não só para obtenção de prova de causalidade dos achados moleculares e obtenção de diagnósticos genéticos definitivos, mas também para esclarecimento das VUS, dada a dificuldade em distinguir as variantes patogênicas de variantes causadas por variação genética na população e de mutações individuais de ocorrência natural (uma média de cerca de 100 variantes de perda de função de ocorrência natural por genoma).

A elaboração desta monografia contribuiu, assim, para o estudo do vasto grupo das DHM, no que respeita ao impacto nas vias metabólicas afetadas e tradução em fenótipo clínico. O trabalho prático desenvolvido permitiu tomar conhecimento de diferentes técnicas analíticas utilizadas no diagnóstico bioquímico e molecular das DHM, para além de ter sido de extrema importância no desenvolvimento de aptidões pessoais.

Em conclusão, as DHM são um grupo de doenças raras e elevada complexidade. O reconhecimento de novas doenças hereditárias do metabolismo é crescente e, por essa razão, torna-se desafiante compreender os novos mecanismos de ação. Além disso, a colaboração interdisciplinar tem vindo a desempenhar um papel chave na investigação, no diagnóstico e na evolução de novas abordagens terapêuticas destas patologias.

## Bibliografia

1. Beauder AL, Scriver CR, Sly WS, Valle D. Genetics, Biochemistry, and Molecular Bases of Variant Human Phenotypes. In: Criver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease - Volume I*. 8th ed. ; 2001:3-45.
2. Jimenez-Sanchez G, Childs B, Valle D. The Effect of Mendelian Disease on Human Health. In: Criver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease - Volume I*. 8th ed. ; 2001:167-174.
3. Ferreira CR, van Karnebeek CDM. Inborn errors of metabolism. In: Vries LS de, Glass HC, eds. *Handbook of Clinical Neurology*. Vol 162. 1st ed. Elsevier B.V.; 2019:449-481. doi:10.1016/B978-0-444-64029-1.00022-9
4. Garg U, Smith LD. Introduction to laboratory diagnosis and biomarkers in inborn error of metabolism. In: Garg U, Smith LD, eds. *Biomarkers in Inborn Errors of Metabolism*. Elsevier Inc.; 2017:1-24. doi:10.1016/B978-0-12-802896-4.00001-8
5. Ezgu F. Inborn Errors of Metabolism. In: Gregory S. Makowski, ed. *Advances in Clinical Chemistry*. Vol 73. 1st ed. Elsevier Inc.; 2016:195-250. doi:10.1016/bs.acc.2015.12.001
6. Platt FM, D'Azzo A, Davidson BL, Neufeld EF, Tiffet CJ. Lysosomal storage diseases. *Nat Rev Dis Prim*. 2018;4(1):1-25. doi:10.1038/s41572-018-0025-4
7. Brasil S, Pascoal C, Francisco R, et al. CDG therapies: From bench to bedside. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5):1-47. doi:10.3390/ijms19051304
8. Biffi S, Tamaro G, Bortot B, Zamberlan S, Severini GM, Carrozzi M. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a biochemical tool for the screening of congenital disorders of glycosylation (CDGs). *Clin Biochem*. 2007;40(18):1431-1434. doi:10.1016/j.clinbiochem.2007.08.015
9. Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol*. 2019;15(6):346-366. doi:10.1038/s41581-019-0129-4
10. Spiro RG. Protein glycosylation: Nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*. 2002;12(4):43-56. doi:10.1093/glycob/12.4.43R
11. Goreta SS, Dabelic S, Dumic J. Insights into complexity of congenital disorders of

- glycosylation. *Biochem Medica*. 2012;22(2):156-170. doi:10.11613/bm.2012.019
12. Pérez-Cerdá C, Quelhas D, Vega AI, Ecay J, Vilarinho L, Ugarte M. Screening using serum percentage of carbohydrate-deficient transferrin for congenital disorders of glycosylation in children with suspected metabolic disease. *Clin Chem*. 2008;54(1):93-100. doi:10.1373/clinchem.2007.093450
  13. Gadomski TE, Bolton M, Alfadhel M, et al. ALG13-CDG in a male with seizures, normal cognitive development, and normal transferrin isoelectric focusing. *Am J Med Genet Part A*. 2017;173(10):2772-2775. doi:10.1002/ajmg.a.38377
  14. Martinez-duncker I, Dupre T, Piller F, et al. Genetic complementation reveals a novel human congenital disorder of glycosylation of type II , due to inactivation of the Golgi CMP – sialic acid transporter. 2005;105(7):2671-2676. doi:10.1182/blood-2004-09-3509.Supported
  15. Gámez A, Serrano M, Gallego D, Vilas A, Pérez B. New and potential strategies for the treatment of PMM2-CDG. *BBA - Gen Subj*. 2020;1864(11):129686. doi:10.1016/j.bbagen.2020.129686
  16. Jaeken J, Leuven KU. *Glycosylation and Its Disorders : General Overview*. Elsevier Inc.; 2016. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.04632-8
  17. Eklund EA, Merbouh N, Ichikawa M, et al. Hydrophobic Man-1-P derivatives correct abnormal glycosylation in Type I congenital disorder of glycosylation fibroblasts. *Glycobiology*. 2005;15(11):1084-1093. doi:10.1093/glycob/cwj006
  18. Yuste-Checa P, Brasil S, Gámez A, et al. Pharmacological chaperoning: a potential treatment for pmm2-cdg. *Humam Mutat*. 2017;38(2):160-168. doi:10.1002/humu.23138.This
  19. SLC35A2 gene. Genetics Home Reference. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SLC35A2>. Accessed August 27, 2020.
  20. Ng BG, Sosicka P, Almannai M, et al. SLC35A2-CDG: Functional characterization , expanded molecular , clinical , and biochemical phenotypes of 30 unreported Individuals. *Hum Mutat*. 2019;40(February):908-925. doi:10.1002/humu.23731
  21. SLC35A2-congenital disorder of glycosylation. Genetics Home Reference. <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/slc35a2-congenital-disorder-of-glycosylation#definition>. Accessed August 27, 2020.
  22. Dörre K, Olczak M, Wada Y, et al. A new case of UDP-galactose transporter deficiency



- (SLC35A2-CDG): molecular basis, clinical phenotype, and therapeutic approach. *J Inherit Metab Dis*. 2015;38(5):931-940. doi:10.1007/s10545-015-9828-6.
23. Lacerda LMWG, Quelhas D. Genética Bioquímica Doenças Hereditárias do Metabolismo. 2018:178.
  24. Gomme PT, McCann KB. Transferrin structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discov Today*. 2005;10(4):267-273. doi:10.1016/S1359-6446(04)03333-1
  25. Elsayed ME, Sharif MU, Stack AG. *Transferrin Saturation: A Body Iron Biomarker*. Vol 75. 1st ed. Elsevier Inc.; 2016. doi:10.1016/bs.acc.2016.03.002
  26. Gruszevska E, Wrona A, Gudowska M, et al. The transferrin isoforms in chronic hepatitis. *Clin Biochem*. 2017;50(18):1131-1135. doi:10.1016/j.clinbiochem.2017.06.013
  27. A Brief Guide to the Twenty Common Amino Acids. Compound Interest. read://https\_www.compoundchem.com/?url=https%3A%2F%2Fwww.compoundchem.com%2F2014%2F09%2F16%2Faminoacids%2F%23disqus\_thread. Published 2014. Accessed August 26, 2020.
  28. Rice GM, Steiner RD. Inborn Errors of Metabolism (Metabolic Disorders). *Pediatr Rev*. 2016;37(1):3-47. doi:doi:10.1542/pir.2014-0122
  29. DeArmond PD, Dietzen DJ, Pyle-Eilola AL. *Amino Acids Disorders*. Elsevier Inc.; 2017. doi:10.1016/b978-0-12-802896-4.00003-1
  30. PAH gene - phenylalanine hydroxylase. Genetics Home Reference. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PAH#>. Accessed August 21, 2020.
  31. Macdonald A. Phenylketonuria. *Ref Modul Life Sci*. 2017:1-7. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.06896-5
  32. Nyhan WL, Haas R. *Inborn Errors of Amino Acid Metabolism*. Fifth Edit. Elsevier Inc.; 2015. doi:10.1016/B978-0-12-410529-4.00056-5
  33. Maple Syrup Urine Disease. National Organization for Rare Disorders. <https://rarediseases.org/rare-diseases/maple-syrup-urine-disease/>. Accessed August 22, 2020.
  34. Cleary MA, Skeath R, Macdonald A. Phenylketonuria. National Organization for Rare Disorders. doi:10.1016/j.paed.2019.01.001

35. Tetrahydrobiopterin deficiency. National Organization for Rare Disorders. <https://rarediseases.org/gard-rare-disease/7751/tetrahydrobiopterin-deficiency/>. Accessed August 25, 2020.
36. Tetrahydrobiopterin deficiency. Genetics Home Reference. <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/tetrahydrobiopterin-deficiency#genes>. Accessed August 21, 2020.
37. Maple syrup urine disease. Genetics Home Reference. <https://medlineplus.gov/genetics/condition/maple-syrup-urine-disease/#causes>. Accessed August 22, 2020.
38. Schadewaldt P, Bodner-leidecker A, Hammen H, Wendel U. Significance of L -Alloisoleucine in Plasma for Diagnosis of Maple Syrup Urine Disease. *Clin Chem*. 1999;45(10):1734-1740. doi:<https://doi.org/10.1093/clinchem/45.10.1734>
39. PubChem Compound Summary for CID 99288, L-Alloisoleucine. National Center for Biotechnology Information. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-Alloisoleucine>. Published 2020. Accessed August 27, 2020.
40. PubChem Compound Summary for CID 6306, I-Isoleucine. National Center for Biotechnology Information. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/I-Isoleucine>. Published 2020. Accessed November 30, 2020.
41. Tyrosinemia. Genetics Home Reference. <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/tyrosinemia#definition>. Accessed September 2, 2020.
42. Tyrosinemia Type 1. National Organization for Rare Disorders. <https://rarediseases.org/rare-diseases/tyrosinemia-type-1/>. Accessed September 2, 2020.
43. TAT gene. Genetics Home Reference. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TAT>. Accessed September 2, 2020.
44. Froguela P, Velhob G. Molecular genetics of maturity-onset diabetes of the young. *Ter Arkh*. 1999;10(4):142-146. doi:[https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(98\)00134-9](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(98)00134-9)
45. Gaspar G, Seuanes F, Duarte JS, et al. Diagnóstico genético da diabetes tipo MODY na população portuguesa. *Obs Epidemiológico Insa*. 2013;12(5):30-32. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/1663>.
46. Maturity-onset diabetes of the young. Genetics Home Reference.

<https://medlineplus.gov/genetics/condition/maturity-onset-diabetes-of-the-young/#description>. Accessed October 13, 2020.

47. Tucker S, Philipson L, Naylor R. *The Role of Monogenic Diabetes in Pediatric Type 2 Diabetes*. Elsevier Inc.; 2019. doi:10.1016/b978-0-323-55138-0.00005-x
48. Gutierrez-Nogués A, García-Herrero CM, Oriola J, Vincent O, Navas MA. Functional characterization of MODY2 mutations in the nuclear export signal of glucokinase. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2018;1864(7):2385-2394. doi:10.1016/j.bbadis.2018.04.020
49. Shamma C, Neocleous V, Phelan MM, Lian LY, Skordis N, Phylactou LA. A report of 2 new cases of MODY2 and review of the literature: Implications in the search for type 2 Diabetes drugs. *Metabolism*. 2013;62(11):1535-1542. doi:10.1016/j.metabol.2013.06.007
50. Sneha P, Thirumal Kumar D, Lijo J, Megha M, Siva R, George Priya Doss C. Probing the Protein–Protein Interaction Network of Proteins Causing Maturity Onset Diabetes of the Young. In: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. Vol 110. 1st ed. Elsevier Inc.; 2018:167-202. doi:10.1016/bs.apcsb.2017.07.004
51. Bile Acid Synthesis Disorders. National Organization for Rare Disorders. [rarediseases.org/rare-diseases/bile-acid-synthesis-disorders](http://rarediseases.org/rare-diseases/bile-acid-synthesis-disorders). Published 2019. Accessed October 23, 2020.
52. Dawson PA. Bile Acid Metabolism. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes: Sixth Edition*. Sixth Edit. Elsevier; 2016:359-389. doi:10.1016/B978-0-444-63438-2.00012-2
53. Peter T. C. Disorders of Bile Acid Synthesis. In: Fernandes J, Georges J-MS, Berghe G van den, Walter JH, eds. *Inborn Metabolic Diseases*. 4th ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2006:561. doi:[https://doi.org/10.1007/978-3-540-28785-8\\_34](https://doi.org/10.1007/978-3-540-28785-8_34)
54. Li T, Apte U. *Bile Acid Metabolism and Signaling in Cholestasis, Inflammation, and Cancer*. 1st ed. Elsevier Inc.; 2015. doi:10.1016/bs.apha.2015.04.003
55. Lloyd MD, Yevglevskis M, Lee GL, Wood PJ, Threadgill MD, Woodman TJ.  $\alpha$ -Methylacyl-CoA racemase (AMACR): Metabolic enzyme, drug metabolizer and cancer marker P504S. *Prog Lipid Res*. 2013;52(2):220-230. doi:10.1016/j.plipres.2013.01.001
56. Ferdinandusse S, Denis S, Clayton PT, et al. Mutations in the gene encoding peroxisomal  $\alpha$ -methylacyl-CoA racemase cause adult-onset sensory motor neuropathy. *Nat Genet*. 2000;24(2):188-191.

57. Alpha-methylacyl-CoA racemase deficiency. Genetics Home Reference. <https://medlineplus.gov/genetics/condition/alpha-methylacyl-coa-racemase-deficiency/#causes>. Accessed October 25, 2020.
58. Friedman DB, Hoving S, Westermeier R. Isoelectric Focusing and Two-Dimensional Gel Electrophoresis. In: *Methods in Enzymology*. Vol 463. 1st ed. Elsevier Inc.; 2009:515-540. doi:10.1016/S0076-6879(09)63030-5
59. Dubrin AJ. Isoelectric Focusing. *Encycl Immunol*. 1998;(October):1510-1514.
60. Product Information - Ampholine. SIGMA. [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/a5549pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a5549pis.pdf). Accessed July 12, 2020.
61. Leuven KU. Congenital Disorders of Glycosylation: A Review. *Pediatr Researsh*. 2002;52(5):618-624. doi:10.1203/01.PDR.0000031921.02259.35
62. Matias C, Belnap DW, Smith MT, et al. Citrate and albumin facilitate transferrin iron loading in the presence of phosphate. *J Inorg Biochem*. 2017;168:107-113. doi:10.1016/j.jinorgbio.2016.12.010
63. Steinberg TH. Protein Gel Staining Methods. An Introduction and Overview. In: *Methods in Enzymology*. Vol 463. 2nd ed. Elsevier Inc.; 2009:541-563. doi:10.1016/S0076-6879(09)63031-7
64. Arote RB, Jere D, Jiang H-L, et al. Injectable polymeric carriers for gene delivery systems. In: Vernon BBT-IB, ed. *Woodhead Publishing Series in Biomaterials*. Woodhead Publishing; 2011:235-259. doi:https://doi.org/10.1533/9780857091376.2.235
65. Gustavsson P-E, Son P-O. Monolithic Polysaccharide Materials. In: Švec F, Tennikova TB, Deyl ZBT-J of CL, eds. *Monolithic Materials*. Vol 67. Elsevier; 2003:121-141. doi:https://doi.org/10.1016/S0301-4770(03)80022-2
66. Stringer R. ELECTROPHORESIS | Overview. In: Worsfold P, Townshend A, Poole CBT-E of AS (Second E, eds. *Encyclopedia of Analytical Science*. 2nd ed. Oxford: Elsevier; 2005:356-363. doi:https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00120-5
67. Arndt T. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: A critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clin Chem*. 2001;47(1):13-27. doi:10.1093/clinchem/47.1.13

68. Biosciences A. PhastSystem, PhastGel media, and accessories. [http://promix.ru/manuf/ge/electrophoresis/b\\_prib/Phast\\_System.pdf](http://promix.ru/manuf/ge/electrophoresis/b_prib/Phast_System.pdf). Published 2004. Accessed July 23, 2020.
69. UV Epi-illumination versus transillumination Which type should I use? *Syngene*. 2010. [http://www.alphametrix.de/downloads/\\_05\\_ Epi-illumination vs transillumination.pdf](http://www.alphametrix.de/downloads/_05_ Epi-illumination vs transillumination.pdf). Accessed September 20, 2020.
70. Moldoveanu SC, David V. Basic Information about HPLC. In: *Essentials in Modern HPLC Separations*. ; 2013:1-51. doi:10.1016/B978-0-12-385013-3.00001-X
71. Healthcare G. *Ion Exchange Chromatography - Principles and Methods*.; 2016.
72. Csapó J, Albert C, Lóki K, Csapóné Kiss Z. Separation and determination of the amino acids by ion exchange column chromatography applying postcolumn derivatization. 2008;1:5-29.
73. IVD instruction for use English - Amino Acid Analysis. *Biochrom*. 2016:1-24.
74. Miyoshi Y, Oyama T, Koga R, Hamase K. Amino Acid and Bioamine Separations. In: *Liquid Chromatography*. Elsevier Inc.; 2013:131-147. doi:10.1016/B978-0-12-415806-1.00006-1
75. Proteínas, péptidos y aminoácidos. [http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/farmacognosia/wp-content/uploads/2017/03/TP3-\\_PROTEÍNAS-PEP-AA-2017.pdf](http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/farmacognosia/wp-content/uploads/2017/03/TP3-_PROTEÍNAS-PEP-AA-2017.pdf). Accessed September 10, 2020.
76. Rigas PG. Review: Liquid chromatography post-column derivatization for amino acid analysis: Strategies, instrumentation, and applications. *Instrum Sci Technol*. 2012;40(2-3):161-193. doi:10.1080/10739149.2011.651669
77. Wages JM. Polymerase chain reaction. In: Worsfold P, Alan Townshend, Poole C, eds. *Encyclopedia of Analytical Science*. 2nd ed. Elsevier; 2005:243-250. doi:https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00475-1
78. Caetano-Anollés D. Polymerase Chain Reaction. *Brenner's Encycl Genet*. 2013;5:392-395. doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.01186-4
79. Drabik A, Bodzo A, Silberring J. Gel electrophoresis. In: Ciborowski P, Silberring J, eds. *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry*. 2nd ed. Elsevier; 2016:115-143. doi:10.1016/B978-0-444-63688-1.00007-0
80. Bhatia S, Dahiya R. Concepts and Techniques of Plant Tissue Culture Science. In: Bhatia A, Sharma K, Dahiya R, Tanmoy Bera, eds. *Modern Applications of Plant Biotechnology in*

- Pharmaceutical Sciences*. Elsevier Inc.; 2015:121-156. doi:10.1016/B978-0-12-802221-4/00004-2
81. Hagemann IS. Overview of Technical Aspects and Chemistries of Next-Generation Sequencing. In: Kulkarni S, Pfeifer J, eds. *Clinical Genomics*. Elsevier Inc.; 2015:3-19. doi:10.1016/B978-0-12-404748-8.00001-0
  82. Gomes A, Korf BR. Genetic Testing Techniques. *Pediatr Cancer Genet*. 2018:47-64. doi:10.1016/B978-0-323-48555-5.00005-3
  83. Solomon DA. Integrating Molecular Diagnostics With Surgical Neuropathology. In: Perry A, Brat DJ, eds. *Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach*. 2nd ed. Elsevier; 2018:71-89. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44941-0.00005-9.
  84. GelRed Concentrado. Uniscience. <http://uniscience.com.br/produto/gelred-biotium-concentrado/>. Accessed September 21, 2020.
  85. ExoSAP-IT®†. USB Corporation. <http://www.affymetrix.com/support/technical/usb/proto/78200a.pdf>. Accessed September 21, 2020.
  86. ClinVar. [VCV000129147.2]. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/129147/>. Accessed December 21, 2020.