

## **5. Conclusão**

## 5. Conclusão

No âmbito deste trabalho, foram descritos dois métodos cromatográficos, a cromatografia líquida de alta eficiência com detector “diode-array” (HPLC-DAD) e a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), para a análise simultânea de diversos esteróis em amostras biológicas. O objectivo principal da optimização e implementação destes métodos foi a sua aplicação no diagnóstico bioquímico pré-natal de défices da via de biossíntese de colesterol.

O método HPLC-DAD optimizado, embora possa ser aplicado à avaliação da actividade enzimática da 7-dehidrocolesterol reductase em tecidos biológicos, como descrito no Anexo A, não se mostrou adequado à separação, identificação e quantificação dos diversos esteróis em amostras complexas. Para tal e como alternativa, recorreu-se à optimização de um método de GC-MS, com base na bibliografia disponível e no método já em uso na UBC do CGMJM para a quantificação do 7-DHC, uma vez que, este é um dos métodos mais utilizados pela literatura na quantificação de esteróis em amostras biológicas.

O método GC-MS implementado, operando num modo de ião selectivo (SIM), mostrou ser linear, ter uma boa repetibilidade e reprodutibilidade, ter boas taxas de recuperação e boa sensibilidade, pois permitiu limites de detecção e quantificação muito baixos, para todos os esteróis em estudo. O uso do modo SIM aumenta a especificidade da análise, minimizando o risco de quantificações erradas para os esteróis, devido a co-eluições com impurezas. Desta forma, o método GC-MS é sensível e preciso, permitindo a identificação, separação e quantificação do colesterol, 7-DHC, desmosterol, latosterol e  $\beta$ -sitosterol nos fluídos biológicos. O desenvolvimento do método permitiu diminuir em cerca de 60% o tempo de análise de cada amostra, quando comparado com a metodologia previamente utilizada na UBC do CGMJM.

Através do método GC-MS, foram aferidos valores de referência para o colesterol, 7-DHC, desmosterol, latosterol e  $\beta$ -sitosterol, em amostras de líquidos amnióticos de fetos sem patologia e em função da idade gestacional. Verificou-se que (1) com o avanço da gravidez, a concentração de colesterol, respectivos precursores e  $\beta$ -sitosterol aumenta, (2) que existe uma relação de proporcionalidade directa entre a concentração de todos os esteróis e o aumento da

gestação, (3) que existe uma crescente necessidade de colesterol para o desenvolvimento fetal e um aumento da via de biossíntese de colesterol, com conseqüente aumento dos precursores de colesterol, à medida que aumenta o número de semanas de gestação.

O teste de hipóteses – teste das medianas, corrobora a existência de uma relação de proporcionalidade directa e de dependência entre a concentração de esterol e a semana de gestação, o que está relacionado com a crescente necessidade de colesterol para o desenvolvimento fetal.

Os valores de referência determinados para cada esterol no LA, nas diferentes semanas de gestação, são úteis para a validação dos resultados no diagnóstico bioquímico pré-natal de erros inatos da biossíntese de colesterol, principalmente para o diagnóstico de SLO, podendo também aplicar-se a situações de Latosterolose e Desmosterolose.

A análise por GC-MS de uma amostra LA de um feto com SLO, permitiu verificar que a concentração de colesterol era inferior à dos valores de referência definidos e, que as concentrações de 7-DHC, latosterol e  $\beta$ -sitosterol são maiores no feto SLO do que nos fetos sem patologia. O mesmo aconteceu em relação à razão esterol/esteróis totais da via de biossíntese de colesterol. Como a síndrome SLO se caracteriza bioquimicamente por níveis baixos de colesterol e níveis elevados de 7-DHC nas amostras biológicas, constatou-se que este método permite o diagnóstico de casos de síndrome SLO.

Em conclusão, o método GC-MS implementado permitiu estabelecer valores de referência para os esteróis no LA e é aplicável no diagnóstico bioquímico pré-natal de défices da via de biossíntese de colesterol.