

## Bolsa de Investigação (BI) – Plano de Trabalho

O objetivo do projeto centra-se na utilização de perfis metabólicos diversos, biomarcadores patognomónicos e metabolitos intermediários, na identificação do possível bloqueio da(s) via(s) metabólica(s) e sua associação com a patologia subjacente. Assim, analisar-se-á a interligação dos perfis metabólicos com a função celular, bem como o seu papel na avaliação da eficácia do tratamento nutricional e farmacológico instituído. Estes estudos serão estendidos à avaliação da eficácia de pequenas moléculas na modulação da atividade da enzima deficitária quer em modelos celulares quer em doentes.

A execução do projeto envolverá o desenvolvimento de metodologias cromatográficas de ponta por LC-MS-MS, GC-MS-SIM e HPLC- UV- diodes em série e /ou fluorimetria e, ainda, a participação no programa de controlo de qualidade internacional a que os estudos metabólicos estão sujeitos.

### Plano de Trabalho

O bolseiro será integrado no projeto “Perfis Metabólicos no Diagnóstico dos Erros Hereditários do Metabolismo”, com o seguinte plano de trabalhos:

1. Análise de perfis metabólicos:  
Análise qualitativa usando as características cromatográficas e os espectros de massa referentes aos compostos a serem analisados e análise quantitativa usando padrões puros e padrões marcados para análise em modo SIM.  
Análise de grupo de compostos e/ou metabolitos específicos:
  - a) Aminoácidos por cromatografia em fase gasosa (GC) de alta resolução após extração em fase sólida (SPE) e posterior formação dos respetivos derivados.
  - b) Aminoácidos, nomeadamente os dibásicos, por cromatografia líquida-líquida de alta resolução (HPLC) após derivação com OPA e análise por fluorimetria.
  - c) Ácidos Orgânicos, por cromatografia em fase gasosa - espectrometria de massa (GC\_MS e GC\_MS\_SIM), após extração líquido-líquido e formação de derivados - TMS.
  - d) Ácidos gordos de cadeia muito longa (C22:0; C24:0 e C26:0), ácido fitânico e pristânico, por cromatografia em fase gasosa - espectrometria de massa em modo SIM (GC\_MS\_SIM).
2. Interpretação de perfis metabólicos tendo como referencial os biomarcadores das aminoacidopatias, acidúrias orgânicas e doença do peroxissoma. Participação no programa de controlo de qualidade Internacional – Diagnostic Proficiency Testing (DPT), ERNDIM - no qual o laboratório participa.
3. Análise de amostras biológicas provenientes de doentes com suspeita de doença metabólica e/ ou para controlo da eficácia da terapêutica instituída.
4. Implementação do diagnóstico diferencial dos défices do metabolismo da galactose \_ GALK (galactose cinase) , GALT (galactose-1-fosfato uridilil transferase) e GALE (galactose epimerase) - em gota seca de sangue (DBS - Dried Blood Spot) o que implica o desenvolvimento de métodos enzimáticos, usando substratos marcados, e análise do produto da reação por GC\_MS\_SIM. Análise dos biomarcadores – galactose-1-fosfato,

galactitol e galactonato, por GC\_MS\_SIM, em eritrócitos (*RBC* - red blood cells -) e outros fluidos biológicos.

5. Participação no desenvolvimento de metodologia por LC\_MS\_MS para análise de acilcarnitinas em *DBS*, no diagnóstico diferencial dos defeitos da beta-oxidação mitocondrial e de alterações específicas no metabolismo dos aminoácidos ramificados. Aprendizagem de utilização de software específico - MaxLink - usado na análise qualitativa (*precursor ion scan* e *multiple reactions monitoring* - MRM\_).