



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Matheus de Souza Watanabe**

**ANÁLISE DE OLIGOSSACARÍDEOS O- LIGADOS ISOLADOS DE SANGUE  
PERIFÉRICO DE PACIENTES COM DISTÚRBIOS CONGÊNITOS DE  
GLICOSILAÇÃO (CDG)**

**MONOGRAFIA DE GRADUAÇÃO**

**Brasília - DF  
2º/2018**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Matheus de Souza Watanabe**

**ANÁLISE DE OLIGOSSACARÍDEOS O- LIGADOS ISOLADOS DE SANGUE  
PERIFÉRICO DE PACIENTES COM DISTÚRBIOS CONGÊNITOS DE  
GLICOSILAÇÃO (CDG)**

Trabalho de Conclusão de Curso em Química apresentada ao Instituto de Química da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de bacharelado em Química.

**Orientador: Guilherme Dotto Brand**

**Co-orientador: Eder Alves Barbosa**

**Brasília - DF**

**2º/2018**

## SUMÁRIO

<b><u>Introdução</u></b> .....	4
<b><u>Objetivos</u></b> .....	8
<b><u>Revisão bibliográfica</u></b> .....	9
<b><u>Metodologia</u></b> .....	27
<b><u>Resultado e discussão</u></b> .....	32
<b><u>Considerações finais</u></b> .....	48
<b><u>Anexos</u></b> .....	49
<b><u>Referências</u></b> .....	55

## INTRODUÇÃO

Há, nos seres vivos, uma série de compostos que possuem funções determinantes para sua sobrevivência. Esses compostos estão divididos em quatro grandes classes de macromoléculas, nas quais estão os lipídios, as proteínas, os ácidos nucleicos e os carboidratos (DWEK, 1996).

Os carboidratos possuem grande diversidade devido a alta capacidade dos seus monômeros (monossacarídeos) em realizarem diferentes tipos de ligações e por conseguirem formar cadeias altamente ramificadas, dando origem a uma grande possibilidade de estruturas. Eles ainda podem aparecer ligados a outros compostos no meio celular, como lipídeos e proteínas, formando glicolipídeos e glicoproteínas, respectivamente, e esses são componentes encontrados em quantidade na superfície de células de mamíferos (DWEK, 1996; VARKI et al, 2009).

As glicoproteínas são carboidratos ligados a proteínas e são de extrema importância para a manutenção de processos biológicos fundamentais, como por exemplo, fertilização, regulação de processos imunes, replicação viral, infecção parasítica, crescimento celular, adesão célula-célula, degradação de coágulos de sangue e inflamações (SCOTT et al, 2014).

O processo biológico de síntese de glicoproteínas é feito a partir da adição de açúcares a alguns resíduos de aminoácidos específicos na cadeia polipeptídica (NILSSON, 1994). A ligação é feita entre um aminoácido e um carboidrato, sendo que há, essencialmente, apenas três aminoácidos que podem receber esses carboidratos. São eles asparagina (Asn), serina (Ser) e treonina (Thr) (MORELLE et al, 2006).

Há uma sequência mínima de aminoácidos ligados a asparagina para que seja formada uma ligação covalente com um carboidrato, que é a asparagina seguida por qualquer resíduo de aminoácido, exceto prolina, e finalizada por serina ou treonina. O nitrogênio da função carboxiamida do aminoácido é utilizada para fazer uma ligação N-glicosídica com o carboidrato, envolvendo um monômero N-acetilglicosamina (GlcNAc) (VARKI et al, 2009). Na Figura 1A, a estrutura de um N-glicano constituído pelo motivo comum Man3GalNAc2Asn está representada, o qual possui resíduos de manose adicionais. Este motivo comum é uma estrutura compartilhada por todos os N-glicanos, chamada estrutura core (VARKI et al, 2009).

Já para os aminoácidos serina e treonina ocorre a formação de uma ligação O-glicosídica e, por esse motivo, o oligossacarídeo é chamado de O-glicano. Esse processo é comum em glicoproteínas de mamíferos (MORELLE et al, 2006). As mucinas são tipos específicos de glicoproteínas O-ligadas para as quais ocorre a formação de uma ligação covalente alfa entre a N-acetilgalactosamina (GalNAc) do oligossacarídeo e o grupo funcional hidroxila (-OH) da serina ou da treonina. Outra denominação para esses compostos é O-GalNAc glicanos. A Figura 1B traz a representação da estrutura de um O-glicano, que é formado pelo motivo comum GalGalNAcSer/Thr (core 1), uma das estruturas core mais abundantes nos seres humanos, adicionado de outros resíduos de monossacarídeos (VARKI et al, 2009).

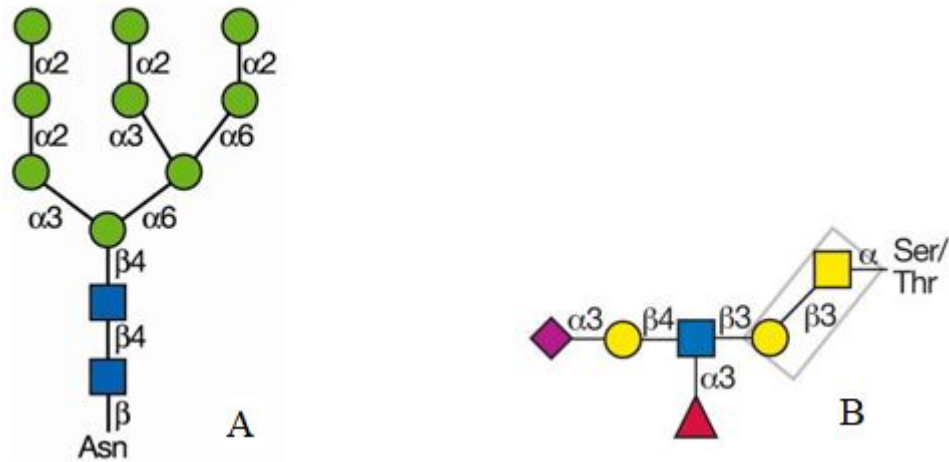


Figura 1. A) Representação estrutural de um N-glicano; B) Representação estrutural de um O-glicano. Os símbolos  $\alpha$  e  $\beta$  se referem a estereoquímica do monossacarídeo em relação a ligação glicosídica e os números ao lado definem qual o carbono do ciclo está fazendo a ligação glicosídica. Legenda: ■ *N*-acetilglicosamina (GlcNAc), ● Manose (Man), ● Galactose (Gal), ▲ Fucose (Fuc), ◆ Ácido siálico (NeuAc), ■ *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) (Figura adaptada de VARKI et al, 2009).

Atualmente, já foram descobertos em torno de 100 alterações genéticas humanas relacionadas a genes que regulam os processos de glicosilação. Em 2013, a cada 17 dias um novo tipo de desregulação nos processos de glicosilação foi reportado (FREEZE et al, 2014). Para diversas doenças genéticas e crônicas, como por exemplo, Alzheimer, desregulação de metabolismo, inflamações, diabetes e câncer, foram encontradas intensas alterações nos processos de glicosilação (VAN SCHERPENZEEL et al, 2016). Abaixo é apresentado um panorama geral das descobertas de transtornos relacionados a defeitos de glicosilação nos últimos anos (Figura 2). Isso indica uma forte tendência no estudo dessas doenças, possibilitada pelos avanços nos métodos de análise e conhecimento da diversidade estrutural dos compostos relacionados.

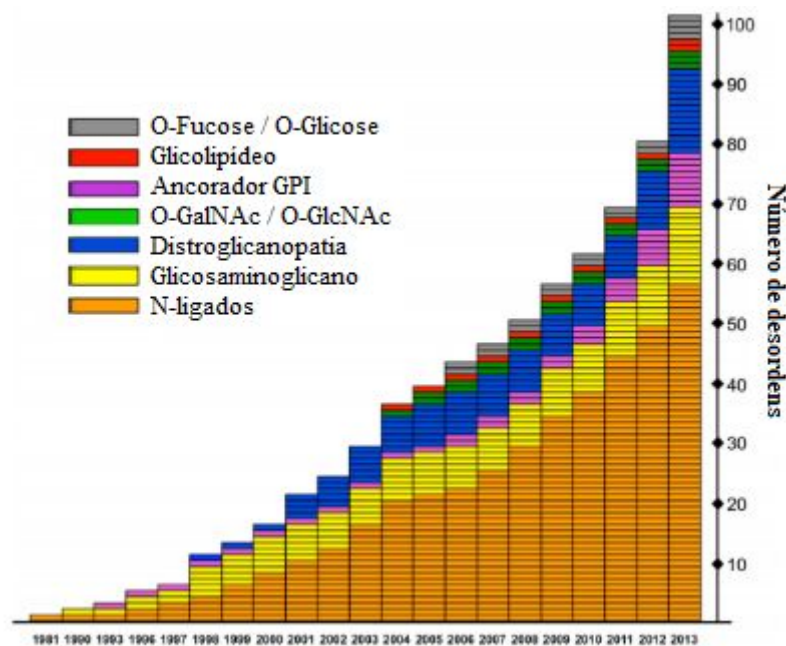


Figura 2: Descobertas de novas doenças relacionadas a defeitos nos processos de glicosilação entre os anos 1981 e 2013. Cada cor representa um tipo de estrutura que teve seu processo afetado (FREEZE et al, 2014).

Um dos grupos de doenças que apresentam padrões alterados é conhecido como distúrbios congênitos de glicosilação (CDG - Congenital Disorders of Glycosylation) (JAEKEN et al, 2010). Essas desordens são causadas por defeitos no processo de glicosilação de proteínas e lipídeos, que podem ocorrer no citoplasma, retículo endoplasmático e no complexo de Golgi (BARONE et al, 2012; SCOTT et al, 2014). Em 2010, havia sido reportado que a maioria dos distúrbios de glicosilação ocorrem devido a defeitos na via sintética de N-glicosilação (16 doenças). O restante das doenças apresenta defeitos nas vias de O-glicosilação, em um total de oito, enquanto 17 doenças apresentavam defeitos tanto nas vias sintéticas para O- e N- glicosilação ou outras vias sintéticas (JAEKEN et al, 2010).

Além disso, indivíduos afetados por CDG apresentam uma gama de sintomas e expressões fenotípicas. Com o desenvolvimento da doença, quase todos os órgãos de um sistema são afetados. Entretanto, alguns são mais afetados por essas alterações, como por exemplo, o sistema nervoso, imune, gastrointestinal, hepático e, principalmente, o desenvolvimento normal do cérebro (FREEZE; AEBI, 2005).

Entretanto, há desafios tanto no diagnóstico como na descoberta de novos padrões associados a CDG. Um desses desafios é a análise do processo de glicosilação. Uma das formas encontradas para melhorar as análises é o acoplamento de métodos de separação com os de caracterização estrutural, como por exemplo, MS (Mass Spectrometry - Espectrometria de Massa) acoplado ao HPLC (High Performance Liquid Chromatography - Cromatografia líquida de alta eficiência). Essa combinação entre técnicas de separação e a espectrometria de massa permitem a utilização de uma ferramenta poderosa e versátil de análise estrutural de glicoconjugados (MORELLE; CANIS; CHIRAT et al, 2006).

A análise e a caracterização estrutural desses compostos pode ser feita utilizando técnicas de MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight-Mass Spectrometry - Dessorção/Ionização a Laser Assistida por Matriz-Tempo de voo-Espectrometria de Massa) e ESI-MS (Electrospray Ionization-Mass Spectrometry - Ionização por Electrospray-Espectrometria de Massa). Nesses métodos de análise, as glicofornas de glicoproteínas intactas podem ser descobertas, desde que, sejam proteínas com baixa massa, entre 20-40 kDa, e o número de cadeias de glicanos seja limitado (MORELLE; CANIS; CHIRAT et al, 2006).

Assim, a espectrometria de massa tem sido utilizada para a análise desses compostos, conforme relatos na literatura (SCOTT et al, 2014; VAN SCHERPENZEEL et al, 2016; WADA, 2006; FONTES, 2016). Com essas pesquisas, tem sido possível correlacionar os glicanos detectados com os genes acometidos (WADA, 2006). Ainda é possível utilizar a análise para o diagnóstico de CDG em laboratórios clínicos, devido a sensibilidade do método, a capacidade de caracterização estrutural dos compostos nas análises e sua compatibilidade com matrizes biológicas (VAN SCHERPENZEEL et al, 2016).

O laboratório de síntese e análise de biomoléculas do Instituto de Química da Universidade de Brasília (LSAB - UnB) tem trabalhado em parceria com a área de Patologia Molecular do Hospital Sarah, chefiada pelo Dr Jaime Moritz Brum, com o objetivo de caracterizar N-glicanos de pacientes com quadro clínico e bioquímico compatível com CDG. Embora os N-glicanos de pacientes com CDG II já tenham sido explorados (BARBOSA et al, 2019), resta ainda o estudo dos O-glicanos. A análise desses compostos combinada aos N-glicanos tem o potencial de ser uma ferramenta de diagnóstico e de caracterização dessas patologias além de fornecer base para o estudo dos defeitos genéticos relacionados.

## OBJETIVOS

O presente projeto é uma continuação do trabalho feito no Laboratório de Síntese e Análise de Biomoléculas da Universidade de Brasília em parceria com a Rede de Hospitais Sarah. A análise dos N-glicanos presentes no sangue de pacientes com distúrbios congênitos de glicosilação (CDG) (BARBOSA et al, 2019) já foi realizada e, para dar maior detalhamento acerca dos padrões de glicosilação dessas doenças, serão feitas as análises dos O-glicanos. Dessa forma, espera-se encontrar novas estruturas e padrões condizentes com a literatura para se ter uma base para o diagnóstico dessas doenças, por meio, de uma análise mista de N- e O-glicanos.

Para alcançar tal objetivo, será necessária uma análise qualitativa e quantitativa desses compostos presentes nas amostras. Dessa maneira, serão realizados o desenvolvimento e aprimoramento dos métodos de extração, purificação e análise dos O-glicanos por espectrometria de massa. Considerando isso, o trabalho tem seus objetivos específicos apresentados a seguir:

- Extrair e identificar O-glicanos presentes no sangue periférico de pacientes com provável diagnóstico de CDG do tipo II;
- Buscar O-glicanos já reportados na literatura;
- Comparar, estruturalmente, os O-glicanos presentes em pacientes saudáveis e doentes;
- Utilizar uma abordagem de quantificação relativa para a identificação de padrões alterados nas concentrações dos O-glicanos;
- Aprimorar as técnicas de extração, purificação e análise;



# REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## Carboidratos

Diversos processos biológicos, até a composição de células, tecidos e órgãos, podem ser entendidos caracterizando-se as biomoléculas que os compõem. Biomoléculas como lipídeos e carboidratos apresentam funções de grande importância para o funcionamento correto de organismos, como por exemplo, na composição estrutural, em processos celulares como a comunicação célula-célula e formação de intermediários fontes de energia para outros processos (VARKI et al, 2009).

Os carboidratos são compostos polihidroxilados que apresentam grupos carbonil aldeído ou cetona, com fórmula geral  $C_x(H_2O)_n$ , porém com possibilidade de átomos como nitrogênio, fósforo e enxofre em suas composições. Os carboidratos apresentam alta densidade de informações biológicas (LAN et al, 2016) e possuem funções importantes e diversas, dentre as quais estão o crescimento, o desenvolvimento e o correto funcionamento de organismos (VARKI et al, 2009). Em relação ao tamanho, existem três classes principais: os monossacarídeos, os oligossacarídeos e os polissacarídeos (NELSON et al, 2013; VARKI et al, 2009).

Monossacarídeos são as unidades fundamentais dos carboidratos. Sua cadeia principal é composta por cadeia carbônica não-ramificada e saturada, onde há a presença de uma carbonila (C=O), que pode estar ligada a carbonos terminais, formando aldoses ou, em outra posição, formando cetoses, sendo todos os outros carbonos ligados a hidroxilas (-OH) (NELSON et al, 2013).

A partir de 4 carbonos na cadeia principal, essas moléculas tendem a apresentar, em meio aquoso, um equilíbrio entre estruturas cíclicas e lineares. Esse processo se dá por meio de uma ciclização intramolecular formando um grupo hemiacetal ou hemicetal. A carbonila do grupo aldeído ou cetona forma uma ligação covalente com o oxigênio de um grupo hidroxila, resultando em uma estrutura que apresenta um carbono assimétrico adicional, possibilitando a formação de dois estereoisômeros. (NELSON et al, 2013) Abaixo, na Figura 3, a reação de ciclização do monossacarídeo D-glicose está representada.

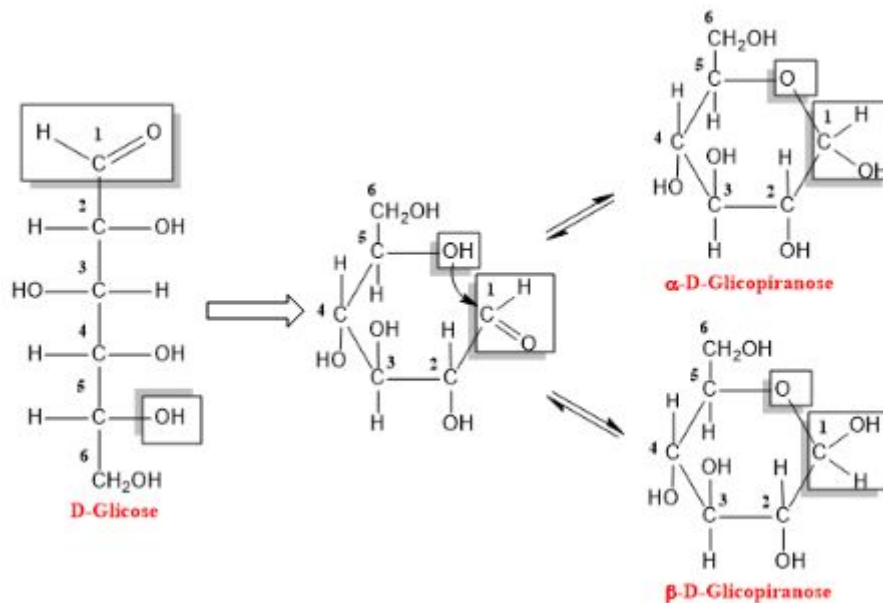


Figura 3 - Representação da reação de ciclização intramolecular do açúcar D-glicose. Como pode ser visto, há a formação de dois isômeros que podem se interconverter, devido ao equilíbrio existente entre álcool e o hemiacetal em meio aquoso (NELSON et al, 2013).

Como é apresentado na Figura 3, a hidroxila do carbono 5 da D-glicose reage com o aldeído (carbono 1), formando dois estereoisômeros. Os anéis de 6 membros formados são chamados de piranoses. As formas isoméricas dos monossacarídeos que diferem na configuração do grupo hemiacetal são chamadas de anomeros (NELSON et al, 2013).

Os oligossacarídeos ou glicanos são compostos formados por monossacarídeos (entre 2-20 monômeros) ligados covalentemente entre si, por meio de ligação glicosídica, formando blocos (NELSON et al, 2013; VARKI et al, 2009). A síntese química desses compostos pode ser feita tanto por rotas sintéticas enzimáticas ou químicas. A principal diferença entre esses dois tipos de reações reside na flexibilidade que a rota sintética química permite. Já as rotas enzimáticas permitem a formação de ligações com a estereoquímica determinada. As principais enzimas envolvidas nesse processo são as glicosiltransferases e as glicosidases. Abaixo há a representação da rota sintética enzimática. (VARKI et al, 2009)

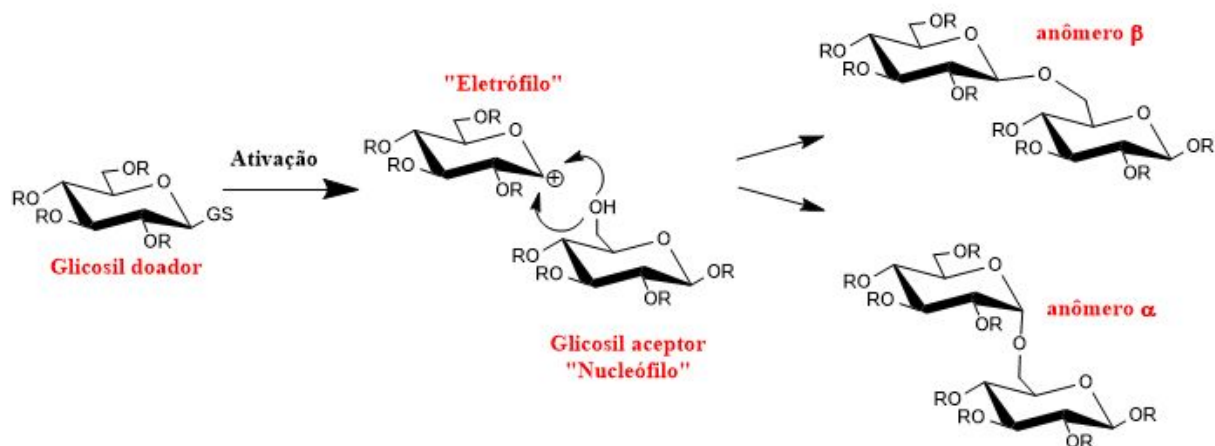


Figura 4: Formação da ligação glicosídica entre dois monossacarídeos hipotéticos. É mostrada a síntese dos dois anômeros  $\alpha$  e  $\beta$ , onde, o  $\alpha$  é formado pelo ataque do monossacarídeo a face inferior de outro e o  $\beta$  é formado pelo ataque a face superior (VARKI et al, 2009).

A diversidade estrutural de oligossacarídeos é imensa devido à possibilidade de combinações entre os carbonos de cada monossacarídeo (ligações entre os carbonos C1-C3, C1-C4, etc) e a modificação de grupos hidroxila feita por fosfatos, sulfatos e acetil ésteres. Essa diversidade estrutural e de funções, e as correlações entre elas, têm sido entendidas com o passar do tempo pela utilização de compostos sintéticos que os imitam (VARKI et al, 2009; BERTOZZI; KIESSLING, 2001).

Oligossacarídeos são componentes relevantes de glicoproteínas, as quais, por estarem presentes nas superfícies celulares e em secreções, fazem com que esses compostos desempenhem funções importantes na modulação e na mediação de eventos celulares, relacionados com interações célula-célula e célula-meio, que estão intimamente relacionadas com o desenvolvimento e funções específicas celulares e de tecidos. Eles podem ainda agir como mediadores em processos parasitários e simbióticos (FONTES, 2016; VARKI et al, 2009).

As glicoproteínas apresentam, em sua estrutura, glicanos ligados a determinados resíduos de aminoácidos. Os O-glicanos são formados por ligações glicosídicas do tipo O-, ligados a uma serina ou treonina. Os N-glicanos são formados também por ligação glicosídica, mas ao resíduo de aminoácido asparagina. As principais diferenças entre O- e N-glicanos estão na complexidade estrutural e nas rotas sintéticas. Normalmente, as estruturas dos O-glicanos são menos complexas e menores, se comparadas com os N-glicanos (VARKI et al, 2009).

Os O-glicanos são usualmente formados a partir da *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) onde posteriormente podem ser adicionados grupos, como por exemplo, galactose, fucose, *N*-acetilglicosamina, ácidos siálicos, entre outros, para formar uma diversidade imensa de variações estruturais (MORELLE; MICHALSKY, 2007). Abaixo estão representadas as estruturas principais estendidas de O-glicanos encontradas em seres humanos (Figura 5), nas

quais as estruturas destacadas por retângulo chamadas de core são estruturas precursoras. Na Figura 6 estão representadas a D-galactose, a *N*-acetilglicosamina, a D-Fucose, a *N*-acetilgalactosamina e o ácido *N*-acetilneuramínico. Na seção Anexos estão apresentadas as associações entre os símbolos e cada monossacarídeo que foram criados para simplificar e unificar a representação estrutural desses compostos.

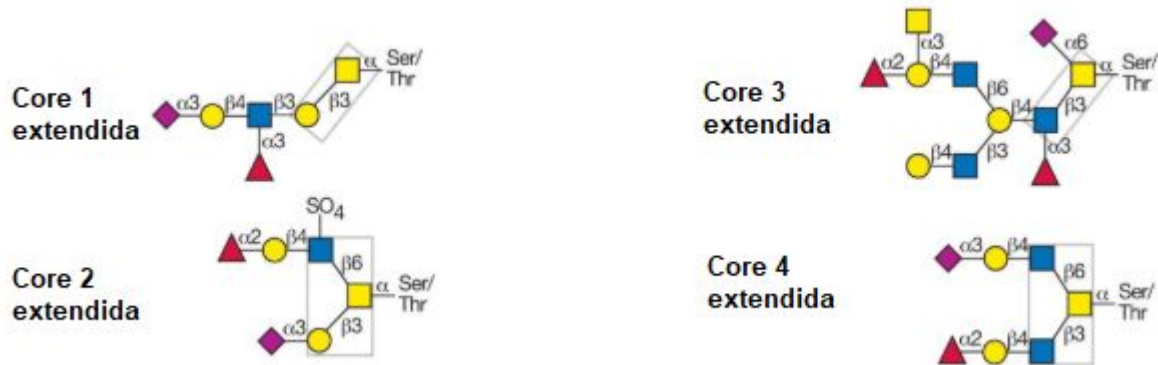


Figura 5: Representação da estrutura de O-glicanos mais comumente encontradas em humanos, sendo estes formados a partir da estrutura precursora, antígeno Tn (*N*-acetilgalactosamina ligada a sequência de aminoácidos Ser/Thr). São chamadas de “core” por serem as estruturas essenciais que dão origem a outras maiores. Ainda,  $\alpha$ ,  $\beta$  e os números se referem a diversidade estrutural dessas estruturas. Sendo as letras associadas aos isômeros e os números a posição da ligação entre os monossacarídeos (VARKI et al, 2009). Legenda: ■ *N*-acetilglicosamina (GlcNAc), ● Manose (Man), ● Galactose (Gal), ▲ Fucose (Fuc), ◆ Ácido siálico (NeuAc), ■ *N*-acetilgalactosamina (GalNAc).

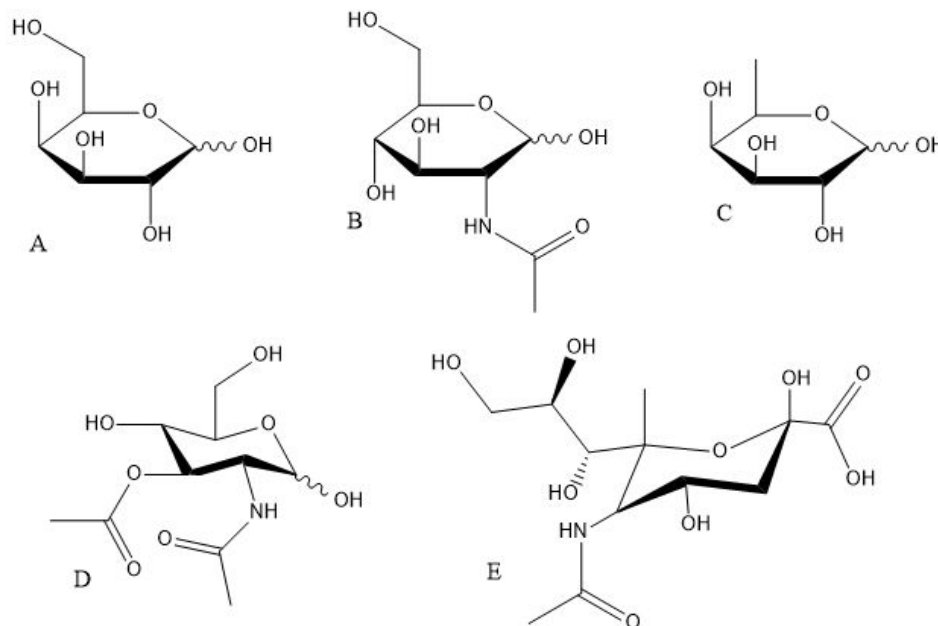


Figura 6. Representação da estrutura de diferentes monossacarídeos: A) D-galactose; B) *N*-acetilglicosamina; C) D-Fucose; D) *N*-acetilgalactosamina e E) ácido *N*-acetilneuramínico.

As estruturas “core” estão presentes em diversas glicoproteínas encontradas no corpo humano. Essas glicoproteínas O-glicosiladas são denominadas de mucinas e estão presentes em secreções de mucosas e na superfície de membranas celulares. Mucinas com a presença das estruturas core 1 e 2 são muito comuns, sendo encontradas em diversos tecidos e células. Glicoproteínas com a presença de core 3 e 4 estão presentes em secreções de alguns tecidos, como por exemplo, tecido de cólon e de glândulas salivares (VARKI et al, 2009).

### **Rotas biossintéticas de O-glicanos do tipo mucinas**

O conhecimento das vias biossintéticas dos glicanos permite associar a incidência destas moléculas em tecidos à ausência ou presença de determinadas enzimas. O processo de formação de mucinas se inicia pela adição do grupo O-GalNAc ao resíduo de Ser ou Thr da glicoproteína, com a utilização de UDP-GalNAc para a transferência do açúcar e a enzima Polipeptídeo *N*-acetilgalactosaminatransferase (ppGalNacT) para catalisar a reação, formando a estrutura chamada de antígeno Tn. Com a posterior adição de galactose por meio da Core 1  $\beta$ 1-3 galactosiltransferase (C1GalT-1), ocorre a formação do core 1 ou antígeno T. A partir disso, pode ser feita a ramificação dessa estrutura, formando a estrutura core 2 por intermédio da enzima  $\beta$ 1-6 *N*-acetilglicosaminatransferase (C2GnT) (VARKI et al, 2009).

Ainda, a partir da estrutura antígeno Tn, a síntese das estruturas core 3 e 4 pode ser realizada a partir da reação catalisada pela enzima  $\beta$ 1-3 *N*-acetilglicosaminatransferase (C3GnT; Tabela 1), a adição de uma GlcNAc ao antígeno Tn forma o core 3. Posteriormente, outra adição de uma GlcNAc pode ser realizada, por meio da enzima  $\beta$ 1-6 *N*-acetilglicosaminatransferase (C2GnT-2, Tabela 1), formando uma estrutura ramificada chamada de core 4 (VARKI et al, 2009).

Abaixo é apresentada uma tabela com as enzimas utilizadas no processo de adição de diversos açúcares na formação das mucinas. Também são apresentadas duas figuras (Figuras 7 e 8) que demonstram esquematicamente as rotas sintéticas de algumas estruturas de oligossacarídeos, sintetizados a partir das estruturas primárias core 1, 2, 3 e 4.

Tabela 1: Glicosiltransferases envolvidas nos processos de síntese das mucinas. (VARKI et al, 2009)

<b>Enzima</b>	<b>Abreviação</b>
Polipeptídeo <i>N</i> -acetilgalactosaminatransferase	ppGalNacT-1 a -24
Core 1 $\beta$ 1-3 galactosiltransferase	C1GalT-1 ou T sintase
Core 2 $\beta$ 1-6 <i>N</i> -acetilglicosaminatransferase	C2GnT-1, C2GnT-3
Core 3 $\beta$ 1-3 <i>N</i> -acetilglicosaminatransferase	C3GnT-1

Core 2/4 $\beta$ 1-6 <i>N</i> -acetilglicosaminatransferase	C2GnT-2
Elongação $\beta$ 1-3 <i>N</i> -acetilglicosaminatransferase	elongação $\beta$ 3GnT-1 a -8
Core 1 $\alpha$ 2-3 sialiltransferase	ST3Gal I, ST3Gal IV
$\alpha$ 2-6 sialiltransferase	ST6GalNAc I, II, III ou IV
Core 1 3-O-sulfotransferase	Gal3ST4
Gene Secretor $\alpha$ 1-2 fucosiltransferase	FucT-I, FucT-II

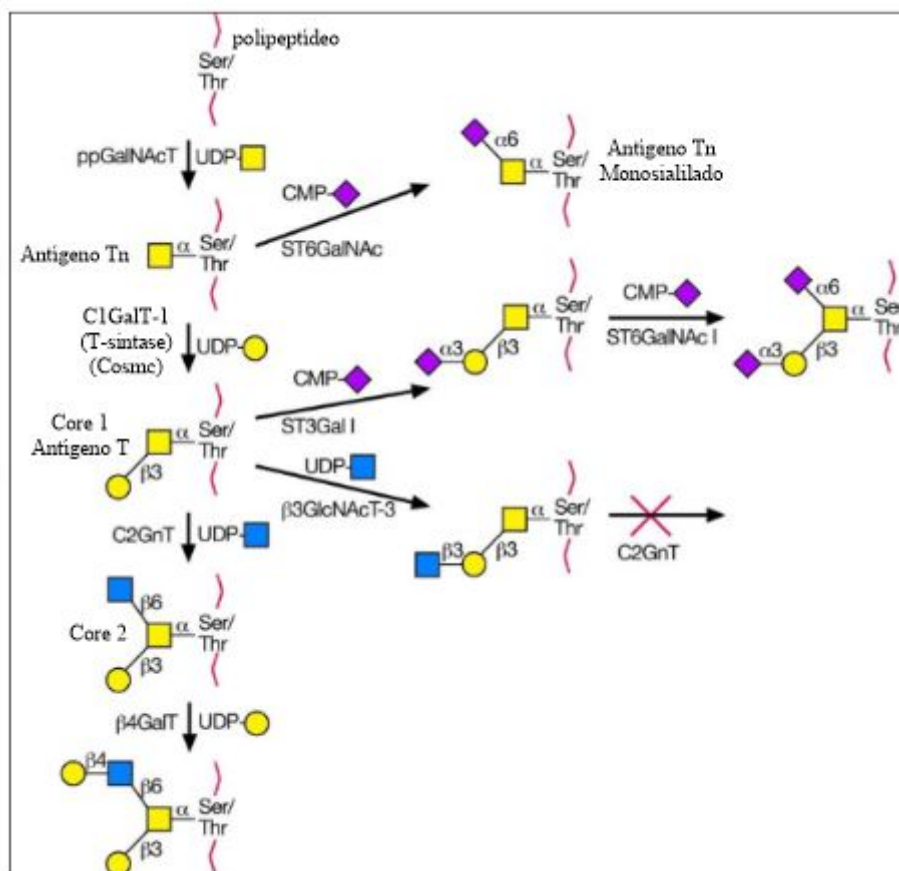


Figura 7: Biossíntese das estruturas core 1 e 2 e suas rotas biossintéticas para extensão das estruturas. As enzimas utilizadas em cada etapa e o nucleotídeo fosfatado que serve para formar um bom grupo de saída no monossacarídeo estão indicadas em cada etapa (VARKI et al, 2009). Legenda: ■ *N*-acetilglicosamina (GlcNAc), ● Galactose (Gal), ◆ Ácido siálico (NeuAc), ■ *N*-acetilgalactosamina (GalNAc).

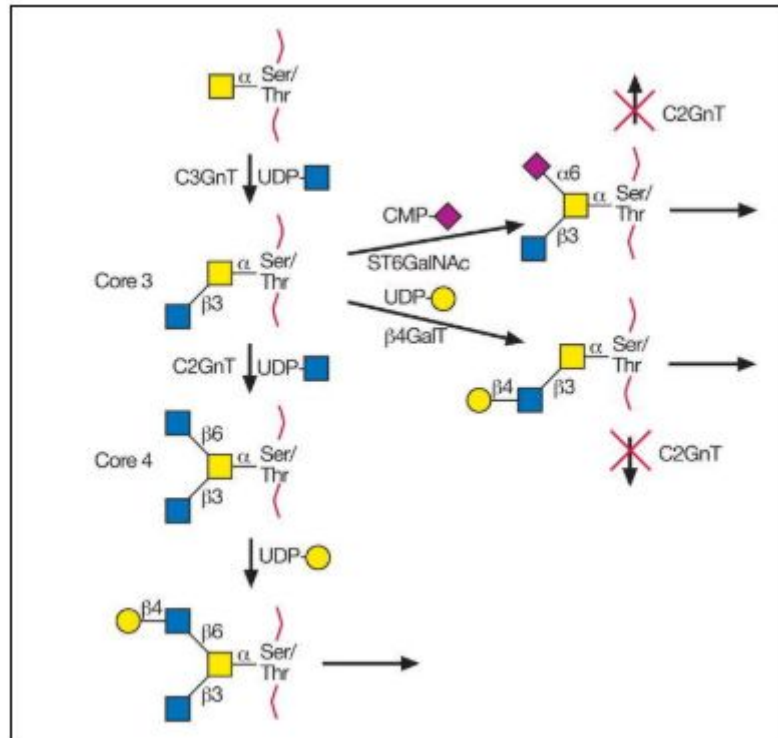


Figura 8: Biossíntese das estruturas core 3 e 4 e suas rotas biossintéticas para extensão das estruturas (VARKI et al, 2009). Legenda: ■ *N*-acetilglicosamina (GlcNAc), ● Galactose (Gal), ◆ Ácido siálico (NeuAc), □ *N*-acetilgalactosamina (GalNAc).

Como apresentado, várias enzimas competem pelo mesmo substrato ao longo do processo de glicosilação, mas não somente isso, a adição de determinados açúcares pode impedir que estruturas estendidas possam ser formadas. Na Figura 7, a adição antecipada de ácido siálico a estrutura antígeno Tn ou T, impede a continuação da síntese de estruturas maiores. Na estrutura de core 1, se a GlcNAc for adicionada diretamente à galactose, sem a formação da estrutura ramificada, o processo de formação de core 2 é interrompido. Da mesma forma, para a estrutura de core 3, se for adicionado um ácido siálico, não é possível fazer a síntese da core 4. Na mesma medida que, se a extensão da estrutura de core 3 for feita antes da formação da ramificação que dá origem a core 4, o processo é interrompido (VARKI et al, 2009). Diversos processos biológicos como inflamações, leucemia (VARKI et al, 2009), outros tipos de câncer (LAN et al, 2016), Alzheimer (SCHERPENZEEL et al, 2016) e várias doenças genéticas, dentre elas os distúrbios congênitos de glicosilação (CDG - Congenital disorders of glycosylation), apresentam padrões de O-glicosilação compatíveis com essas interrupções (JAEKEN et al, 2010).

### Distúrbios Congênitos de Glicosilação (CDG)

As síndromes glicoprotéicas de deficiência de carboidratos eram conhecidas por defeitos na síntese de N-glicanos. Atualmente, esses distúrbios são chamados de CDG e são definidos como tipos específicos de doenças que têm relação direta com erros nos processos

de glicosilação, sendo causados por defeitos em determinados genes (VARKI et al, 2009). Hoje, elas não são só associadas a erros encontrados na síntese de N-glicanos, mas também a quatro principais erros em processos biológicos, são eles: defeitos na síntese da ligação N- e O-glicosídica de carboidratos à peptídeos, erros diversos em vias sintéticas no processo de glicosilação, defeitos em etapas no processo de síntese de glicolipídeos e erros no processo de ancoragem glicosilfosfatidilinositol (GPI) de glicosilação (XIA et al, 2013).

Desde a primeira descoberta e o diagnóstico clínico, em 1980, a quantidade de novas doenças congênitas tem crescido consideravelmente. Foram descobertos, aproximadamente, 45 tipos até 2010 (JAEKEN et al, 2010). Até 2013, foram descritos 19 defeitos nos processos de N-glicosilação, 17 em O-glicosilação e 21 outras glicosilações, incluindo defeitos mistos de N- e O-glicanos (SCHERPENZEEL et al, 2016).

Dentre as formas de diagnosticar essas doenças, a análise dos sintomas clínicos apresentados pelos pacientes é empregada. Os seguintes sintomas estão associados a CDG: deficiência intelectual, convulsões, distrofia muscular, displasia do esqueleto, características dismórficas, retardo de crescimento, anormalidades hematológicas e endócrinas. Além desses sintomas também é citado por Y. WADA, 2006, e VARKI, 2009, que os CDG são doenças com uma diversidade de efeitos que afetam inúmeros órgãos e sistemas, alguns exemplos são o desenvolvimento cerebral, sistema gastrointestinal, hepático, visual, sistema imune, entre diversos outros.

Entretanto, essa alta variabilidade das expressões físicas dos CDG torna o diagnóstico correto delas um desafio. O primeiro paciente a ser diagnosticado com essa doença, em 1980, apresentava sintomas como desenvolvimento incompleto do cérebro, defeitos no processo de coagulação, problemas visuais, entre outros. Esses sintomas clínicos são apresentados por diversos distúrbios metabólicos, como as doenças mitocondriais (VARKI et al, 2009).

Uma forma de contornar esse problema é por meio da identificação de padrões anormais de glicosilação, utilizando técnicas como focalização isoelétrica (IEF - Isoelectric Focusing) de proteínas, cromatografia de troca iônica e espectrometria de massa (VARKI et al, 2009). São analisadas glicoproteínas-padrão com a presença de sialilação em estruturas primárias (sialilação da estrutura antígeno Tn ou antígeno T) no soro de pacientes. Dentre essas glicoproteínas, as transferrinas são analisadas para N-glicanos e as proteínas ApoCIII para os O-glicanos (VARKI et al, 2009).

Essas desordens são divididas em duas classes, os CDG tipo I e II. O CDG do tipo I é identificado pela falta de ácido siálico (pelo método de IEF, esse resíduo concede carga negativa à transferrina, permitindo a identificação de estruturas com ácido siálico), devido a defeitos em enzimas que catalisam o processo de ligação entre o açúcar e a proteína no motivo Asn-X-Ser/Thr. Já para o CDG do tipo II, os sítios de glicosilação da proteína referência estão ocupados, mas os glicanos acoplados apresentam alterações estruturais (ABU BAKAR et al, 2018). Em termos celulares, a tipo I trata de defeitos em processos de glicosilação que ocorrem no citoplasma e no retículo endoplasmático, já a tipo II está relacionado com erros nas etapas que ocorrem no complexo de Golgi (VARKI et al, 2009; SCOTT et al, 2014).



No artigo de SCOTT et al, 2014, são citadas estruturas de N- e O-glicanos que estão relacionadas com a expressão dessas doenças, que podem ser utilizadas como possíveis biomarcadores para diagnóstico.

No trabalho de ALBAHRI et al, 2006, um paciente foi acompanhado, sendo analisado o seu sangue. Foi percebido durante o tempo de duração do trabalho, alterações na glicosilação de N- e O- glicanos.

São citados por SCOTT et al, 2014, diversos erros, dentre os quais, problemas no transporte de carboidratos, defeitos na síntese de ligações entre compostos intermediários essenciais e os glicanos, síntese de moléculas usadas em processos no retículo endoplasmático ou no complexo de Golgi, sinalização, ligação de carboidratos a proteínas ou erros na secreção nas etapas.

No trabalho de WOPEREIS et al, 2003, o primeiro erro encontrado no processo de síntese da estrutura core 1 de mucinas de O-glicanos é descrito. Além disso, também foi associado a um tipo de CDG misto que afeta tanto as etapas de glicosilação de O- e N-glicanos, sendo o segundo tipo de CDG mista.

## **Espectrometria de Massa**

Uma das formas de se obter informações que podem ser utilizadas para diagnosticar pessoas acometidas por CDG é mediante a utilização da espectrometria de massa para a caracterização dos glicanos livres. Esse é um método utilizado para análise de uma variedade de compostos. Recentemente, esse tipo de análise ganhou grande importância, devido a sua capacidade de elucidação estrutural, que ajudou no entendimento da diversidade estrutural dos carboidratos, além de ser uma ferramenta sofisticada, precisa e rápida (LEBRILLA; ANN, 2009; GROSS, 2017).

Essa técnica parte de três pilares principais, sendo eles a ionização do analito, separação e detecção dos íons. Abaixo é apresentado um esquema dos principais aspectos que constituem a técnica de espectrometria de massa.

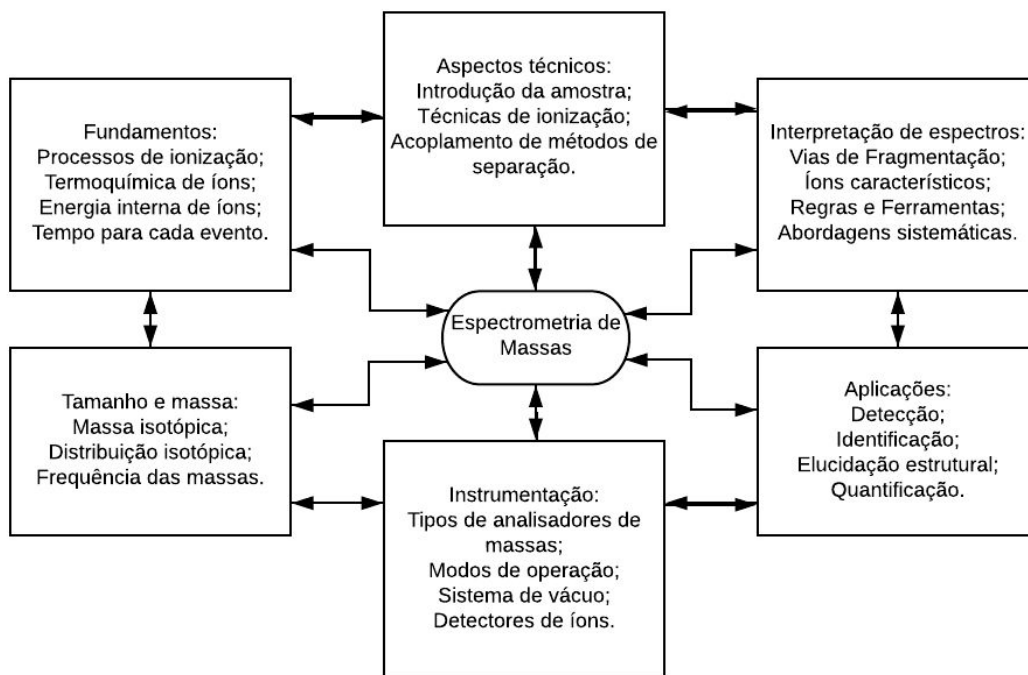


Figura 9: Os diversos aspectos da espectrometria de massa, fluxograma retirado do livro do J. H. GROSS, 2017. Nele, são mostrados os principais aspectos e ideias relacionados com o método de análise por espectrometria de massa.

De forma sucinta, o equipamento utilizado nessa técnica necessita da presença de uma fonte de íons, um analisador de massa e um detector. Existem diversos tipos de ionização para MS, dentre eles a ionização por impacto de elétrons, ionização química, campo de ionização, entre outros, sendo que as propriedades físico-químicas dos analitos são determinantes para o melhor tipo de ionização. Para os glicanos, os métodos que apresentam melhores resultados são o MALDI e o ESI (GROSS, 2017).

O método de MALDI não será aprofundado neste trabalho, pois a técnica utilizada será a de ionização por ESI. Esse método de ionização surgiu antes de outros conhecidos como API (Atmospheric Pressure Ionization), TSP (Thermospray) e EHI (Electrohydrodynamic Ionization). No ESI (Electrospray Ionization - Ionização por eletrospray), gotículas eletricamente carregadas de tamanho de micrômetros são produzidas. A formação dessas gotículas é feita em um tubo capilar que é submetido a uma diferença de potencial. Essas gotículas são então expandidas no vácuo em velocidade supersônica e são desintegradas durante o processo de evaporação de solvente, fazendo a densidade elétrica aumentar consideravelmente. Ocorrem processos repetidos de encolhimento e desintegração de gotículas, sendo o aerossol formado passado continuamente por um analisador de massas (GROSS, 2017). Abaixo na Figura 10, há a representação esquemática dos componentes encontrados.

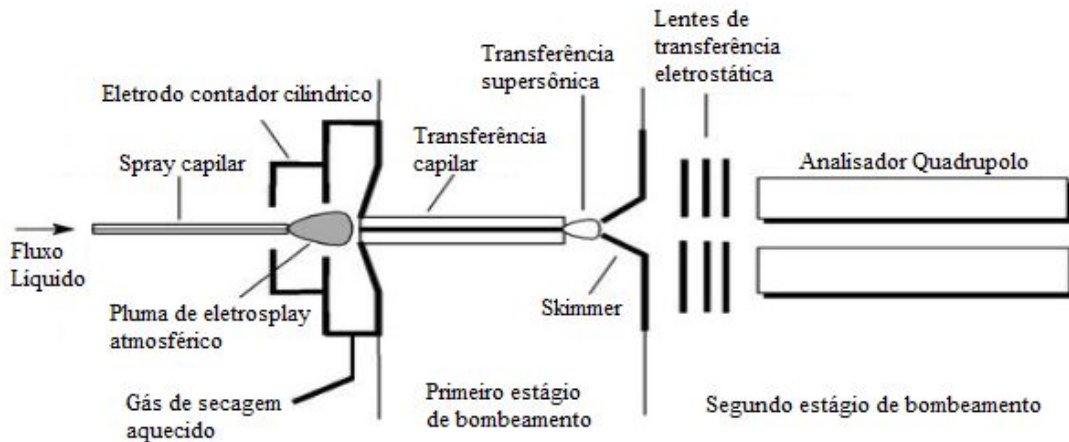


Figura 10: Representação esquemática dos equipamentos de um espectrômetro de massa que utiliza o processo de ESI para ionização. Figura retirada do livro do J. H. GROSS, 2017.

O processo de formação do spray é complexo, entretanto, de forma resumida, quando ocorre a saída da amostra do capilar eletricamente carregado, as moléculas presentes saem com um alto potencial elétrico em direção a um eletrodo. O potencial elétrico a que o capilar é submetido é muito menor que o potencial no qual o espaço entre a saída do capilar e o eletrodo está submetido (capilar:  $\sim 3-4$ , na região entre o capilar e o eletrodo). Dessa forma, ocorre uma intensa separação de cargas, fazendo a formação de um cone na superfície do menisco, chamado de cone de Taylor. Esse fenômeno ocorre devido à exposição a um potencial elétrico muito forte, que faz com que as superfícies das gotículas se tornem levemente ovais. Finalmente, um potencial limiar é atingido fazendo a formação de um fino jato em direção ao eletrodo (GROSS, 2017). Na Figura 11, o processo de formação do cone de Taylor é mostrado.

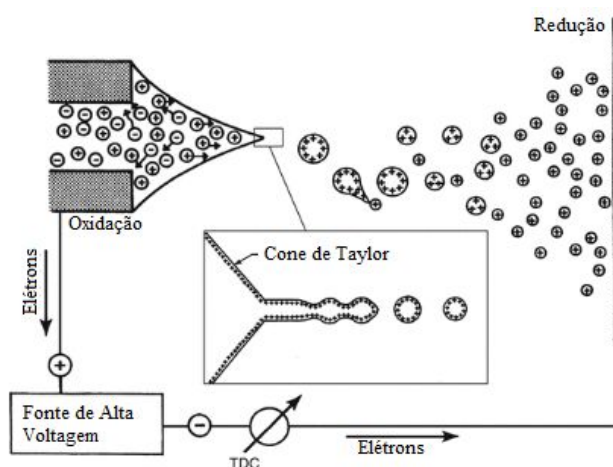


Figura 11: Representação esquemática do processo de formação do cone de Taylor. Figura retirada do livro do J. H. GROSS.

Um dos principais analisadores de massa é o tempo de voo (TOF). Esse analisador parte do princípio de associação entre a razão massa/carga de um composto e sua velocidade após aplicação de um campo elétrico. Essa velocidade é dada por uma diferença de potencial aplicada a uma região livre de campo de tamanho conhecido. Dentro dessa região, os íons são liberados da fonte ao mesmo tempo ou em um intervalo pequeno de tempo, sendo assim, os que apresentam menor relação  $m/z$  percorrem a distância em menor intervalo de tempo que os compostos que apresentam maior  $m/z$ , obtendo-se uma relação entre massa e carga ( $m/z$ ) (GROSS, 2017).

Outro analisador de massa de grande relevância é o quadrupolo. Este é constituído por placas que geram campos eletromagnéticos que permitem a seleção de íons específicos. Em um equipamento do tipo triplo quadrupolo (acoplamento de mais de um analisador em série), ocorre a seleção, em duas etapas, de íons específicos a serem analisados. Os íons selecionados pelo primeiro quadrupolo são então selecionados de novo para serem fragmentados e assim ter maior capacidade de elucidação da estrutura dos componentes (GROSS, 2017).

Para fazer a análise de amostras complexas (mistura de diversos compostos) é importante o acoplamento de técnicas de separação de analitos como a cromatografia líquida. Esse método é utilizado para fazer a separação dos componentes de uma mistura, partindo do princípio de equilíbrio entre adsorção e dessorção entre uma fase gasosa ou líquida e uma fase estacionária (GROSS, 2017).

### **Espectrometria de Massa para Análise de O-glicanos**

FAID et al, 2007, analisou o padrão de O-glicanos em sangue de pacientes controle e pacientes com CDG tipo II por espectrometria de massa. Foram identificadas cinco estruturas principais com os respectivos valores de  $m/z$ : 534, 895, 1256, 1344 e 1706.

Um dos pacientes apresentava CDG tipo IIa e seus espectros não apresentaram mudanças significativas nas concentrações de O-glicanos. Para os pacientes com um CDG tipo II mais leve, foi concluído que os O-glicanos com  $m/z$  534 (Hex1HexNAcitol) e 1256 (Neu5Ac2Hex1HexNAcitol) estavam presentes em concentrações alteradas. Como a estrutura de  $m/z$  1256 é uma extensão da estrutura de  $m/z$  534, uma concentração reduzida do  $m/z$  1256 determina, por consequência, concentração elevada do  $m/z$  534 (FAID et al, 2007). Esses resultados foram obtidos comparando com 20 pacientes saudáveis. Nas figuras abaixo, são apresentados os espectros que confirmam as conclusões apresentadas acima.

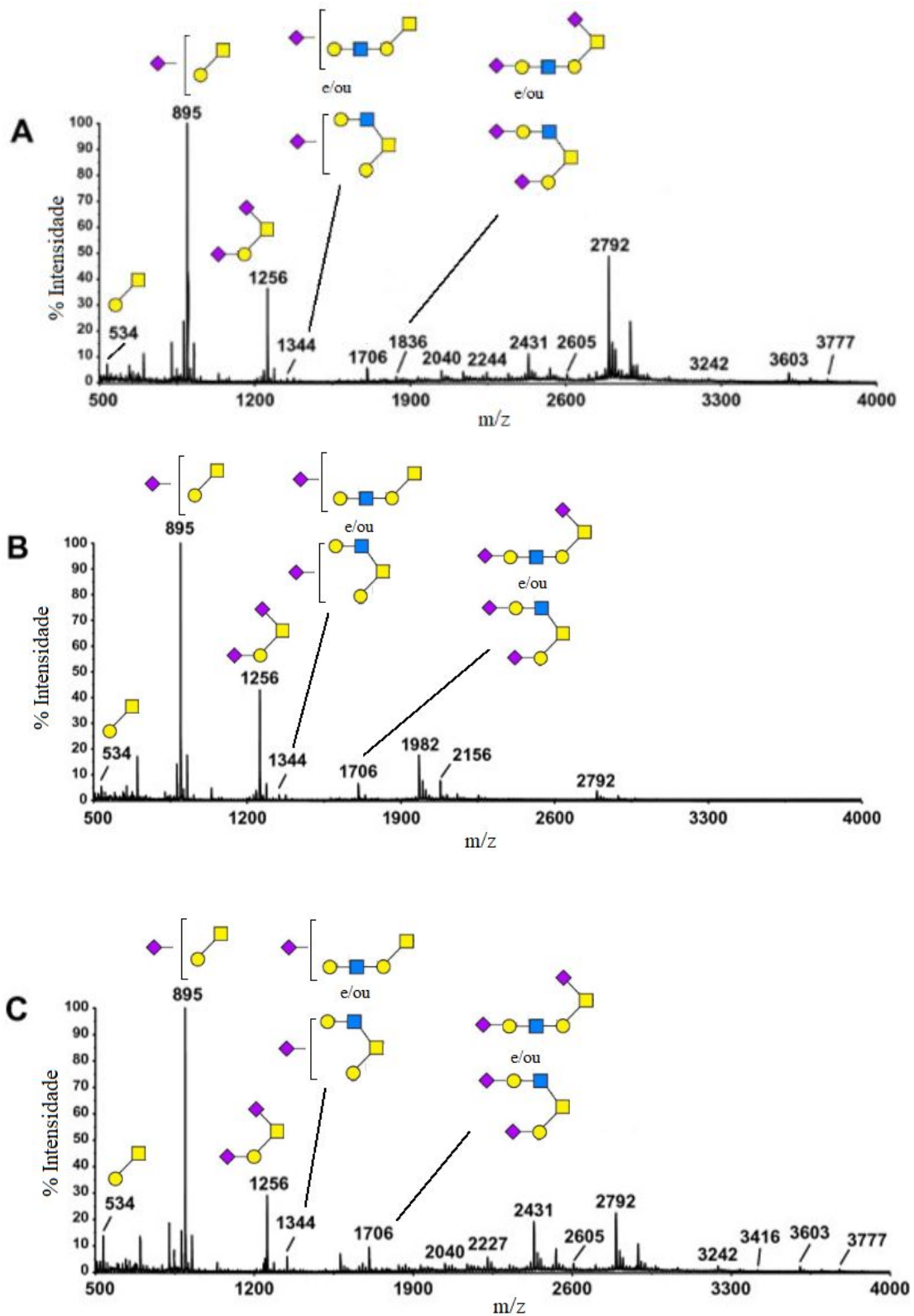
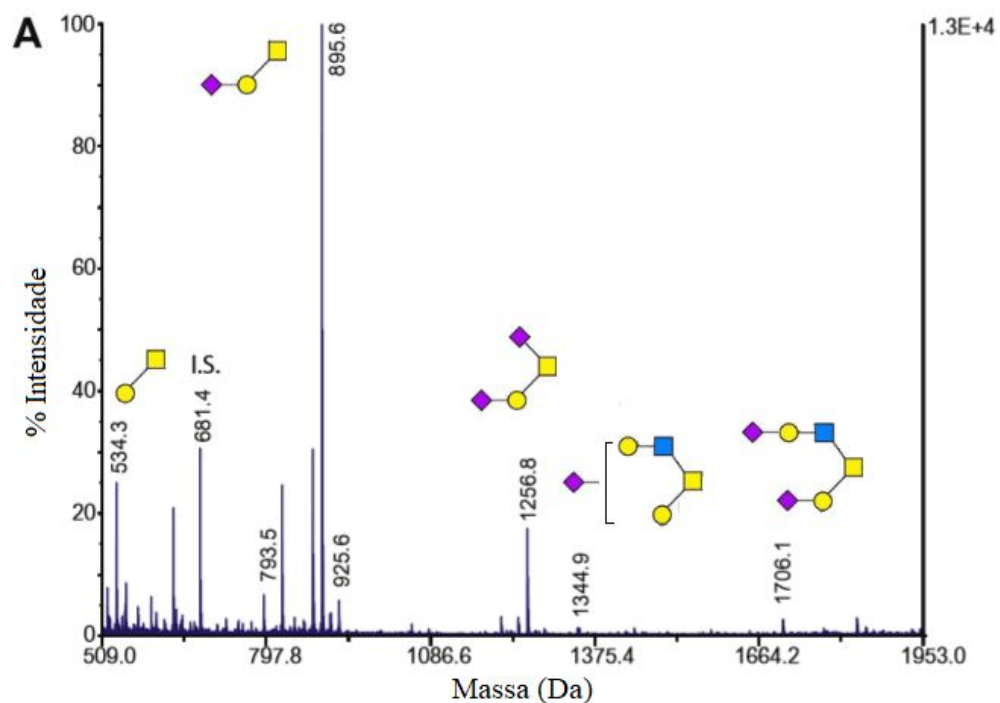


Figura 12. Perfil de O-glicanos em sangue de pacientes acometidos por CDG determinado por espectrometria de massa. A) Espectro de MALDI/TOF de O-glicanos plasmáticos para pacientes saudáveis. B) Espectro de MALDI/TOF para pacientes que apresentavam CDG tipo IIa. C) Espectro para pacientes que apresentavam uma forma de

CDG leve. Foram identificadas 5 estruturas de O-glicanos e apenas alterações no paciente com o CDG leve. As alterações estavam relacionadas às concentrações das estruturas 1256 e 534 (FAID et al, 2007). Legenda: ■ *N*-acetilglicosamina (GlcNAc), ● Galactose (Gal), ◆ Ácido siálico (NeuAc), ■ *N*-acetilgalactosamina (GalNAc).

XIA et al, 2013, também realizou análises de O-glicanos para CDG tipo II. Foram identificadas 5 estruturas principais, sendo elas: *m/z* 534 (antígeno T), 895 (antígeno ST), 1256 (antígeno T disialilado), 1344 (estrutura core 2 monosialilada) e 1795 (core 2 disialilada). Na Figura 13, são apresentados A) o espectro obtido a partir do soro de pacientes controle e B) uma relação da concentração entre quatro estruturas de O-glicanos de pacientes saudáveis e que apresentavam CDG tipo II. Como pode ser visto, segundo o artigo, há alterações nas concentrações de antígeno ST e de antígeno T disialilado.



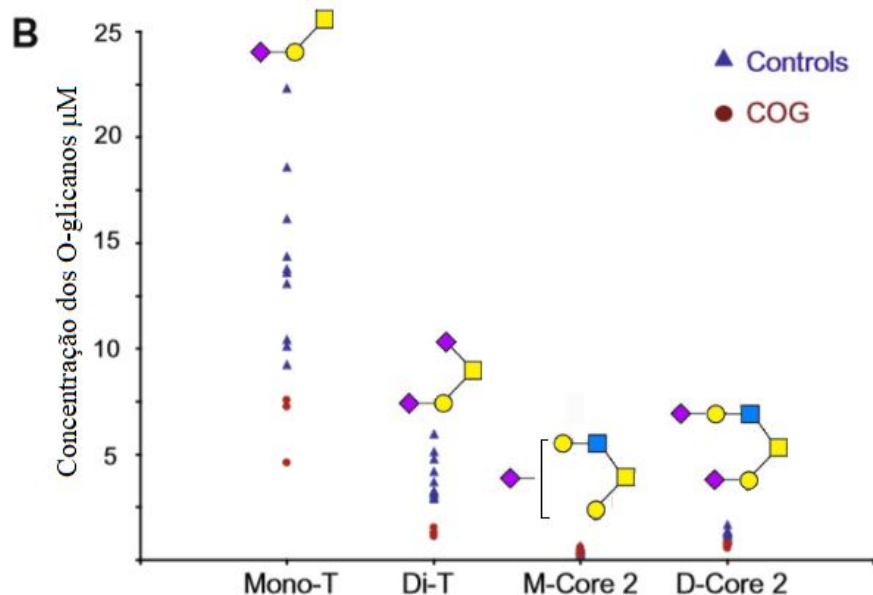


Figura 13. A) Espectro do sangue de pacientes controle feito por MALDI-TOF MS. B) Relação entre concentração de determinados O-glicanos e a distribuição de pacientes controles e que apresentavam CDG. COG é um complexo de membrana proteica que atua como um fator de fixação de processos do complexo de Golgi (SMITH et al, 2008) e estão alteradas devido a defeitos em O-glicanos. Foram encontradas alterações nas concentrações das estruturas de antígeno T mono e dissialiladas (XIA et al, 2013). Legenda: ■ *N*-acetilglicosamina (GlcNAc), ● Galactose (Gal), ◆ Ácido siálico (NeuAc), ■ *N*-acetilgalactosamina (GalNAc).

A estrutura antígeno T não apresentou um bom sinal nos espectros de massa, por causa da baixa abundância e dos efeitos de interferência de matriz. Dessa maneira, foi realizada a análise das mesmas amostras, utilizando o acoplamento de LC-MS/MS, que permite uma quantificação com maior sensibilidade, devido a cromatografia permitir uma melhor separação dos compostos da amostra (XIA et al, 2013).

A Figura 14 apresenta os sinais, assim como os espectros de massa, obtidos pelo método de monitoramento múltiplo de reações (Multiple Reaction Monitoring - MRM) para o antígeno T e o antígeno ST, o qual permitiu a análise com maior sensibilidade e seletividade (XIA et al, 2013). Essa técnica permite uma análise simultânea de íons e seus produtos de fragmentação (KITTINGHAM et al, 2009). É apresentado o padrão de fragmentação do antígeno T e do antígeno ST.

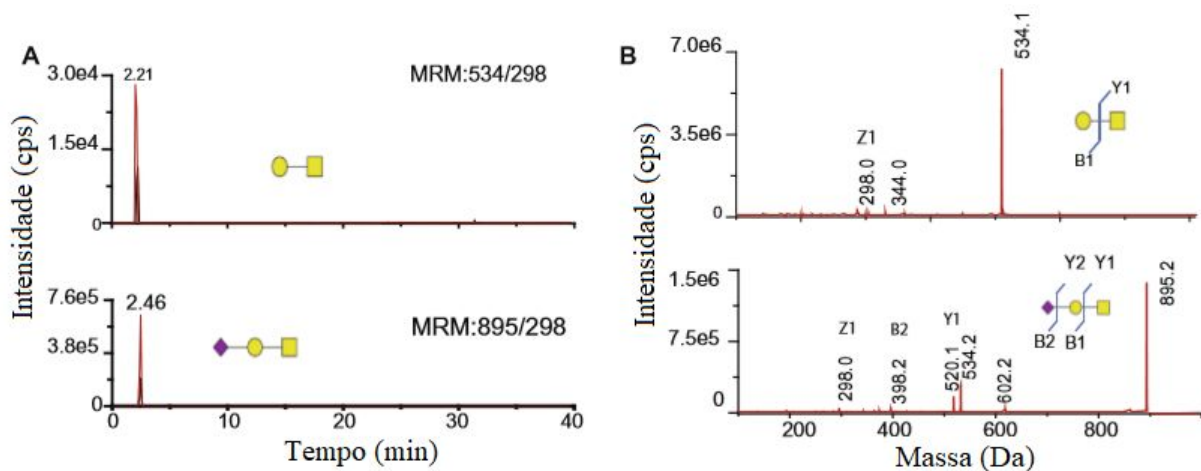
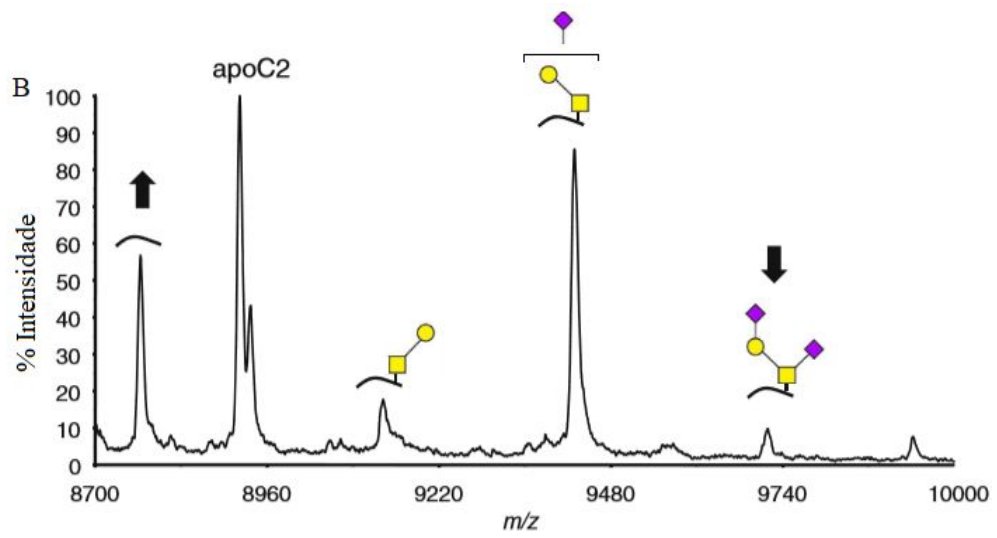
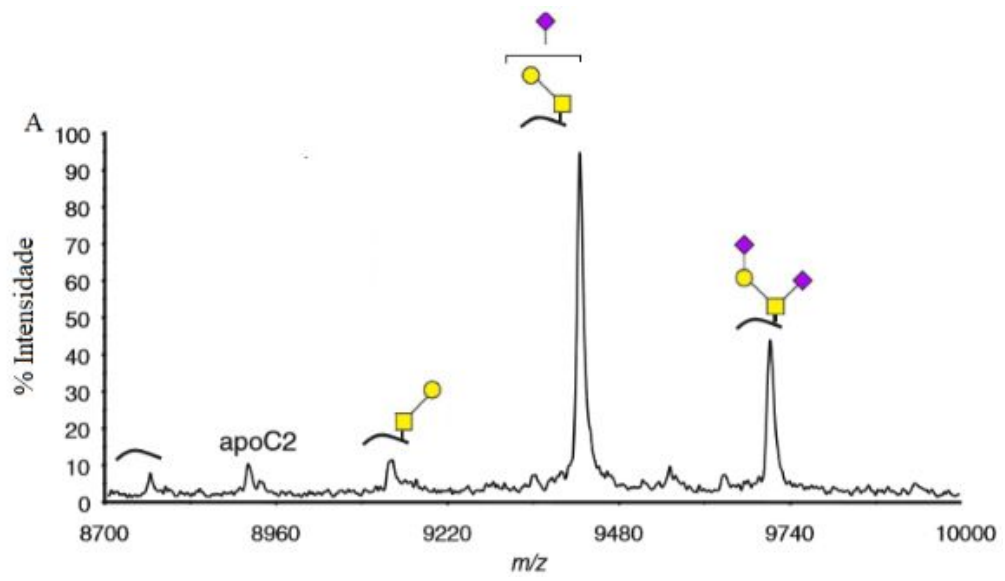


Figura 14. A) Cromatograma do experimento de MRM dos íons 534 e 895, correspondente aos antígenos T e ST, respectivamente. B) Espectros obtidos das fragmentações das estruturas antígeno T e antígeno ST. Onde Z1, B2, Y1, referem-se a cada íon formado pela clivagem do açúcar (detalhes acerca das clivagens são apresentadas na secção metodologia) (XIA et al, 2013). Legenda: ● Galactose (Gal), ◆ Ácido siálico (NeuAc), ■ *N*-acetilgalactosamina (GalNAc).

Para obter melhor quantificação, a razão entre as concentrações de antígeno T/antígeno ST foi calculada. De forma geral, os pacientes que possuíam CDG apresentaram a concentração de antígeno T elevada e de antígeno ST reduzida. Ainda, foi concluído que a presença de O-glicanos com sialilação em estruturas primárias, como por exemplo, antígeno ST, e a possível deficiência em diversas glicosiltransferases do complexo Golgi levam a evidência de um tipo misto de CDG tipo I e tipo II (XIA et al, 2013).

No trabalho de WADA et al, 2016, foi realizada a análise da glicoproteína APOCIII que apresenta 79 resíduos de aminoácido e uma estrutura de O-glicano core 1 na Thr de posição 74 e não apresenta nenhum N-glicano em sua estrutura (WADA et al, 2016). A glicoproteína intacta foi analisada, ao invés do O-glicano livre. Foi encontrada reduzida taxa de sialilação, como pode ser observado nos espectros da Figura 15. Como as outras estruturas sialiladas estão em concentrações aproximadamente normais e o gene associado a este tipo de CDG não tem relação direta com a síntese de O-glicanos, sendo assim, a alteração no processo de glicosilação é um efeito secundário originado pelos defeitos genéticos (WADA et al, 2016)





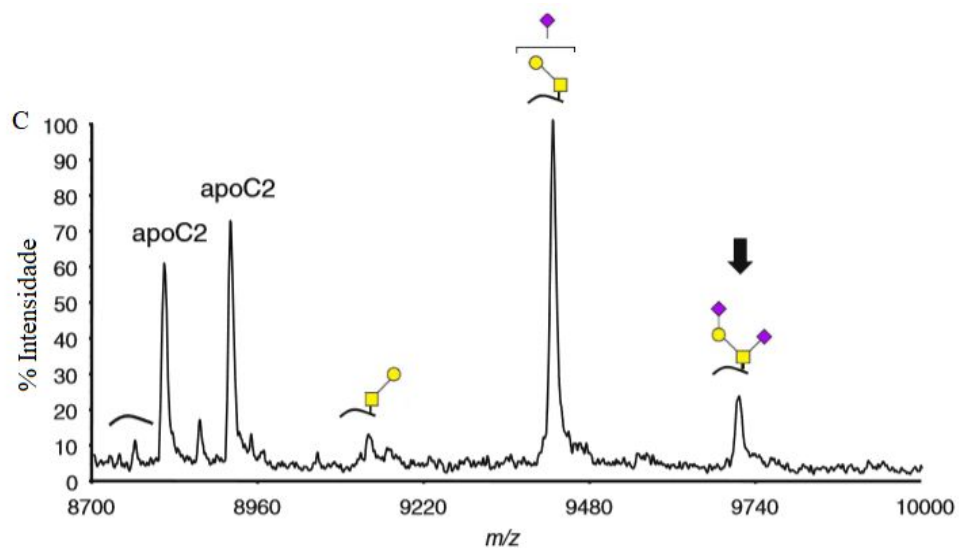


Figura 15. Análise das estruturas de O-glicanos isolados da proteína APOCIII em pacientes com CDG. A) Espectro do padrão da glicoproteína APOCIII para pacientes controle; B e C) Pacientes que apresentaram CDG tipo IIa. Como pode ser visto, a estrutura dissialilada está em concentrações alteradas, entretanto as outras estruturas de O-glicanos não apresentaram alterações significativas, o que determinou que o defeito não estava associado a síntese de O-glicanos diretamente. (WADA et al, 2016) Legenda: ■ *N*-acetilglicosamina (GlcNac), ● Galactose (Gal), ◆ Ácido siálico (NeuAc), ■ *N*-acetilgalactosamina (GalNAc).

## METODOLOGIA

Para a realização da análise dos glicanos livres por espectrometria de massa, foi necessário que eles fossem liberados das glicoproteínas. Dessa forma, o método utilizado é apresentado abaixo, onde tem a representação das etapas que foram tomadas para a preparação das amostras que foram analisadas.

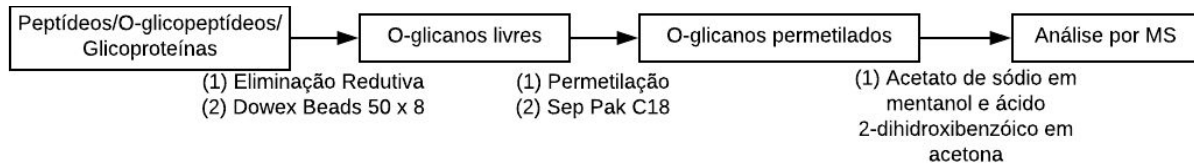


Figura 16: Estratégia metodológica adaptada e resumida para determinação da estrutura de O-glicanos por espectrometria de massa (MORELLE; MICHALSKI et al, 2007).

Como é mostrado na Figura 16, na primeira etapa, foi realizada uma extração para que os glicanos fossem liberados das proteínas, a partir da quebra das ligações O-glicosídicas entre os açúcares e os aminoácidos. Posteriormente, foi realizada uma etapa de permetilação dos glicanos. Etapas de purificação foram realizadas ao final de cada processo. Os O-glicanos isolados foram analisados por LC-MS/MS utilizando uma coluna de fase reversa C18 em um equipamento de espectrometria de massa composto por um quadrupolo acoplado a um TOF (QTOF). Abaixo as etapas de todos os processos são apresentadas de forma detalhada.

### 1. Pacientes.

Foi feita a extração dos O-glicanos a partir do sangue periférico de 5 pacientes com CDG tipo II, diagnosticados por análise de transferrina por focalização isoelétrica (IEF) e sequenciamento genético, com idade entre 1 e 13 anos. Como controle, o sangue periférico extraído de 5 pacientes normais, da Rede Sarah de Hospitais, foi utilizado. Os pacientes do grupo controle tinham idade entre 1 e 13 anos, sendo que estes não apresentaram sintomas ou testes laboratoriais compatíveis com CDG, além de terem padrão de glicosilação normal de transferrina. Um pool de plasma foi obtido pela mistura de todos os pacientes controle para se obter a variabilidade das concentrações dos O-glicanos dentro da população das amostras normais.

### 2. Extração, Purificação e Análises dos O-glicanos.

Para a purificação dos glicanos (O-glicanos) foram utilizados os procedimentos descritos pelo trabalho de (MORELLE; MICHALSKY, 2007), no qual, ele utilizou o procedimento descrito abaixo:

Primeiramente, foi colhida uma alíquota de 200 µl do plasma, onde estavam presentes as proteínas. Como elas estavam congeladas, foi necessário esperar elas descongelarem a temperatura ambiente. Em um eppendorf foi preparada uma solução estoque de 1 ml de *NaOH* na concentração 0,4 M e foram pesados 1,6 mmol de *NaBH<sub>4</sub>* em outro eppendorf

para cada amostra a ser extraída. Foram adicionados 200  $\mu\text{l}$  da solução de  $\text{NaOH}$  ao eppendorf com  $\text{NaBH}_4$ . Com as amostras descongeladas, cada alíquota do plasma foi agitada com o auxílio de um vortex e adicionada a um eppendorf que continha a solução de  $\text{NaOH}$  e  $\text{NaBH}_4$ . Tendo-se no final uma mistura de 400  $\mu\text{l}$  contendo o plasma,  $\text{NaOH}$  (200 mM) e  $\text{NaBH}_4$  (4M).

As amostras então foram submetidas às condições apresentadas a seguir. Estas foram necessárias para que ocorresse a reação de Beta-Eliminação. Condições: temperatura de 45°C por 8 horas. O mecanismo de reação para a eliminação reductiva é mostrado na figura a seguir.

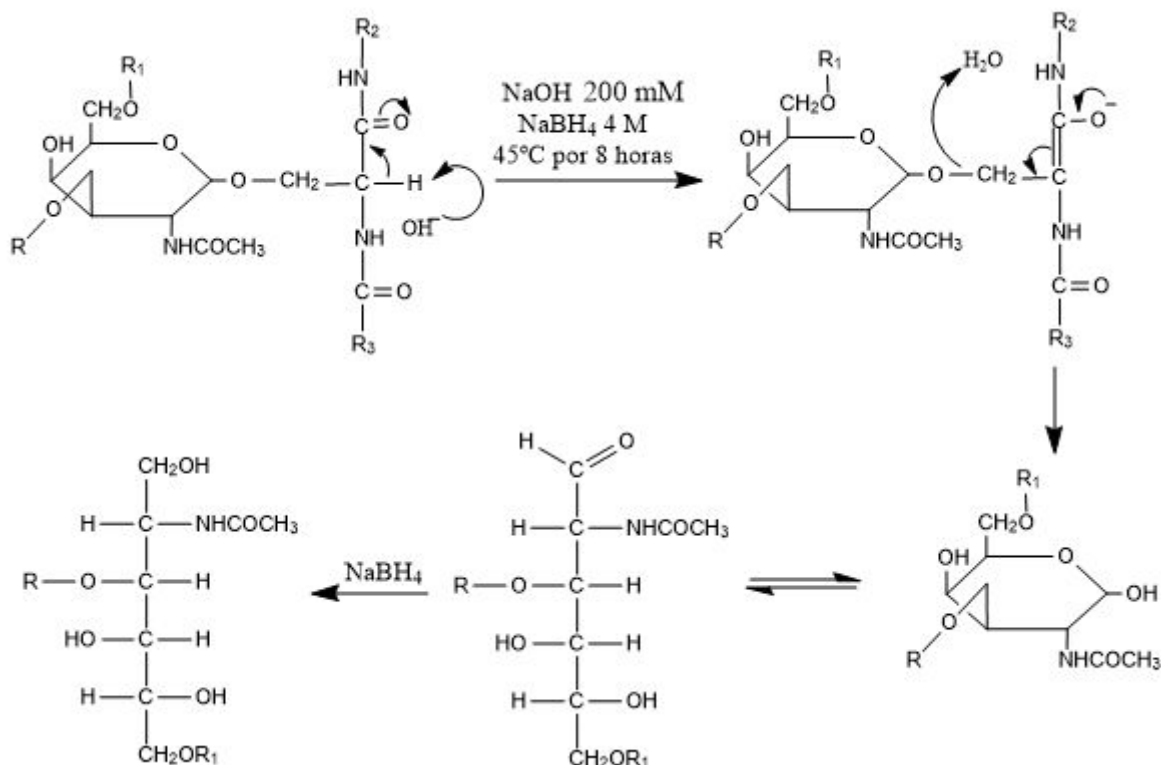


Figura 17: Etapas da reação de eliminação reductiva dos O-glicanos. Onde,  $R$  e  $R_1$  são monossacarídeos e  $R_2$  e  $R_3$  são as cadeias de aminoácido da proteína (MORELLE; MICHALSKI et al, 2007).

Após o final do tempo da reação, esta foi interrompida com a utilização de ácido acético concentrado, aproximadamente 4 gotas, sob banho de gelo, cuidadosamente, para evitar a perda de amostra com o transbordamento do conteúdo do recipiente, pois ocorre grande liberação de gás com a adição do ácido acético nesse processo. Para reduzir o borbulhamento, foi adicionado ácido acético 5% em metanol em gotas com a utilização de uma pipeta de pasteur.

Terminada a extração, os O-glicanos apresentavam-se livres na solução e, dessa forma, seguiu-se para a próxima etapa do processo, que foi a purificação dos O-glicanos por Dowex Beads (50 x 8,  $\text{H}^+$ , 50-100). Estas são constituídas por uma matriz em gel de estireno-divinilbenzeno e matriz de grupos ativos de ácido sulfônico, e antes de serem

utilizadas, necessitavam de um tratamento para a limpeza e ambientação. Isso foi feito por duas lavagens de 15 ml de NaOH com concentração 3 M por 30 minutos cada à temperatura ambiente e lavagens com água até a água da lavagem ter pH de aproximadamente 7. Depois, foram feitas duas lavagens com 15 ml de HCl com concentração 3 M por 30 minutos cada à temperatura ambiente e lavagens com água até se obter o pH igual a 7. Por último, foram feitas 3 lavagens com ácido acético a 5% em água, cada lavagem de 20 ml. e para estocar o material, foi utilizado ácido acético a 5%.

O processo de purificação foi realizado, primeiramente, com a colocação de 2 ml das Dowex Beads tratadas em uma pipeta Pasteur. Após, a coluna foi lavada com 5 frações de 2 ml cada (totalizando 10 ml) de ácido acético a 5% em água. A amostra foi colocada na coluna e eluída com 4 ml de ácido acético 5%. Foram coletadas duas frações dos O-glicanos purificados, cada uma com 2 ml. Esse processo permitiu a remoção de compostos catiônicos (sais de sódio, peptídeos e aminoácidos), pois esse processo parte do princípio da cromatografia de troca iônica. Após essa purificação, os glicanos foram secos e congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Com a amostra seca, foi feita a remoção dos sais de borato. Foram feitas repetidas evaporações de metanol contendo 5% de ácido acético (5x500  $\mu\text{l}$ ), sob fluxo de argônio. Foram adicionados 500  $\mu\text{l}$  de DMSO às amostras as quais foram transferidas para um tubo de vidro contendo 25 mg de NaOH para manter o meio básico. Posteriormente, foram adicionados 300  $\mu\text{l}$  de Iodometano sob fluxo de argônio. Os tubos foram tampados rapidamente (antes do frasco de iodometano ser fechado, deve ser colocado argônio dentro do frasco para evitar degradação do reagente) e foram deixadas em banho de ultrassom por 90 minutos.

Após esse tempo, a reação foi interrompida com a adição de 1 ml de ácido acético 5% em banho de gelo. Foram utilizados 600  $\mu\text{l}$  de clorofórmio para a realização de uma extração, sendo a fase aquosa lavada de novo e a fase inferior (clorofórmio) colocada em outro tubo de vidro. Esse processo foi repetido mais duas vezes, colocando-se a fase de clorofórmio em um mesmo tubo. Em seguida, a fase de clorofórmio foi lavada 8 vezes com água deionizada (aproximadamente 1,8 ml em cada lavagem) em banho de gelo, fazendo o descarte da fase superior (aquosa). A fase de clorofórmio foi então secada sob fluxo de argônio.

Após o fim do processo anterior, os O-glicanos foram submetidos a uma coluna Sep-Pak C18, que foi condicionada com 5 ml de metanol e 10 ml de água deionizada. A amostra foi adicionada a coluna e foi eluída com a adição de 15 ml de água deionizada, 2 ml de acetonitrila 10% e 3 ml de acetonitrila 80%. As duas últimas frações de acetonitrila 80% foram coletadas em duas amostras de 1,5 ml. Após esse processo, as alíquotas foram secas a  $-20^{\circ}\text{C}$  e congeladas. Abaixo é mostrado um fluxograma para o processo de permetilação.

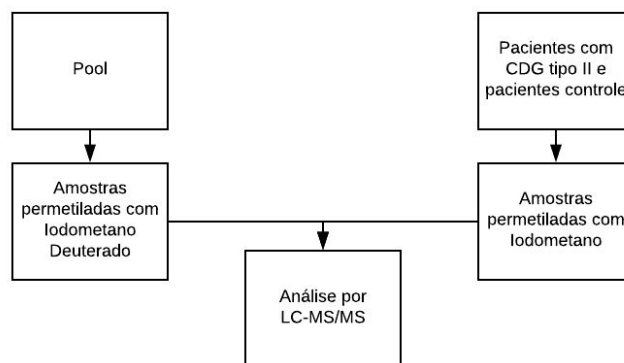


Figura 18: No fluxograma acima são apresentadas as formas como cada amostra será tratada para se ter diferenciação entre as estruturas das amostras de pool e dos pacientes doentes e controles, permitindo assim a utilização da estratégia SIL (Marcador isotópico estável - Stable isotope labelling) (RUHAAK et al, 2010).

Para a execução de uma estratégia SIL, foi necessária a utilização de iodometano deuterado e iodometano normal para se calcular a abundância relativa dos glicanos em cada amostra. Essa estratégia permite a validação das análises por meio da criação de uma faixa de variância dentro da população de pacientes controles, para se determinar assim a faixa considerada alterada dentro dos pacientes controles. Assim, é possível uma análise mais sensível e detalhada para os compostos que estão em baixas concentrações nas amostras (RUHAAK et al, 2010). A amostra do pool foi permitilada com iodometano deuterado e as amostras dos pacientes controles e pacientes doentes com iodometano normal. Dessa forma, foi preparada uma amostra de pool para cada amostra de paciente doente e para cada amostra de paciente normal analisada. Totalizando cinco amostras de pacientes doentes, cinco amostras de pacientes normais e, portanto, 10 amostras do pool.

Com o fim da permitilação e purificação dos O-glicanos, as amostras estavam prontas para serem analisadas por espectrometria de massa. As análises foram feitas em um cromatógrafo líquido equipado com uma coluna Kinetex C18 acoplado a um espectrômetro de massa TripleTof 5600+ (AB Sciex), com a utilização de  $H_2O$  Milli-Q contendo 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e metanol contendo ácido fórmico 0,1% (solvente B). A amostra foi eluída a partir de um gradiente linear do solvente B de 30 a 95% por 10 minutos com o fluxo de 0,2 ml/min.

As amostras foram dissolvidas com 40  $\mu$ l de metanol e foram adicionados 4  $\mu$ l de acetato de sódio. Posteriormente, foram agitadas e colocadas em uma centrífuga. As mesmas foram então passadas para um pequeno tubo de vidro de, aproximadamente, 50  $\mu$ l inserido dentro de um insert em vidro para utilização no espectrômetro de massa.

O espectrômetro foi ajustado para modo positivo utilizando o modo IDA (Information Dependent Acquisition), o qual permitiu a aquisição de espectros de MS/MS dos íons de acordo com parâmetros pré-estabelecidos. Os espectros em modo MS foram adquiridos com um range de massa de 500 a 2000  $m/z$ . Os espectros de fragmentação (MS/MS) gerados foram analisados utilizando o software livre GRITS Toolbox (WEATHERLY et al, 2019).

As análises foram interpretadas no software GRITS (v. 1.2.3). Neste foi feita a busca e anotação dos espectros de fragmentação gerados. Para que essas análises fossem realizadas, foi necessário que alguns parâmetros fossem utilizados. Esses parâmetros foram a busca por O-glicanos permetilados com extremidade livre reduzida a partir do banco de dados padrão do software, contendo 217 estruturas e o máximo de três clivagens possíveis por fragmentação (íons B, C, Y e Z) e uma clivagem interna por resíduo (íons A e X); busca por adutos de sódio com máximo de 4 cargas, acurácia de massa mínima de 5 ppm; íons fragmentos com intensidade mínima superior a 5% do pico base. Com o auxílio do software GlycoWorkBench (CERONI et al, 2008), as massas das estruturas permetiladas com 1, 2 e 3 átomos de sódios, e permetiladas com iodometano deuterado com a mesma quantidade de Na ( $[M + Na]^+$ ,  $[M + 2 Na]^{2+}$ ,  $[M + 3 Na]^{3+}$ ) foram obtidas e reunidas no banco de dados. Foi feita também, em casos específicos, a interpretação manual dos espectros de MS/MS dos glicanos, seguindo o padrão de fragmentação para glicanos, conforme demonstrado na Figura 19.

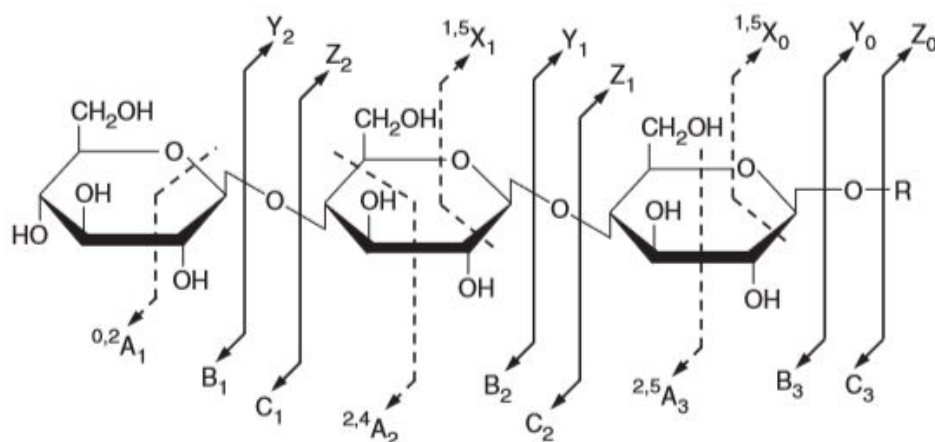









Figura 19: Padrão de clivagem para os glicanos em análise de MS/MS. As clivagens A, B, C conservam a carga da estrutura no terminal não-redutivo. Já as clivagens X, Y, Z geram uma carga no terminal redutivo da fragmentação. Além disso, as clivagens A, X ocorrem dentro dos anéis e as clivagens B, C e Y, Z são clivagens nas ligações glicosídicas entre os monossacarídeos. A estrutura R se refere ao monossacarídeo na sua forma reduzida (MORELLE et al, 2007).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO



A extração, derivatização e análise de O-glicanos depende de uma complexa e laboriosa metodologia, conforme apresentado na seção material e métodos. Foram inúmeras as dificuldades encontradas durante o processamento de amostras e a aquisição de dados, as quais incluem ainda a inoperância do Espectrômetro de Massa do Instituto de Química durante um longo período, o que fez com que as amostras ficassem guardadas sem um controle efetivo de eventuais processos de degradação química. Assim, embora o trabalho objetivasse primariamente a quantificação dos O-glicanos em 5 controles e 5 pacientes doentes, foi observada uma variância significativa nos dados quantitativos obtidos (não mostrados), o que indica que ainda são necessárias otimizações metodológicas em todo o processo de extração e análise destas moléculas. Desta maneira, o trabalho assumiu um foco na análise qualitativa de O-glicanos, buscando a descrição das espécies presentes em 3 pacientes com CDG e 1 controle. Destes 3 pacientes, 2 tiveram diagnóstico prévio compatível com CDG-ATP6V0A2 (chamados neste trabalho de CDG 2 e 3), conforme publicado pelo nosso grupo (BARBOSA et al, 2019).

Para o entendimento dos resultados apresentados a seguir, faz-se necessária a utilização da Tabela 2.

Tabela 2: Símbolos e massas dos fragmentos de monossacarídeos normais e metilados. (MORELLE et al, 2007)

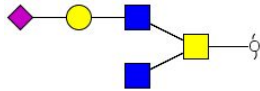
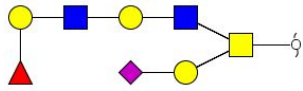
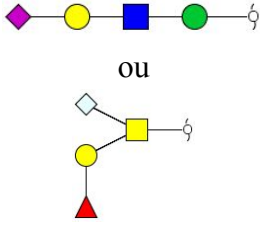
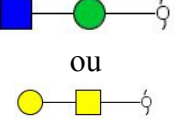
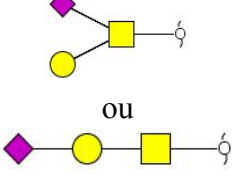
Tipo de açúcar	Símbolos	Monossacarídeo	Abreviação	Massa acurada do resíduo	Massa acurada do resíduo permetilado
N-Acetil hexosamina		N-acetilgalactosamina	GalNAc	203,0794	245,1263
		N-acetilglicosamina	GlcNAc	203,0794	245,1263
Hexose		Manose	Man	162,0528	204,0998
		Glicose	Glc	162,0528	204,0998
		Galactose	Gal	162,0528	204,0998
Desoxihexose		Fucose	Fuc	146,0579	174,0892
Pentose		Xilose	Xyl	132,0423	160,0736
Ácido		Ácido	NeuAc	291,0954	361,1737



<i>N</i> -Acetil neuramínico		<i>N</i> -acetilneuramínico			
Ácido <i>N</i> -glicolil neuramínico		Ácido <i>N</i> -glicolilneuramínico	NeuGc	307,0903	361,1842

Foram adquiridos dados de LC-MS dos pacientes e do controle com posterior submissão dos dados ao software GRITS, o qual é capaz de identificar automaticamente os espectros de MS/MS compatíveis com glicanos. Na Tabela 3 são apresentadas todas as estruturas encontradas, a razão massa/carga das espécies permetiladas e o estado de carga em que foram detectadas.

Tabela 3: Estruturas metiladas encontradas nas amostras segundo o software GRITS. Algumas estruturas são apresentadas com mais de uma possibilidade por terem mesma massa molecular e espectros de MS/MS que não permitem a identificação inequívoca.

Legenda	Estrutura	<i>m/z</i>	Carga
1		477,2299	3
2		671,3247	3
3	 ou	292,1325	4
4	 ou	534, 2892	1
5	 ou	895, 4609	1

6		708, 3807	1
7		690, 6748	3

Na Tabela 4, dada abaixo, são apresentadas todas as estruturas encontradas, a razão massa/carga das espécies permetiladas com iodometano deuterado (I-CD<sub>3</sub>) e o estado de carga em que foram detectadas. Essas estruturas são provenientes do pool de amostras feito com os controles.

Tabela 4: Estruturas deuteradas encontradas na amostra segundo o software GRITS. Algumas estruturas são apresentadas com mais de uma possibilidade por terem mesma massa molecular e espectros de MS/MS que não permitem a identificação inequívoca.

Legenda	Estrutura	<i>m/z</i>	Carga
8		668,4949	2
9		937, 7301	1
10		878, 5603	1
11		530, 3752	4

12		570, 4188	2
13		518, 3686	4
14		497, 3576	3
15	 ou  ou  ou 	419, 3145	2
16		485, 3453	4
17		822, 4821	2

Dadas as Tabelas 3 e 4, as quais apresentam as estruturas metiladas e deuteradas encontradas nos 4 casos avaliados, foi possível a construção de uma matriz indicando presença ou ausência destas estruturas nos pacientes controle e nos 3 pacientes com CDG avaliados (Tabela 5).

Tabela 5: Presença/ausência das estruturas de glicanos identificados nos dados de LC-MS para os 4 casos avaliados pelo software GRITS.

Estrutura	Paciente Controle	CDG 1	CDG 2	CDG 3
-----------	-------------------	-------	-------	-------

1	X	X	X	X
2	X			
3	X	X	X	
4		X		X
5	X	X	X	X
6				X
7				X
8	X			
9	X			
10	X			
11	X			X
12	X	X	X	
13	X			
14	X	X	X	
15	X	X	X	X
16	X	X	X	X
17			X	

Embora o programa GRITS tenha identificado diversas estruturas, várias delas se apresentaram como falso positivo após avaliação manual no software de aquisição no espectrômetro de massa, por meio da avaliação da diferença de massa entre os isótopos de cada composto.

A confirmação da presença/ausência dos compostos foi feita da seguinte forma: utilizando a estrutura 1, como exemplo, que apresenta  $m/z$  de 477,2299 e carga igual a 3 como exemplo, temos que os isótopos dessa estrutura deveriam apresentar diferença de massa entre os picos de 0,333. Abaixo, na Figura 20, é apresentado um espectro com os isótopos do íon  $m/z$  477,2299.

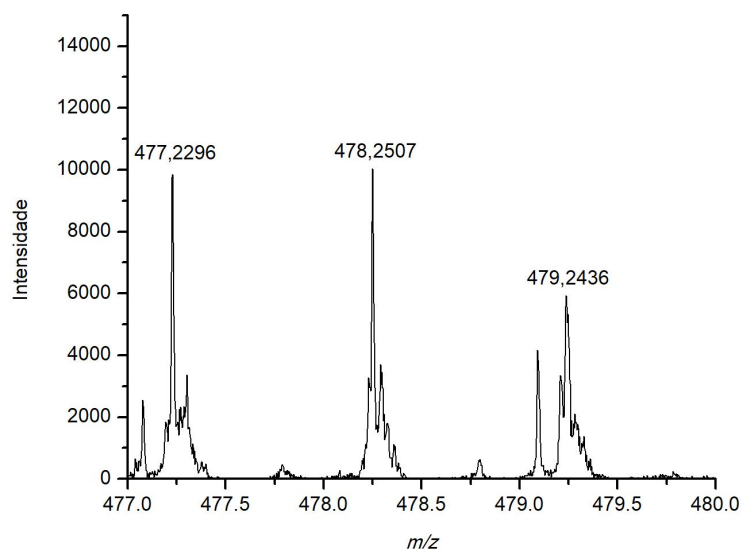


Figura 20: Espectro de MS com ampliação na faixa de razão  $m/z$  entre 477 e 480. Como pode ser visto a diferença de massa é de aproximadamente 1. O valor dessa diferença deveria ser em torno de 0,333 para corresponder a uma tripla carga, como citado no texto acima.

Além disso, no espectro de MS/MS, a mesma estrutura com  $m/z$  igual a 477,2299 deveria apresentar íons filhos com razão  $m/z$  superior a do íon precursor, o que não pôde ser verificado. No entanto, fazendo a avaliação dos espectros acima, conclui-se então que o software GRITS chegou a um falso positivo. Abaixo é apresentado o espectro de MS/MS para o íon precursor  $m/z$  477.

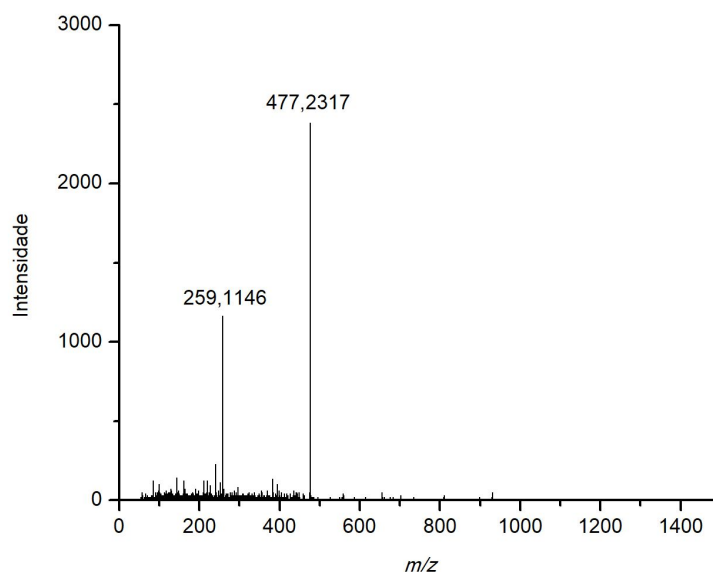


Figura 21: Espectro de MS/MS da estrutura com  $m/z$  477,2317. Como pode ser observado, não há nenhum íon com razão  $m/z$  superior ao do precursor.

Realizando esse mesmo processo para todas as outras estruturas, foi obtida a tabela abaixo que apresenta as estruturas que de fato estavam presentes nos pacientes analisados.

Tabela 6: Estruturas presentes em cada paciente, após verificação no software de aquisição do espectrômetro de massa.

Estrutura	Paciente Controle	CDG 1	CDG 2	CDG 3
4		X	X	
5	X	X	X	X
6				X
9	X			

A quantidade de falsos positivos encontrada neste trabalho é grande, resultando no questionamento da utilização do software GRITS. Embora os resultados apresentados por ele não possam ser utilizados sem confirmação prévia das moléculas, o mesmo ainda funciona como uma boa ferramenta para o refinamento da busca por glicanos presentes nas amostras. Se esse fosse realizado manualmente, sem a utilização do software, seria um serviço laborioso e longo, impossibilitando que o trabalho fosse realizado no mesmo período. Ainda, na pesquisa realizada pelo nosso grupo, o software GRITS foi uma ferramenta importante na identificação dos N-glicanos (BARBOSA et al, 2019).

Desta forma, o software é uma boa alternativa para auxiliar na busca dos glicanos presentes em amostras não sendo possível a utilização dos resultados de forma definitiva sem a confirmação prévia das estruturas propostas.

De acordo com a literatura, os O-glicanos (Estruturas 4 e 5) encontrados pertencem aos glicanos majoritários encontrados nos seres humanos, entretanto era esperado que outros fossem encontrados (YABU, 2014). Como citado anteriormente na Figura 13 A é apresentado o espectro de um paciente sadio, sendo os glicanos identificados pertencentes aos O-glicanos majoritários (XIA et al, 2013). Comparativamente, apenas o íon 534 e o 895 foram encontrados neste trabalho, indicando assim algum erro ou necessidade de adaptação no método de extração utilizado.

Outro fato que corrobora a necessidade de ajustes no método de extração é a identificação de apenas 1 glicano deuterado em apenas 1 paciente. O esperado seria que, ao menos, esta estrutura estivesse presente em todas as outras amostras, pois como o pool foi composto por todos os pacientes controles e, posteriormente, adicionado às amostras antes da análise por espectrometria de massa, esperava-se que os glicanos deuterados fossem encontrados de forma proporcional em todas as amostras.

A falta de homogeneidade dos compostos deuterados impossibilitou a abordagem quantitativa que era objetivada, devido ao fato da abordagem SIL só ser possível se os glicanos deuterados encontrados pudessem ser utilizados como um padrão para a população estudada. Assim, as quantidades relativas presentes no pool e nos pacientes doentes e

controles seriam comparadas, tendo-se uma faixa considerada normal para os pacientes saudáveis.

A próxima etapa do trabalho foi o estudo de cada um dos cromatogramas e dos espectros de MS/MS das espécies cuja presença foi confirmada. Começando então os estudos pelo controle (Figura 22).

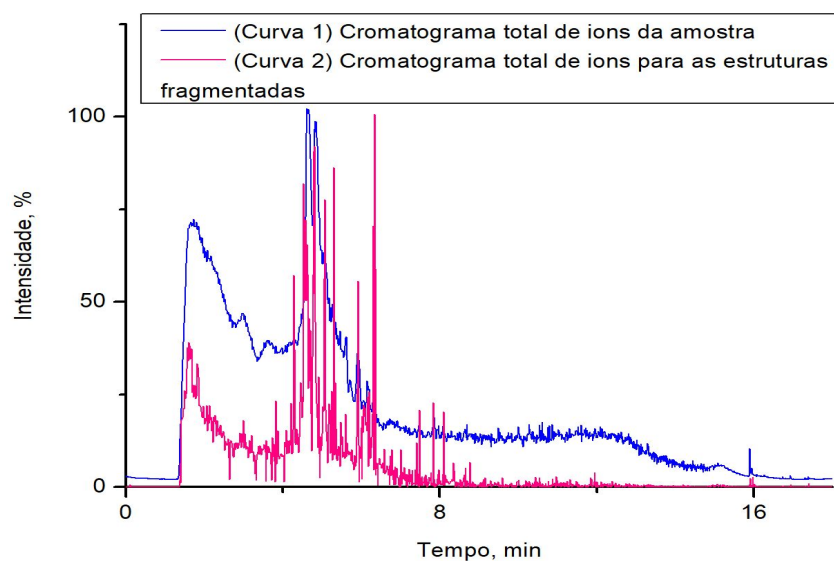


Figura 22: Cromatograma de íons totais para a amostra do controle. As curvas foram normalizadas em relação ao valor máximo de intensidade de cada uma. A curva 1 teve um valor máximo de  $1,6 \times 10^8$  e a curva 2 um valor máximo de  $6,5 \times 10^6$ .

A faixa de eluição dos glicanos ocorreu entre o tempo de 1,8 min e 6,3 min, conforme demonstrado no cromatograma de íons totais (TIC) da Figura 22. Este cromatograma é representativo dos demais pacientes, pois os tempos de retenção e a intensidade foram, aproximadamente, os mesmos. Os outros cromatogramas para CDG1, CDG2 e CDG3 estão disponíveis na seção de anexos ao final deste trabalho.

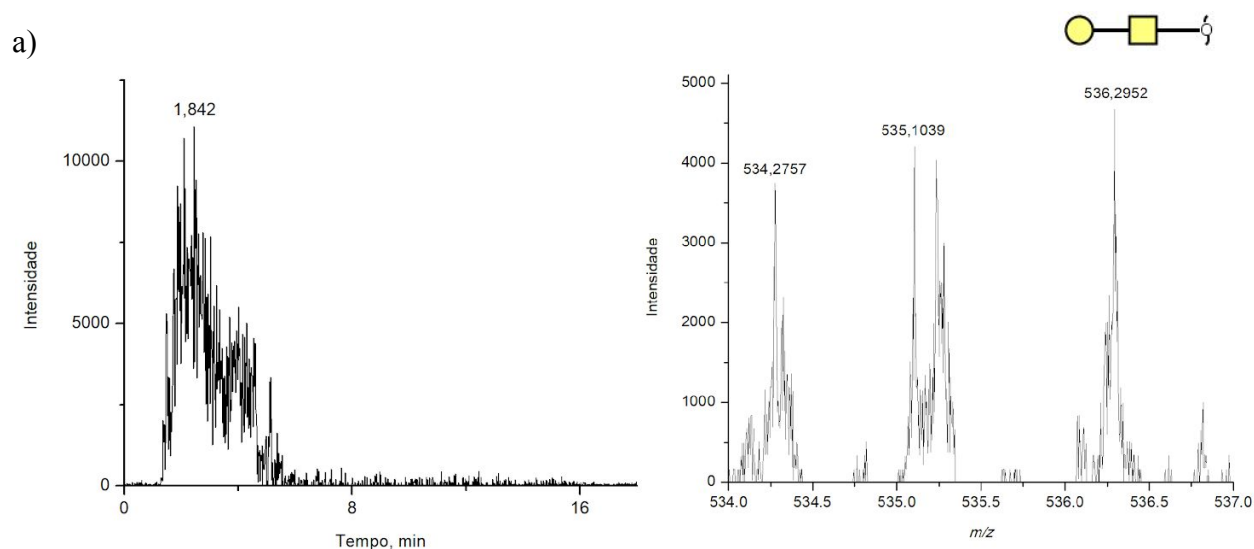
Os erros de massa foram calculados a partir da razão entre a diferença da massa experimental e a massa teórica. A massa teórica foi obtida pelo software GlycoWorkbench. Na Tabela 7, são apresentados os dados de massa teórica, massa experimental e seus respectivos erros.

Tabela 7: Dados de massa teórica, massa experimental e erros.

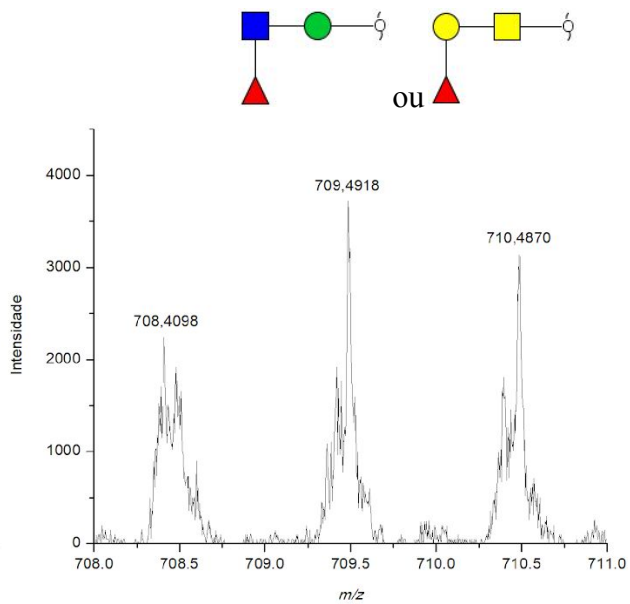
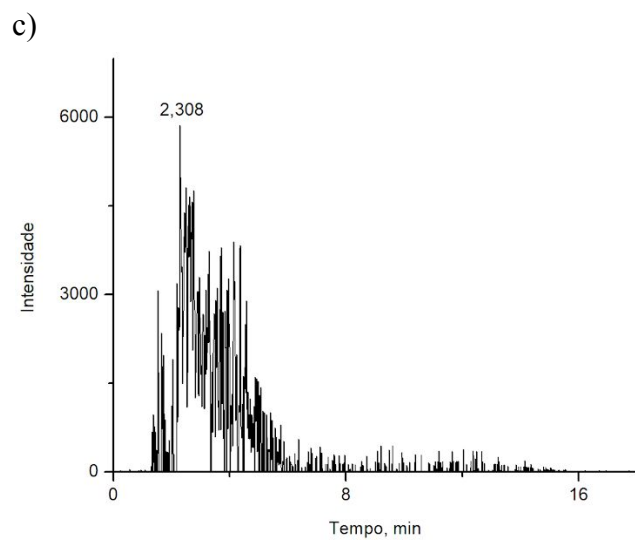
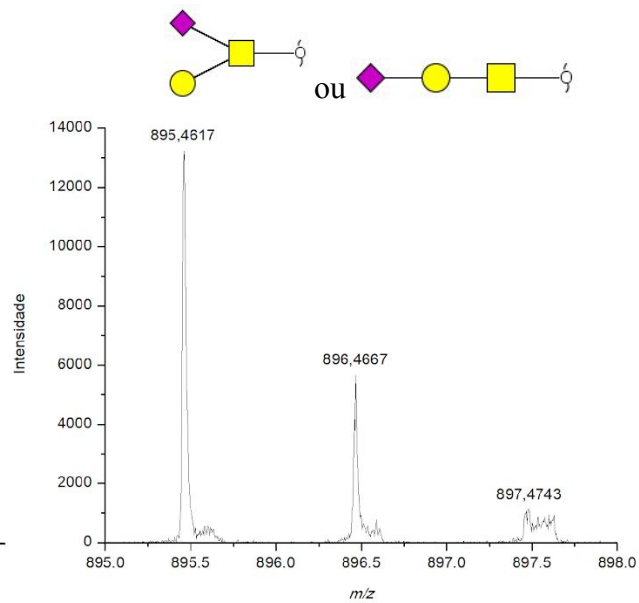
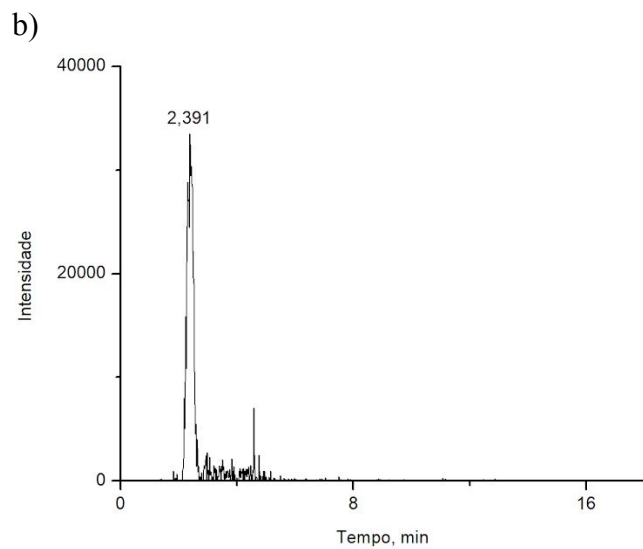
Estrutura	Massa Teórica	Massa Experimental	Erro
4 (CDG 1)	534,2885	534,2757	-23 ppm
4 (CDG 2)	534,2885	534,2835	-9,4 ppm
5 (Controle)	895,4621	895,4617	-0,4 ppm

5 (CDG 1)	895,4621	895,4615	-0,7 ppm
5 (CDG 2)	895,4621	895,4638	1,9 ppm
5 (CDG 3)	895,4621	895,4640	2,1 ppm
6 (CDG 3)	708,3777	708,4098	45 ppm
9 (Controle)	937,7258	937,7262	0,4 ppm

Os cromatogramas de íons extraídos (XICs) foram obtidos para cada estrutura assinalada pelo software GRITS e confirmados no espectrômetro de massa (Figura 23). Como algumas estruturas se repetiram em alguns pacientes, esses espectros foram colocados ao final deste trabalho na seção de anexos. Foram detectadas as estruturas antígeno T  $[M+Na]^+ = 534,2757$  Da (erro = -23 ppm), Figura 23a (XIC e MS da estrutura 534 do paciente CDG 1), antígeno T monosialilado T  $[M+Na]^+ = 895,4617$  Da (erro = -0,4 ppm), Figura 23b (XIC e MS da estrutura 895 do paciente controle), O-glicano de T  $[M+Na]^+ = 708,4098$  Da (erro = 45 ppm), Figura 23c (XIC e MS da estrutura 708 do paciente CDG 3), e antígeno T monosialilado deuterado T  $[M+Na]^+ = 937,7262$  Da (erro = 0,4 ppm), Figura 23d (XIC e MS da estrutura 937 do paciente controle). Abaixo, além de apresentar o XIC, também é apresentado o espectro de MS dos O-glicanos e a estrutura proposta pelo GRITS.







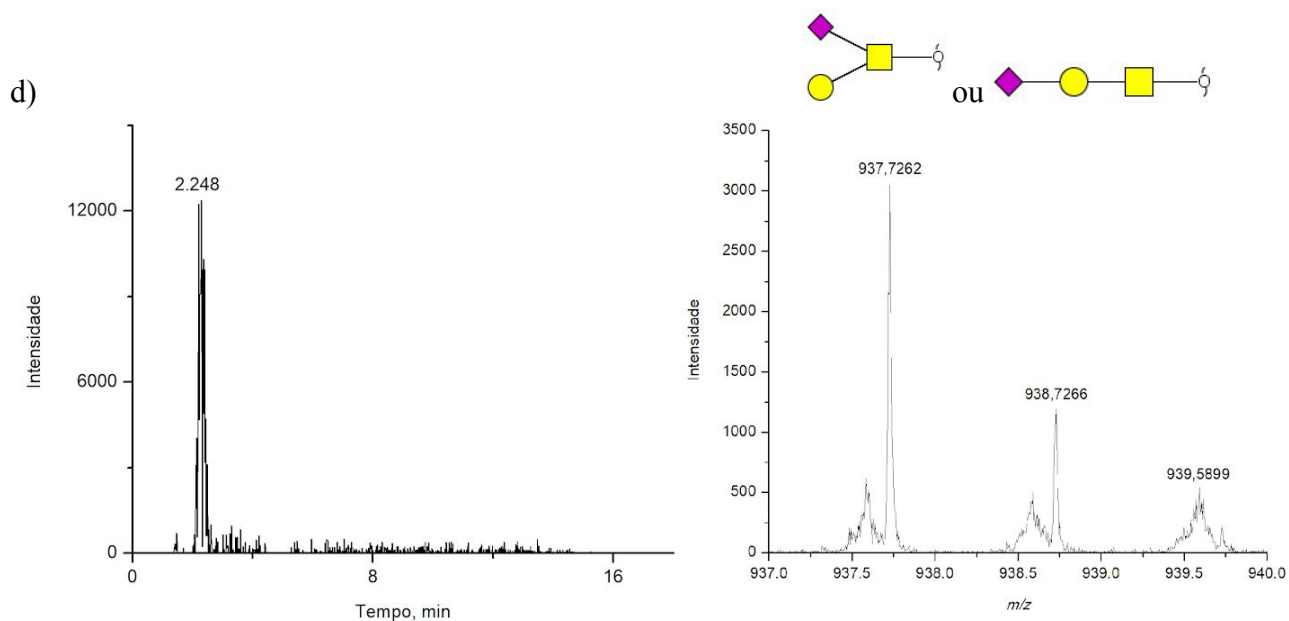


Figura 23: Cromatogramas de íons extraídos (XIC) e espectro de MS para cada estrutura identificada. a)  $m/z = 534$  da amostra “CDG 1”, b)  $m/z = 895$  da amostra “paciente controle”, c)  $m/z = 708$  da amostra “CDG 3” e d)  $m/z = 937$  da amostra “paciente controle”. Os outros XIC e espectros podem ser encontrados na seção de anexos. Legenda: ● Galactose (Gal), ◆ Ácido siálico (NeuAc), ■ *N*-acetilgalactosamina (GalNAc).

A designação da estrutura que dá origem a cada espectro obtido não pode ser realizada apenas pela análise da massa acurada. Assim, torna-se importante a análise dos espectros de fragmentação de cada molécula, ou seja, os espectros de MS/MS obtidos pelo método IDA. Nestes novos espectros obtidos, tem-se informações de íons característicos da fragmentação do íon precursor. Dessa forma, o estudo de cada um dos espectros de MS/MS obtidos possibilitou a designação correta das estruturas presentes nas amostras analisadas. Abaixo é apresentado o espectro de MS/MS da estrutura 4 da amostra CDG 1. O glicano em questão é a estrutura chamada de antígeno T, fazendo a comparação com o trabalho de XIA et al, 2013.

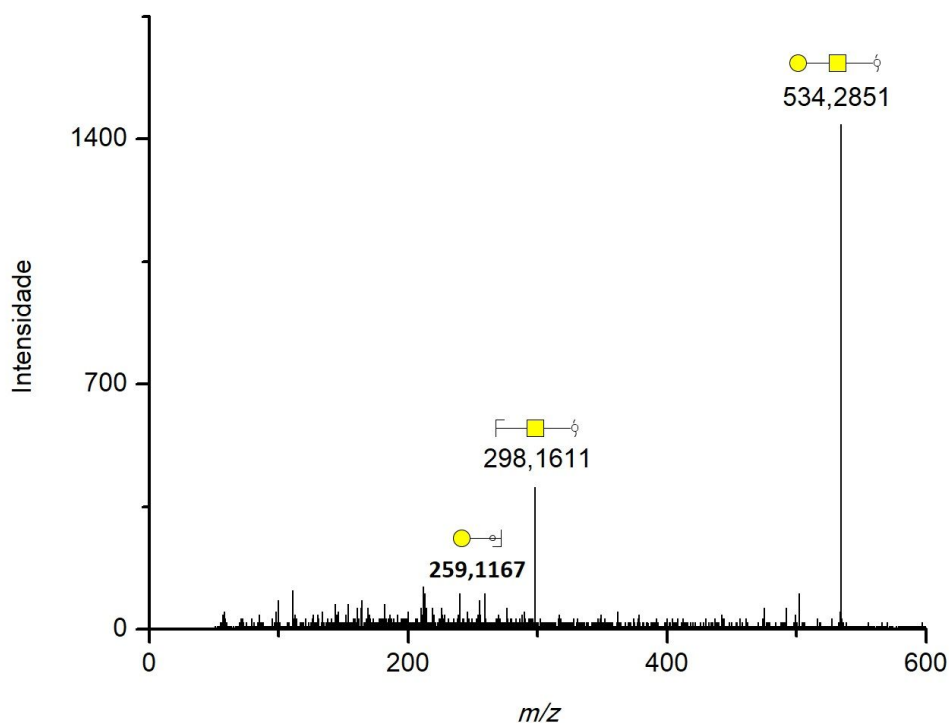


Figura 24: Fragmentação do íon  $m/z$  534 da amostra CDG 1, com a apresentação dos fragmentos acima de cada pico identificado pelo espectrômetro de massa. Legenda: ● Galactose (Gal), ■ *N*-acetilgalactosamina (GalNAc).

A fragmentação de cada estrutura foi avaliada com o auxílio do software GlycoWorkbench, que ao colocar a estrutura precursora proposta pelo GRITS, apresenta os fragmentos possíveis, utilizando a nomenclatura apresentadas na Figura 19.

Seguindo a Figura 19, o pico de razão  $m/z$  de 298 é um fragmento do tipo Z1, permanecendo a carga junto ao fragmento de GalNAc de massa igual a 245 e o restante sendo devido ao íon de sódio e aos átomos presentes na ligação glicosídica, incluindo o oxigênio.

O íon  $m/z$  259 é do tipo C1, o qual mantém a carga no resíduo de Gal. Essa massa de 259 é devido ao resíduo de Gal, adicionado a massa do íon de sódio,  $CH_2$  e aos 2 hidrogênios terminais que permanecem nessa estrutura.

O próximo espectro de fragmentação a ser analisado foi obtido a partir do precursor  $m/z$  895 da amostra do paciente controle (Figura 25). A próxima figura apresenta esse espectro com seus picos assinalados e as estruturas determinadas com auxílio do GlycoWorkbench.

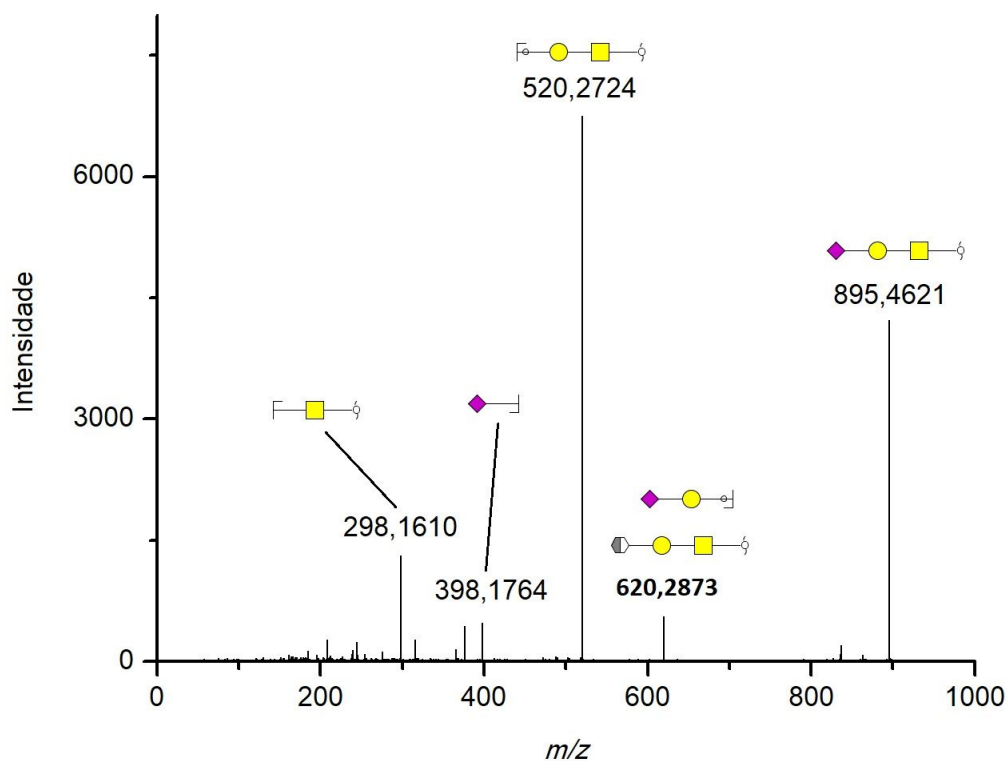


Figura 25: Fragmentação do íon  $m/z$  895 da amostra do paciente controle, com a apresentação dos fragmentos acima de cada pico identificado pelo espectrômetro de massa.

Legenda: ● Galactose (Gal), ◆ Ácido siálico (NeuAc), ■ *N*-acetilgalactosamina (GalNAc).

O espectro de MS/MS do íon  $m/z$  895 pode ser proveniente de dois isômeros de constituição, como pode ser visto na Figura 23b. A estrutura do íon precursor é a apresentada no espectro no pico de 895 e será discutida abaixo. Na Figura 26, são apresentados os fragmentos característicos desses isômeros.

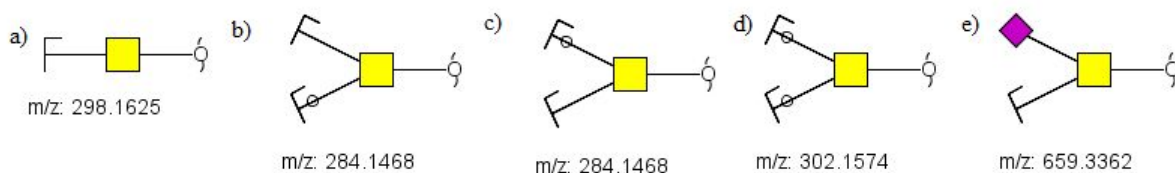


Figura 26: Fragmentos característicos do O-glicano de  $m/z = 895$ . A figura em “a” é característica para o mesmo com estrutura linear e os outros para a estrutura ramificada. ◆ Ácido siálico (NeuAc), ■ *N*-acetilgalactosamina (GalNAc).

A estrutura do íon precursor pode ser confirmada a partir das diferenças entre as fragmentações da estrutura ramificada e da linear. Observando a Figura 26a, o íon de  $m/z$  298 é resultado de uma fragmentação única para o glicano linear, pois na estrutura remanescente (GalNAc) há apenas um resíduo de ligação. Se a estrutura do glicano fosse ramificada, sua

topologia permitiria apenas os fragmentos apresentados nas Figuras 26b, 26c e 26d, nas quais, o grupo GalNAc apresenta dois resíduos de ligação oriundos das duas ramificações. Além disso, o íon característico do O-glicano ramificado é a presença de um pico em 659, que é o fragmento originado pela saída do grupo Gal, sendo o resíduo remanescente, apresentado na Figura 26e. Então, o glicano em questão é o antígeno ST (estrutura core 1 monosialilada), utilizando-se o trabalho do XIA et al 2013 como base.

A próxima estrutura a ser estudada é o glicano perdeuterado de  $m/z = 937$ . Essa estrutura segue as mesmas interpretações da estrutura 895, pois as suas estruturas são essencialmente as mesmas, mudando apenas a massa devido a metilação por  $I-CD_3$ . A estrutura de 937 é deuterada, possuindo todos os hidrogênios de metilações deuterados, explicando-se assim a massa maior. Abaixo é apresentado o espectro da estrutura 937, como pode ser visto, o espectro é aproximadamente o mesmo.

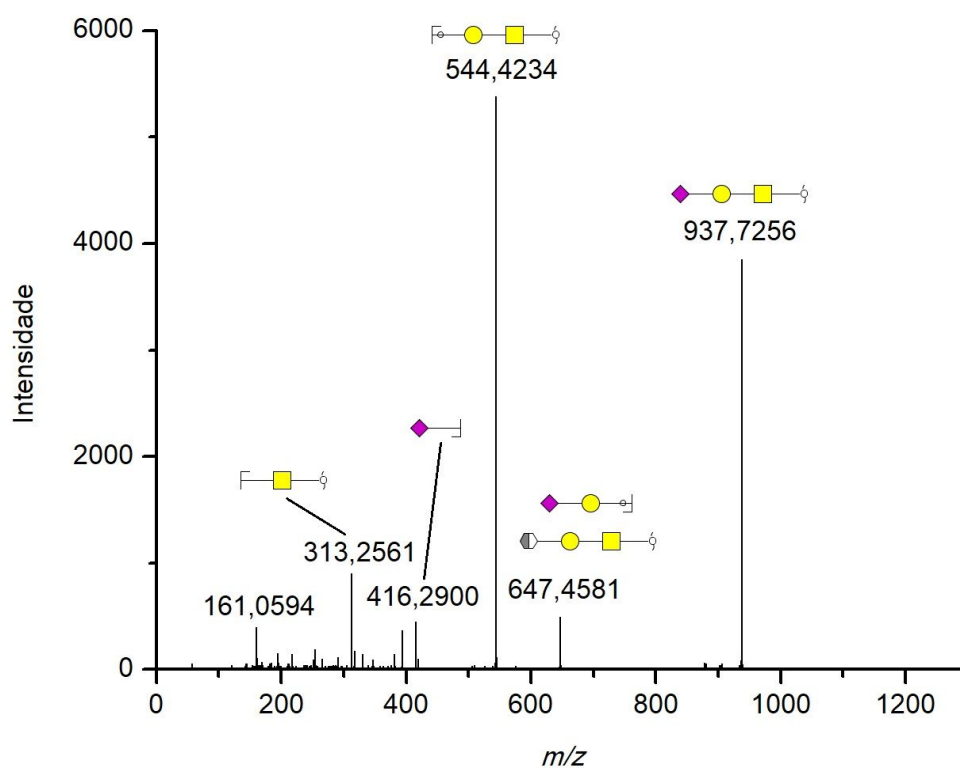


Figura 27: Fragmentação do íon  $m/z$  937 da amostra do controle, com a apresentação dos fragmentos acima de cada pico identificado pelo espectrômetro de massa.

Como pode ser visto, o posicionamento dos picos e a designação das estruturas são as mesmas, mudando-se apenas o valor da  $m/z$ , sendo assim, as interpretações feitas para o 895 sobre a estrutura ser ramificada ou não servem para a interpretação desse espectro.

O próximo espectro a ser estudado foi da estrutura de  $m/z = 708$ . As estruturas possíveis designadas pelo GRITS não são compatíveis com o espectro, como será visto abaixo.

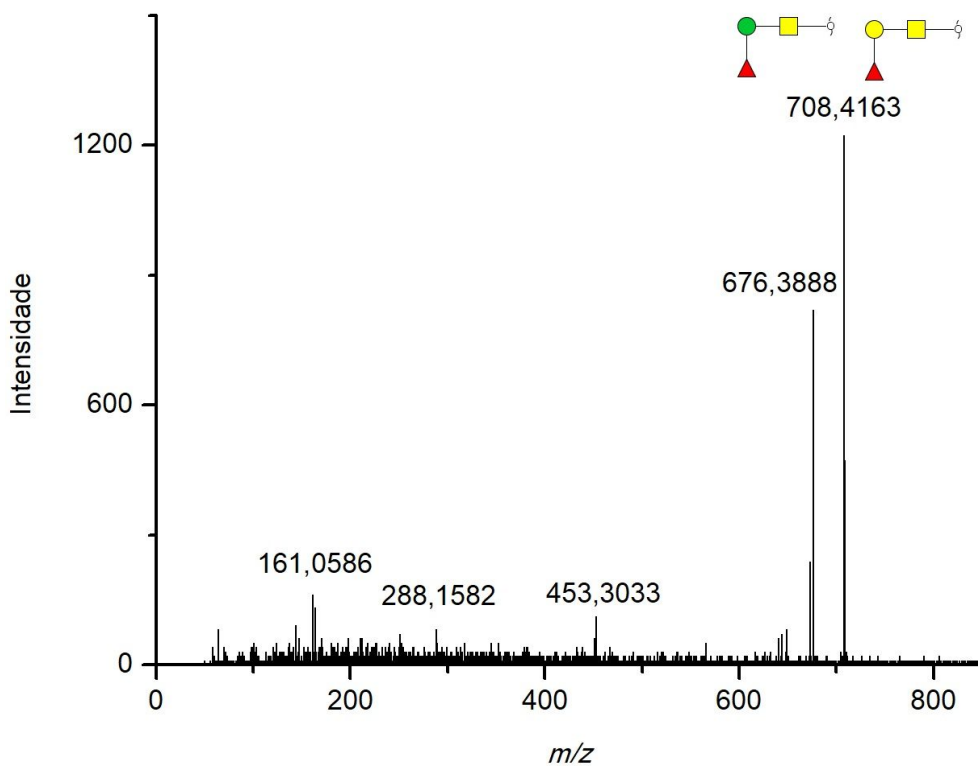


Figura 28: Fragmentação do íon  $m/z$  708 da amostra CDG 3, com a apresentação dos fragmentos acima de cada pico identificado pelo espectrômetro de massa. Legenda: ● Manose (Man), ● Galactose (Gal), ► Fucose (Fuc), ■ N-acetilgalactosamina (GalNAc).

Utilizando as estruturas designadas pelo GRITS no GlycoWorkbench, percebeu-se que o espectro não é compatível com a estrutura assinalada pelo software. Dessa forma, a estrutura proposta pelo GRITS não foi confirmada pelo espectro de MS/MS.

Os espectros dos glicanos encontrados nos outros pacientes não apresentaram alterações, concluindo assim que a estrutura do íon de  $m/z$  895 encontrado em todos os pacientes tem a topologia linear. Sendo assim, nenhuma alteração entre o controle e os pacientes doentes foi apresentada na estrutura do íon 895.

O íon 534 estava presente apenas nos pacientes CDG 1 e 2, sendo que os pacientes CDG 2 e 3 que apresentaram o mesmo diagnóstico para o mesmo tipo de CDG, sendo assim, era esperado que a maioria dos glicanos encontrados no CDG 2 fossem encontrados no 3. Além disso, este mesmo íon estava ausente no paciente controle, o que é incomum, considerando que a estrutura é um dos íons majoritários encontrados em pacientes saudáveis (YABU 2014).

Considerando isso não foram apresentadas alterações qualitativas consistentes entre o controle e os doentes, o que impede o desenvolvimento de um método qualitativo capaz de gerar um diagnóstico para pacientes que apresentam CDG. Além disso, as principais alterações esperadas eram quantitativas, como foi mostrado em vários trabalhos citados anteriormente, no entanto, a necessidade de ajustes no método de extração impossibilitou a

identificação de glicanos deuterados, impedindo assim a análise quantitativa por SIL, que permitiria a comparação com alterações citadas na literatura e a descoberta de novas.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho identificou alguns glicanos reportados na literatura. Embora nem todos os glicanos majoritários (YABU, 2014) tenham sido encontrados, dois O-glicanos encontrados em vários trabalhos estavam presentes, os quais são chamados de antígeno T ( $m/z = 534$ ) e antígeno ST ( $m/z = 895$ ).

A abordagem qualitativa não apresentou resultados consistentes acerca da diferença dos glicanos presentes em pacientes sadios e doentes e a análise quantitativa proposta não foi realizada devido a necessidade de ajustes no processo de extração que sejam capazes de permitir a identificação de O-glicanos deuterados com maior clareza e homogeneidade, tornando a análise quantitativa uma das perspectivas futuras. Sendo assim, não foi possível a realização de um método capaz de identificar as principais alterações presentes em pacientes acometidos por CDG do tipo II.

Embora parte dos objetivos propostos não tenham sido realizados, o trabalho apresentou um caráter preliminar e exploratório, melhorando a compreensão do grupo acerca das dificuldades nas análises de O-glicanos. Foi possível realizar a análise de cromatogramas adquiridos por espectrometria de massa, além da análise dos espectros de MS/MS. Além disso, a estrutura de  $m/z = 937$  permitiu o estudo de uma das estruturas deuteradas, concluindo-se que mesmo com possíveis erros no processo de extração, foi possível encontrar uma estrutura deuterada características no pool de plasma humano.

Nessa perspectiva, novos experimentos são necessários para o aprimoramento dos métodos de extração possibilitando assim que as abordagens qualitativas e quantitativas possam ser realizadas de forma bem-sucedida, possibilitando assim que a relação entre o desenvolvimento de CDGs e os distúrbios nas vias de glicosilação possam ser melhor compreendidas.



## Anexos

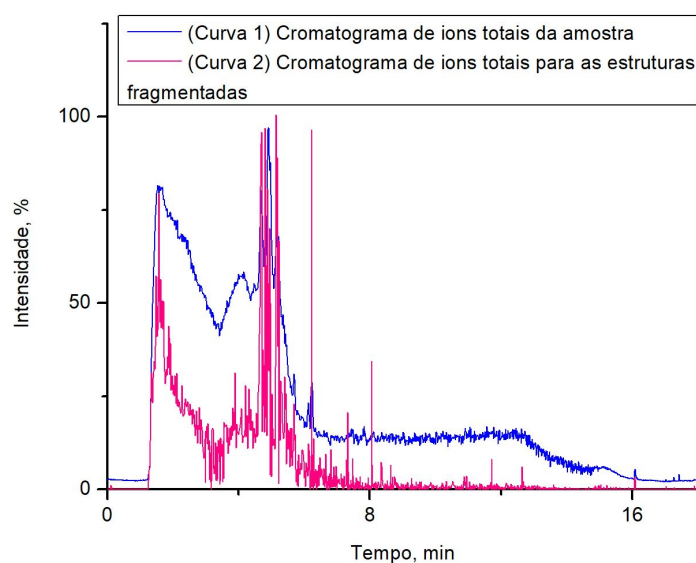
● Galactose (Gal)	★ Xilose (Xyl)
■ <i>N</i> -Acetilgalactosamina (GalNAc)	◆ Ácido <i>N</i> -Acetilneuramínico (Neu5Ac)
◻ Galactosamina (GalN)	◊ Ácido <i>N</i> -glicolilneuramínico (Neu5Gc)
● Glicose (Glc)	◊ 2-Keto-3-deoxynononic acid (Kdn)*
■ <i>N</i> -Acetilglicosamina (GlcNAc)	▲ Fucose (Fuc)
◻ Glicosamina (GlcN)	◊ Ácido Glicurônico (GlcA)
● Manose (Man)	◊ Ácido Urônico (IdoA)
■ <i>N</i> -Acetilmanosamina (ManNAc)	◊ Ácido Galacturônico (GalA)
◻ Manosamina (ManN)	◊ Mannuronic acid (ManA)*

Para outros monossacarídeos,  
usa-se uma letra dentro de um símbolo para especificar ◻ ◻

Códigos e abreviações criadas para convencionar uma universalização e simplificação da representação estrutural das estruturas dos carboidratos. Legendas retiradas do livro do VARKI et al, 2009.

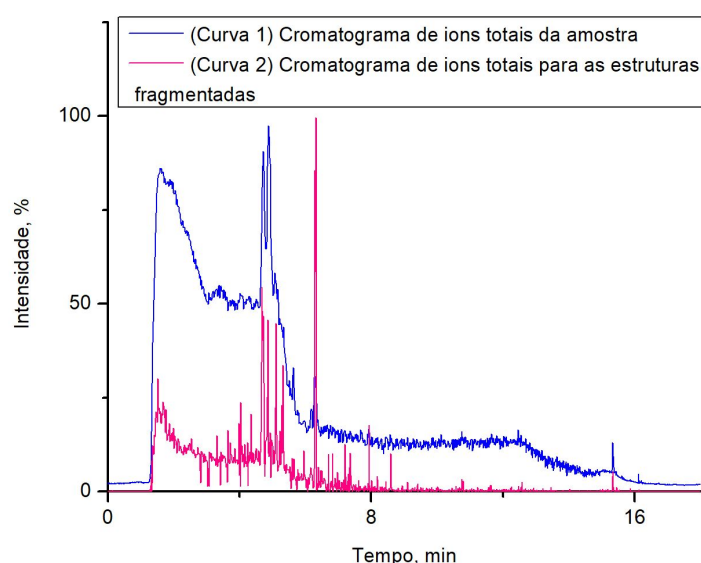
\* - Não foram encontrados os nomes em português para essas estruturas.

### Cromatograma de íons totais (CDG 1)



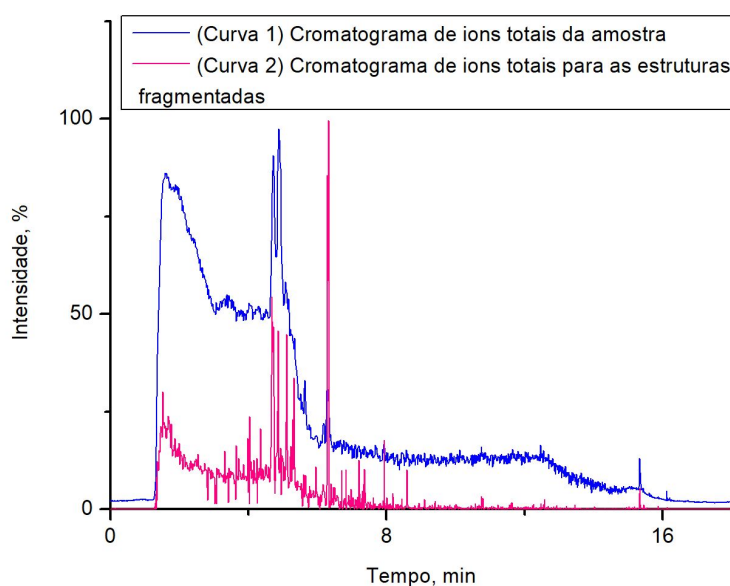
Cromatograma de íons totais para a amostra do paciente CDG 1. As curvas foram normalizadas em relação ao valor máximo de intensidade de cada uma. A curva 1 teve um valor máximo de  $1,5 \times 10^8$  e a curva 2 um valor máximo de  $8,5 \times 10^6$ . Com tempos de retenção entre 1,598 min a 6,330 min para a curva 1 e 1,558 min a 6,319 min para a curva 2.

### Cromatograma de íons totais (CDG 2)



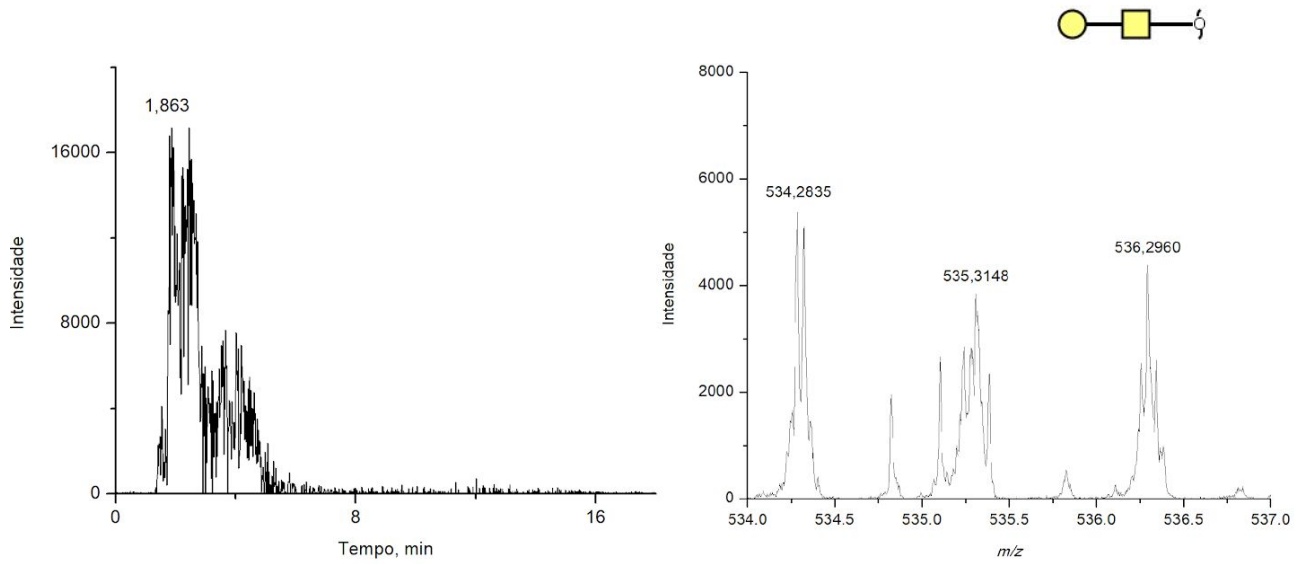
Cromatograma de íons totais para a amostra do paciente CDG 2. As curvas foram normalizadas em relação ao valor máximo de intensidade de cada uma. A curva 1 teve um valor máximo de  $1,5 \times 10^8$  e a curva 2 um valor máximo de  $5 \times 10^6$ . Com tempos de retenção entre 1,631 min a 6,235 min para a curva 1 e 1,563 min a 6,227 min para a curva 2.

### Cromatograma de íons totais (CDG 3)

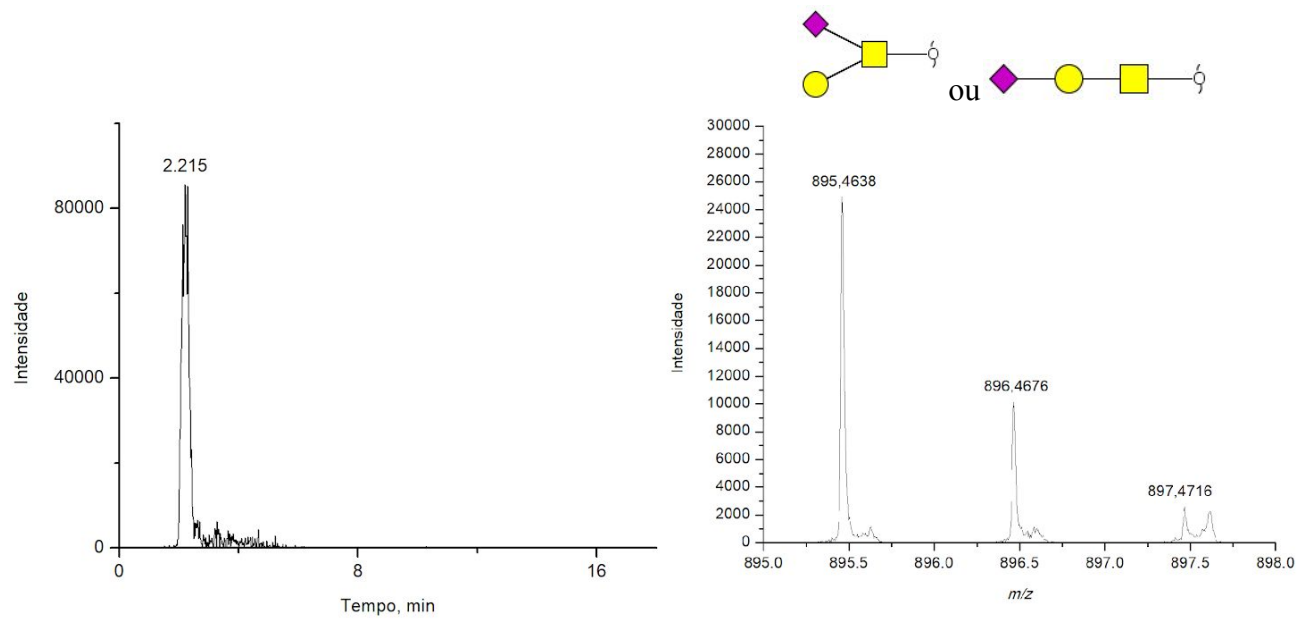


Cromatograma de íons totais para a amostra do paciente CDG 3. As curvas foram normalizadas em relação ao valor máximo de intensidade de cada uma. A curva 1 teve um valor máximo de  $1,6 \times 10^8$  e a curva 2 um valor máximo de  $9,2 \times 10^6$ . Com tempos de retenção entre 1,634 min a 6,299 min para a curva 1 e 1,603 min a 6,302 min para a curva 2.

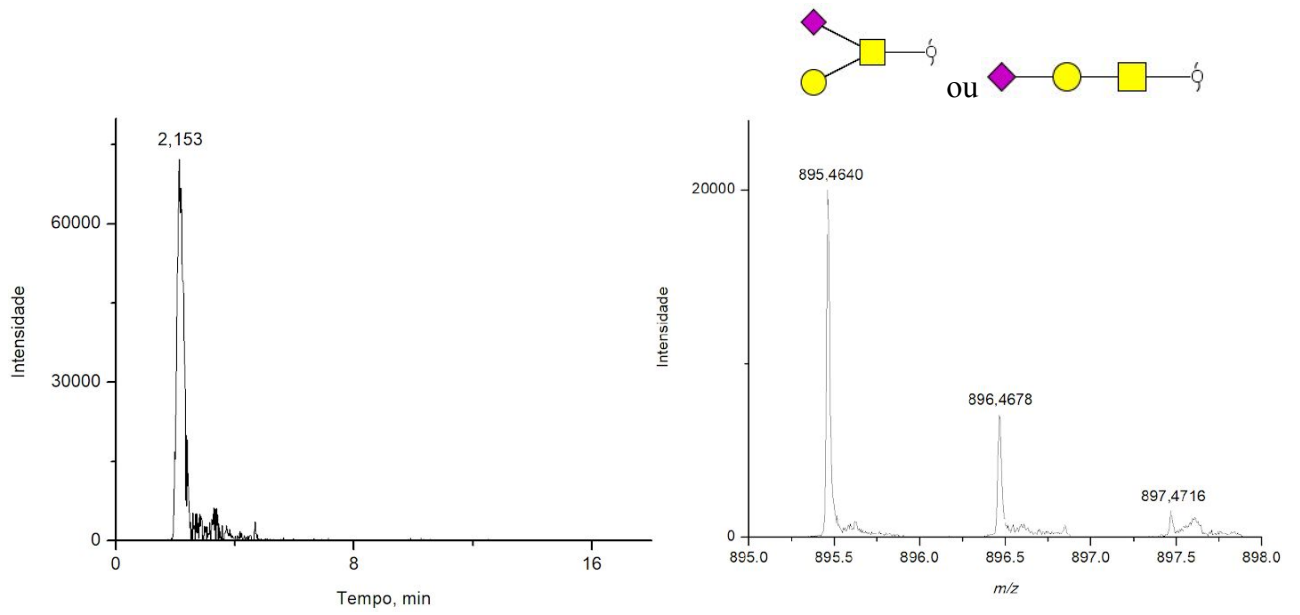
**Cromatograma de íons extraídos e espectro ( $m/z = 534$  do paciente CDG 2)**



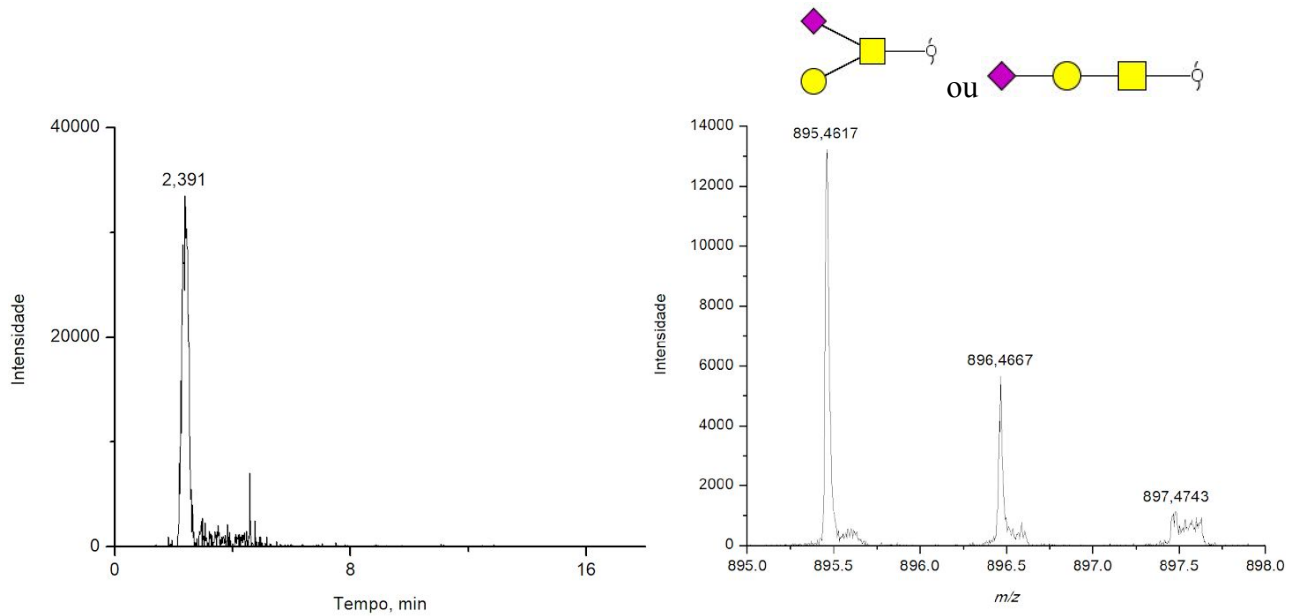
**Cromatograma de íons extraídos e espectro ( $m/z = 895$  do paciente CDG 2)**



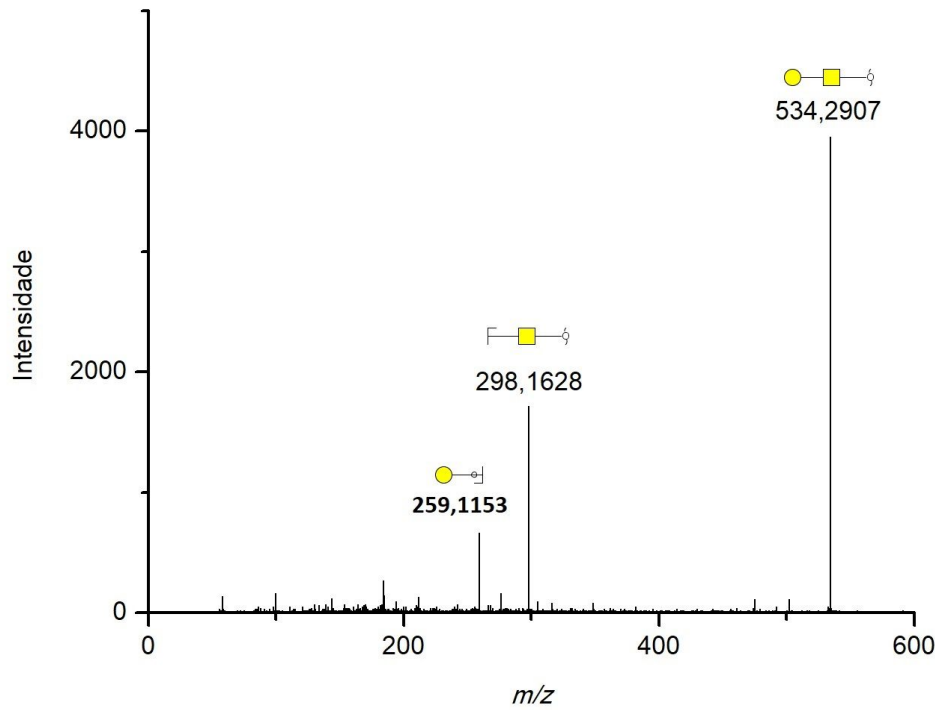
### Cromatograma de íons extraídos e espectro ( $m/z = 895$ do paciente CDG 3)



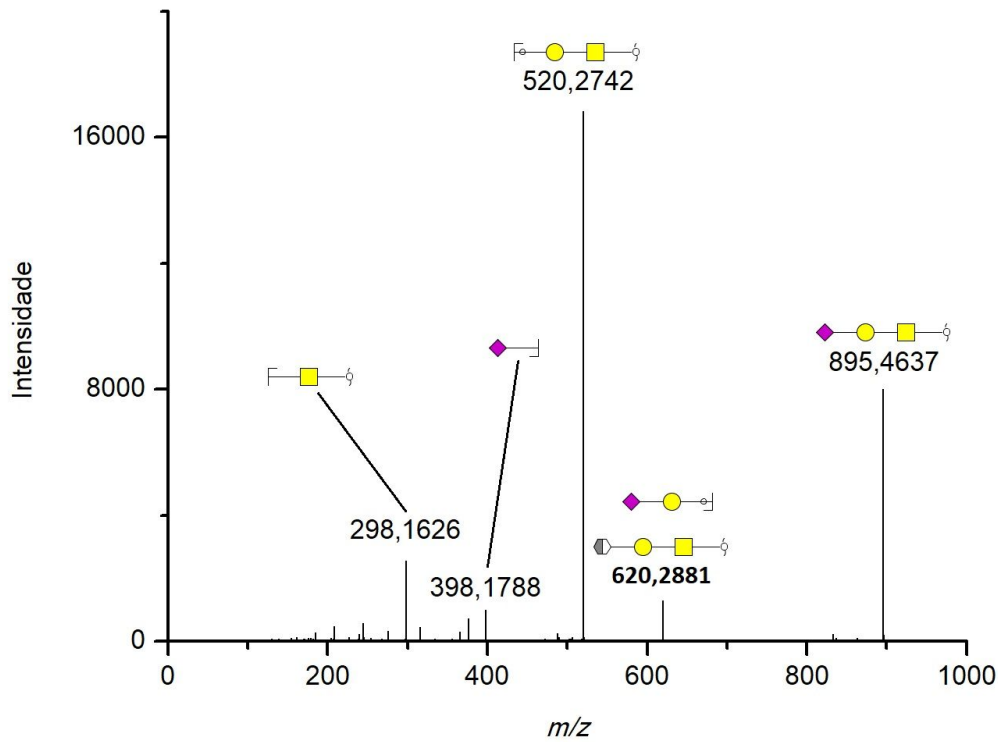
### Cromatograma de íons extraídos ( $m/z = 895$ do paciente controle)



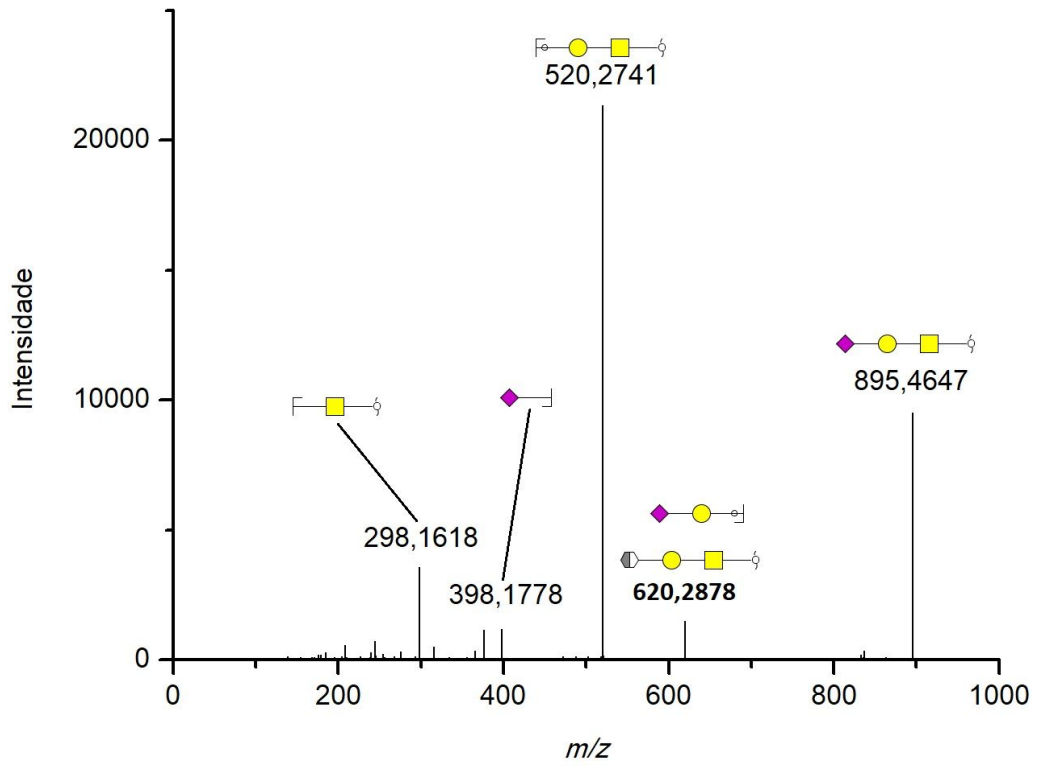
**Espectro de MS/MS ( $m/z = 534$  do paciente CDG 2)**



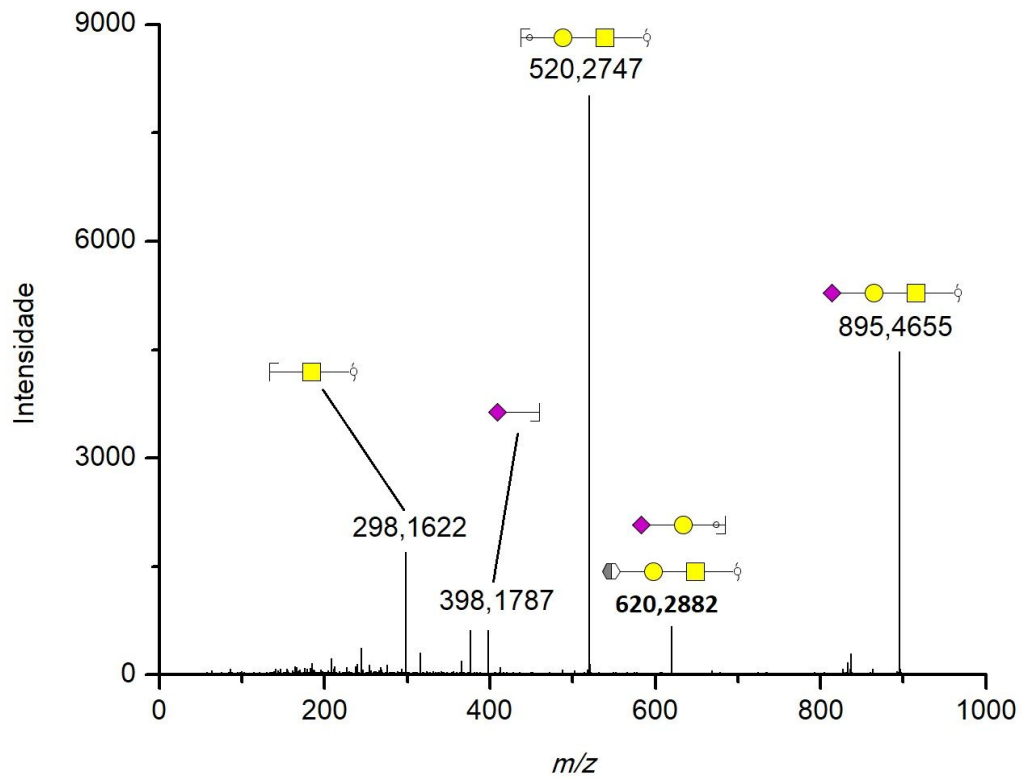
**Espectro de MS/MS ( $m/z = 895$  do paciente CDG 1)**



### Espectro de MS/MS ( $m/z = 895$ do paciente CDG 2)



### Espectro de MS/MS ( $m/z = 895$ do paciente CDG 3)



## Referências Bibliográficas

- Abu Bakar, N., Lefeber, D. J., & Van Scherpenzeel, M. (2018). Clinical glycomics for the diagnosis of congenital disorders of glycosylation, 499–513.
- Albahri, Z., Marklová, E., Dědek, P., Hojdíková, H., Fiedler, Z., Lefeber, D., ... Wopereis, S. (2006). CDG: A new case of a combined defect in the biosynthesis of N- and O-glycans. **European Journal of Pediatrics**, 165(3), 203–204.
- Barbosa, E. A., Fontes, N. do C., Santos, S. C. L., Lefeber, D. J., Bloch, C., Brum, J. M., & Brand, G. D. (2019). Relative quantification of plasma N-glycans in type II congenital disorder of glycosylation patients by mass spectrometry. **Clinica Chimica Acta**, 492(November 2018), 102–113.
- Barone, R., Aiello, C., Race, V., Morava, E., Foulquier, F., Riemersma, M., ... Lefeber, D. J. (2012). DPM2-CDG: A muscular dystrophy-dystroglycanopathy syndrome with severe epilepsy. **Annals of Neurology**, 72(4), 550–558.
- Bertozi, C. R., & Kiessling, L. L. (2001). Chemical glycobiology. **Science**, 291(5512), 2357–2364.
- Ceroni, A., Maass, K., Geyer, H., Geyer, R., Dell, A., & Haslam, S. M. (2008). GlycoWorkbench: A tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. **Journal of Proteome Research**, 7(4), 1650–1659.
- Dwek, R. A. (1996). Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. **Chemical Reviews**, 96(2), 683–720.
- Faid, V., Chirat, F., Seta, N., Foulquier, F., & Morelle, W. (2007). A rapid mass spectrometric strategy for the characterization of N- and O-glycan chains in the diagnosis of defects in glycan biosynthesis. **Proteomics**, 7(11), 1800–1813.
- FONTES, Nilza do Carmo. Caracterização das estruturas de N-glicanos de glicoproteínas plasmáticas por espectrometria de massa em distúrbios congênitos de glicosilação tipo II. 2016. 98 f., il. **Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)—Universidade de Brasília, Brasília**, 2016.
- Freeze, H. H., & Aebi, M. (2005). Altered glycan structures: The molecular basis of congenital disorders of glycosylation. **Current Opinion in Structural Biology**, 15(5), 490–498.

Freeze, H. H., Chong, J. X., Bamshad, M. J., & Ng, B. G. (2014). Solving glycosylation disorders: Fundamental approaches reveal complicated pathways. **American Journal of Human Genetics**, 94(2), 161–175.

Gross, Jürgen H., **Mass Spectrometry A Textbook**. 3rd edition. Springer International Publishing; 2017.

Huang, L. J., Lin, J. H., Tsai, J. H., Chu, Y. Y., Chen, Y. W., Chen, S. L., & Chen, S. H. (2014). Identification of protein O-glycosylation site and corresponding glycans using liquid chromatography-tandem mass spectrometry via mapping accurate mass and retention time shift. **Journal of Chromatography A**, 1371, 136–145.

Jaeken, J. (2010). Congenital disorders of glycosylation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1214(1), 190–198.

Kitteringham, N. R., Jenkins, R. E., Lane, C. S., Elliott, V. L., & Park, B. K. (2009). Multiple reaction monitoring for quantitative biomarker analysis in proteomics and metabolomics. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 877(13), 1229–1239.

Lan, Y., Hao, C., Zeng, X., He, Y., Zeng, P., Guo, Z., & Zhang, L. (2016). Serum glycoprotein-derived N- and O-linked glycans as cancer biomarkers. **American Journal of Cancer Research**, 6(11), 2390–2415.

Lebrilla, C. B., & An, H. J. (2009). The prospects of glycanbiomarkers for the diagnosis of diseases. **Molecular BioSystems**, 5(1), 17–20.

Morelle, W., Canis, K., Chirat, F., Faid, V., & Michalski, J. C. (2006). The use of mass spectrometry for the proteomic analysis of glycosylation. **Proteomics**, 6(14), 3993–4015.

Morelle, W., & Michalski, J. C. (2007). Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. **Nature Protocols**, 2(7), 1585–1602.

Nelson, David L. 1942-, Albert L Lehninger, and Michael M Cox. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6th ed. New York: W.H. Freeman, 2013.

Nilsson, B. (1994). Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. **Molecular Biotechnology**, 2(3), 243–280.



Ruhaak, L. R., Zauner, G., Huhn, C., Bruggink, C., Deelder, A. M., & Wuhrer, M. (2010). Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 397(8), 3457–3481.

Scott, K., Gadomski, T., Kozicz, T., & Morava, E. (2014). Congenital disorders of glycosylation: New defects and still counting. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 37(4), 609–617.

Smith, R. D., & Lupashin, V. V. (2008). Role of the conserved oligomeric Golgi (COG) complex in protein glycosylation. **Carbohydrate Research**, 343(12), 2024–2031.

Van Scherpenzeel, M., Willems, E., & Lefeber, D. J. (2016). Clinical diagnostics and therapy monitoring in the congenital disorders of glycosylation. **Glycoconjugate Journal**, 33(3), 345–358.

Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. **Essentials of Glycobiology**. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1908/>

Xia, B., Zhang, W., Li, X., Jiang, R., Harper, T., Liu, R., ... He, M. (2013). Serum N-glycan and O-glycan analysis by mass spectrometry for diagnosis of congenital disorders of glycosylation. **Analytical Biochemistry**, 442(2), 178–185.

Wada, Y. (2016). Mass spectrometry of transferrin and apolipoprotein C-III for diagnosis and screening of congenital disorder of glycosylation. **Glycoconjugate Journal**, 33(3), 297–307.

Wada, Yoshinao (2006); Mass Spectrometry for congenital disorders of glycosylation, CDG. **Journal of Chromatography B**; 838 (1), 3-8.

Weatherly, D Brent, Arpinar, F Sena, Porterfield, Melody, Tiemeyer, Michael, York, William S, Ranzinger, Rene. GRITS Toolbox—a freely available software for processing, annotating and archiving glycomics mass spectrometry data, **Glycobiology**, Volume 29, Issue 6, June 2019, Pages 452–460.

Wopereis, S., Grünewald, S., Morava, É., Penzien, J. M., Briones, P., García-Silva, M. T., ... Wevers, R. A. (2003). Apolipoprotein C-III Isofocusing in the Diagnosis of Genetic Defects in O-Glycan Biosynthesis. **Clinical Chemistry**, 49(11), 1839–1845.

Yabu, M., Korekane, H., & Miyamoto, Y. (2014). Precise structural analysis of O-linked oligosaccharides in human serum. **Glycobiology**, 24(6), 542–553.