

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

**ERROS INATOS DO METABOLISMO DA FRUTOSE: ANÁLISE
GENÉTICA DE PACIENTES BRASILEIROS COM INTOLERÂNCIA
HEREDITÁRIA À FRUTOSE E DEFICIÊNCIA DE FRUTOSE-1,6-BIFOSFATASE**

Franciele Cabral Pinheiro

Porto Alegre

Março, 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

**ERROS INATOS DO METABOLISMO DA FRUTOSE: ANÁLISE
GENÉTICA DE PACIENTES BRASILEIROS COM INTOLERÂNCIA
HEREDITÁRIA À FRUTOSE E DEFICIÊNCIA DE FRUTOSE-1,6-BIFOSFATASE**

Franciele Cabral Pinheiro

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular)

Orientadora: Profa Dra Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Coorientadora: Dra Fernanda Sperb-Ludwig

Porto Alegre
Março de 2020

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Esta tese resulta do desenvolvimento de quatro projetos de pesquisa aprovados pela Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) conforme os pareceres do Comitê de Ética em Pesquisa e Serviço de Gestão em Pesquisa do HCPA, entre os anos de 2016 e 2019 (cartas de aprovação nos Apêndices I ao III).

As análises foram desenvolvidas no laboratório Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences (BRAIN), localizado no Centro de Pesquisa experimental (CPE) do HCPA. Algumas técnicas utilizaram a infraestrutura da Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (Uamp) e do Centro de Terapia Gênica (CTG), localizados no CPE/HCPA, e do Laboratório de Referência para Erros Inatos do Metabolismo do HCPA. Os sequenciamentos de DNA foram realizados de forma terceirizada pela Uamp.

A execução dos projetos e publicações foram financiadas pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do HCPA. O Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM) financiou traduções e auxiliou a participação da aluna em eventos. A aluna, servidora na Universidade Federal do Pampa (Unipampa), desenvolveu a presente tese durante seu afastamento remunerado para qualificação (Portaria nº 673, de 28 de março de 2016 e Portaria nº 795 de 22 de abril de 2019).

*Dedico àqueles que nunca mediram esforços para que eu chegasse onde queria.
Meu Norte, minha âncora, minha força, tudo que sou e faço é porque tenho em
vocês uma direção. Minha família, meu esteio e porto-seguro. Com todo o meu amor.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha orientadora, Dr^a Ida Vanessa Doederlein Schwartz, pela oportunidade de realizar um sonho muito antigo de fazer doutorado no PPGBM. Era uma meta de vida, e ela teve a coragem de selecionar uma desconhecida para desempenhar esse trabalho, muito obrigada!

A minha Co-orientadora Dr^a Fernanda Sperb-Ludwig, pelos apontamentos, ensinamentos e encorajamentos ao longo dessa jornada. Muitíssimo obrigada!

Um agradecimento todo especial ao Elmo, que foi incansável durante todo esse tempo para me auxiliar em tudo que precisei da Coordenação do PPGBM. Ele é o coração desse programa e o alicerce que mantém tudo sob controle.

O meu muito obrigada à Unipampa, campus Itaqui, que permitiu o meu afastamento para a realização desse sonho.

Aos meus colegas de grupo de pesquisa, toda a minha gratidão pelos bons momentos que passamos juntos e pelo apoio quando tudo parecia desmoronar sobre a minha cabeça. Pela torcida e ajuda de todos. Em especial Jurema, não tenho palavras pra agradecer todo o suporte que me deste nesses últimos meses, sempre pronta pra qualquer coisa, muito obrigada!

O doutorado me deu ensinamentos, lições de vida e gana pra saber sempre mais. Mas, além disso, me trouxe pessoas que levarei pra sempre em meu coração. As meninas que compartilhei momentos maravilhosos nesse período: Suélen Basgalupp, Karina Colonetti, Taciane Borsatto e Giovana Weber Hoss. É motivo de grande orgulho pra mim, ser amiga de pessoas de tanto caráter, dedicadas e inteligentíssimas. Obrigada por tudo.

Thaís Ritter, Franciele Cornelli, Juliana Fabris, Josiane Figueiredo, Rosana Nishimura e Giovana Soares, vocês são mais que especiais e, mesmo de longe, estamos e estaremos sempre unidas pelo coração, obrigada a cada uma pela amizade maravilhosa!!!

E por fim, às pessoas mais importantes da minha vida, minha família linda. Já diz a música “é sobre saber que em algum lugar alguém zela por ti”.....é essa certeza que tenho em vocês que me encoraja a desbravar novos horizontes. Obrigada a cada um de vocês por simplesmente existirem na minha vida. E ao meu amor, que resistiu bravamente a esses dias turbulentos no final, em que uma louca tomou posse do meu corpo. A ti que me apoia, encoraja, me cuida e me fortalece, obrigada por estar ao meu lado nesse momento. Hoje, tenho em ti tudo que preciso. Com todo meu amor, obrigada Pedro!!!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
1. RESUMO.....	12
2. ABSTRACT	14
3. CONTEXTUALIZAÇÃO.....	16
4. INTRODUÇÃO	17
4.1. Metabolismo da frutose:	18
4.2. DHGNA: doença associada ao metabolismo da frutose:.....	20
4.3. Erros Inatos do metabolismo da frutose	24
4.3.1. Frutosuria Essencial (FE)	24
4.3.1.1. Aspectos bioquímicos da FE:	25
4.3.1.2. Aspectos moleculares da FE:.....	25
4.3.2. Intolerância hereditária à frutose (IHF).....	26
4.3.2.1 Aldolase B:	26
4.3.2.2. Manifestações clínicas da IHF:.....	27
4.3.2.3. Diagnóstico da IHF:.....	28
4.3.2.4. Aspectos moleculares da IHF:	29
4.3.2.5. Tratamento da IHF:.....	33
4.3.3. Deficiência de frutose-1,6-bifosfatase (DFB)	33
4.3.3.1 Frutose-1,6-bifosfatase:	34
4.3.3.2. Manifestações clínicas da DFB:	35
4.3.3.3. Diagnóstico da DFB:	35
4.3.3.4. Aspectos moleculares da DFB:.....	36

4.3.3.5. Tratamento da DFB:	39
5. JUSTIFICATIVA	41
6. OBJETIVOS	43
6.1 Objetivo Geral	43
6.2. Objetivos específicos	43
7. CAPÍTULOS.....	44
7.1. Capítulo 1: Intolerância hereditária à frutose: distribuição mundial de variantes patogênicas descritas em <i>ALDOB</i> e estimativa da prevalência baseada em bancos de dados genômicos.....	44
7.2. Capítulo 2: A análise genética de pacientes brasileiros com intolerância hereditária à frutose revela alta prevalência das variantes p.Arg60* e p. Asn120Lysfs*32.....	88
7.3. Capítulo 3: The variant p.(Lys204Argfs*72) in fructose-1,6-biphosphatase mutant lacks substrate binding sites.	112
7.4. Capítulo 4: Genetic analysis of patients with fructose-1,6-biphosphatase deficiency	127
7.5. Capítulo 5: Variantes na região C-terminal da frutose-1,6-bifosfatase aumentam a afinidade da enzima pelo inibidor frutose-2,6-bifosfato.	136
8. DISCUSSÃO	150
9. CONCLUSÕES.....	153
10. PERSPECTIVAS.....	157
11. REFERÊNCIAS	158
12. ANEXOS	170
12.1. Anexo 1 – Carta de Aprovação do Projeto no Comitê de Ética em pesquisa, projeto 2017-0450.....	170
12.2. Anexo 2 – Carta de Aprovação do Projeto no Comitê de Ética em pesquisa, projeto 2018-0142.....	172
12.3. Anexo 3 – Carta de Aprovação do Projeto no Comitê de Ética em pesquisa, projeto 2018-0143.....	174

13. APÊNDICES	176
13.1. Apêndice 1 – Ficha de coleta de dados para pacientes com suspeita clínica e/ou diagnóstico de intolerância hereditária à frutose, projeto nº 2017-0450.	176
13.2. Apêndice 2 – Ficha de coleta de dados para pacientes com suspeita clínica e/ou diagnóstico de deficiência de frutose-1,6-bifosfatase, projeto nº 2018-0450.....	179
14. PRODUÇÕES COMPLEMENTARES.....	182
14.1. Inibição de KHK no tratamento de intolerância hereditária à frutose e doença do fígado gorduroso não alcoólica: uma faca de dois gumes.	183

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMP – Adenosina monofosfato
- ATP – Adenosina trifosfato
- CCK – Colecistocinina
- DFB – Deficiência de Frutose-1,6-bifosfatase
- DHA-P – Diidróxiacetona-fosfato
- DHGNA – Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica
- EAE – Ensaio de Atividade Enzimática
- EIM – Erros Inatos do Metabolismo
- EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
- F1,6P ou F1,6P2 – Frutose-1,6-bifosfato
- F1P – Frutose-1-fosfato
- F2,6P2 – Frutose-2,6-bifosfato
- F6P – Frutose-6-fosfato
- FE – Frutosúria Essencial
- GAH – Gliceraldeído
- GAH-3P – Gliceraldeído-3-fosfato
- HGMD – *Human Gene Mutation Database*
- IHF – Intolerância Hereditária à Frutose
- KHK – Cetohecoquinase
- NGS – *Next Generation Sequencing* ou Sequenciamento de Nova Geração
- Pb – Pares de bases
- Pi – Fósforo inorgânico
- Rab11a – Proteína relacionada à Ras11 cérebro-específica
- RE – Retículo Endoplasmático
- TLR4 – *Toll Like Receptor 4* ou Receptor do tipo Toll 4
- TTF – Teste de Tolerância à Frutose
- VLDL – *Very Low Density Protein* ou Lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1: Metabolismo da frutose e rotas metabólicas relacionadas no hepatócito.... 20

Figura 2: Aspectos moleculares envolvidos na fisiopatologia da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)..... 22

Capítulo 1

Figura 1: Gene *ALDOB*, mRNA e estrutura da proteína. 86

**Figura 2: Distribuição mundial das variantes patogênicas mais comuns em *ALDOB*.
..... 87**

Capítulo 2

Figura 1: Algoritmo para o diagnóstico genético de IHF em pacientes brasileiros. A análise inicia pela busca das variantes mais frequentes na população brasileira 110

Figura 2: Perfil alélico de pacientes brasileiros com IHF..... 111

Capítulo 3

**Figure 1: Genetic and *in silico* analyses of the p.(Lys204Argfs*72) variant in *FBP1*.
..... 125**

Figure 2: 3D modeling of fructose-1,6-biphosphatase..... 126

Figure 3: Structure of fructose-1,6-biphosphatase tetramer..... 126

Capítulo 5

Figura 1: Análises *in vitro* e *in silico* das variantes p.Arg158Trp, p.Gly320Arg e p.Leu329Pro da frutose-1,6-bifosfatase..... 149

LISTA DE TABELAS

Introdução

Tabela 1: Erros inatos do metabolismo da frutose.....	24
Tabela 2 – Variantes patogênicas descritas em <i>ALDOB</i>	30
Tabela 3: Variantes patogênicas descritas em <i>FBP1</i>	37

Capítulo 1

Tabela 1 – Distribuição mundial das variantes patogênicas mais comuns em <i>ALDOB</i> descritas na literatura,	81
Tabela 2 – Frequências de variantes patogênicas de <i>ALDOB</i> descritas na literatura com distribuição restrita.	83
Tabela 3 – Frequência de heterozigotos e prevalência estimada de Intolerância Hereditária à Frutose baseada no gnomAD v2.1.1.....	85

Capítulo 2

Tabela 1: Manifestações clínicas de pacientes brasileiros com intolerância hereditária à frutose.	107
Tabela 2: Genótipo e haplótipo de pacientes brasileiros com intolerância hereditária à frutose.	108
Tabela 3: Frequência de variantes patogênicas em <i>ALDOB</i> comuns na população brasileira.....	109

Capítulo 3

Table 1 – Biochemical findings in the follow-up of a treated Brazilian patient with FBPase deficiency.	124
Table 2: Comparison of physical chemical properties of wild-type and p.(Lys204Argfs*72) mutant fructose-1,6-bisphosphatase.....	124

Capítulo 5

Tabela 1: Atividade enzimática da frutose-1,6-bifosfatase nos ensaios <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	148
Tabela 2: Análise da afinidade da FBPase ao substrato frutose-1,6-bifosfato na presença dos inibidores AMP e frutose-2,6-bifosfato.....	148

1. RESUMO

Introdução: A frutose é um monossacarídeo disponível de forma livre ou integrado à molécula de sacarose, sendo produzida endogenamente a partir do sorbitol pela sorbitol desidrogenase. O metabolismo desse açúcar é realizado por três enzimas: 1) a frutoquinase catalisa a primeira reação na rota, a fosforilação à frutose-1P; 2) a aldolase B (no fígado, intestino e rins) converte essa molécula em duas trioses (diidróxiacetona-P e gliceraldeído); 3) a frutose-1,6-bifosfatase hidrolisa a frutose-1,6-bifosfato em frutose-6P. São descritos três erros inatos, todos de herança autossômica recessiva, envolvendo o metabolismo da frutose: frutoseúria essencial (FE), intolerância hereditária à frutose (IHF) e deficiência de frutose-1,6-bifosfatase (DFB). A FE é assintomática. A IHF é causada por variantes patogênicas no gene *ALDOB* que resultam em uma aldolase B deficiente. A DFB é consequência de alterações patogênicas no gene *FBP1*. Atualmente, o principal método diagnóstico da IHF e da DFB é a análise dos genes *ALDOB* e *FBP1*, respectivamente. Ambas as doenças ocasionam hipoglicemia e são tratadas por uma dieta restrita em frutose, sendo que na DFB é indicado o consumo de amido de milho cru, para auxiliar na manutenção da normoglicemia.

Objetivo principal: caracterizar o perfil genético de pacientes brasileiros com IHF e DFB.

Objetivos específicos: I. Relacionar as recentes descobertas envolvendo o metabolismo da frutose e a influência dessas no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para IHF e doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA); II. Analisar a distribuição mundial das variantes patogênicas mais frequentes em *ALDOB*; III. Analisar a frequência de variantes patogênicas e/ou preditas como tal no gene *ALDOB* no gnomAD e estimar a prevalência de IHF a partir da frequência de heterozigotos para essas variantes; IV. Analisar o perfil genético de pacientes brasileiros com IHF relacionando as variantes patogênicas detectadas com a região geográfica do país; V. Desenvolver um algoritmo para o diagnóstico genético de pacientes brasileiros com IHF; VI. Identificar as variantes envolvidas com a patogênese de DFB em pacientes brasileiros; VII. Caracterizar por abordagens *in silico* variantes detectadas no gene *FBP1*; VIII. Realizar a análise funcional *in vitro* de variantes novas em *FBP1* detectadas em pacientes brasileiros.

Metodologia: O estudo foi realizado em etapas. *Etapa 1:* foi realizada uma revisão narrativa e sistemática acerca dos aspectos moleculares da IHF. *Etapa 2:* o perfil genético de pacientes brasileiros com suspeita clínica ou diagnóstico de IHF (n=22) foi determinado por sequenciamento massivo paralelo. A partir disso, foi desenvolvido um algoritmo para o diagnóstico genético de pacientes brasileiros com IHF. *Etapa 3:* análise genética de pacientes brasileiros com DFB (n=7) por sequenciamento massivo paralelo e/ou sequenciamento automatizado de Sanger. Variantes patogênicas detectadas em *FBP1* foram caracterizadas por análises *in silico*. *Etapa 4:* análise funcional das variantes c.472C>T, c.958G>A e c.986T>C detectadas em *FBP1*.

Resultados: *Etapa 1:* a revisão da literatura evidenciou que as variantes p.Ala150Pro, p.Ala175Asp e p.Asn120Lysfs*32 respondem por ~70% dos alelos patogênicos identificados em pacientes de diferentes etnias. Essas variantes apresentam padrões específicos de distribuição os quais dão indícios de suas prováveis origens. Além disso, foi realizada a análise da prevalência de IHF a partir da frequência de heterozigotos com variantes patogênicas descritos no gnomAD. Os resultados mostram que a prevalência estimada de IHF varia entre as populações, sendo a maior prevalência observada em europeus não finlandeses (1/26.817). *Etapa 2:* a análise de pacientes brasileiros evidenciou quatro variantes envolvidas na patogênese de IHF: c.178C>T (p.Arg60Ter),

c.360_363delCAAA (p.Asn120Lysfs), c.448G>C (p.Ala150Pro) e c.524C>A (p.Ala175Asp). Observa-se que o padrão de distribuição desses alelos varia de acordo com a região geográfica do país. Assim, a variante mais frequente em pacientes do Sul é a p.Ala150Pro, enquanto que em Minas Gerais é a p.Arg60Ter. A partir das análises realizadas foi desenvolvido um algoritmo para o diagnóstico molecular de IHF em pacientes brasileiros, de modo que a análise direcionada para a detecção dos alelos mais frequentes nessa população resulta em uma taxa de diagnóstico de ~100%. *Etapa 3:* as análises do gene *FBP1* detectaram três variantes patogênicas em pacientes do Rio Grande do Sul (n=6): c.472C>T (p.Arg158Trp); c.958G>A (p.Gly320Arg) e c.986T>C (p.Leu329Pro). Sendo que os dois últimos alelos não haviam sido descritos na literatura até então. Análises *in silico* não evidenciaram alterações estruturais na proteína que indicassem a patogenicidade desses alelos. Além disso, a análise de uma paciente de Alagoas, filha de pais consanguíneos, evidenciou a presença da variante c.611_614delAAAA (p.Lys204Argfs*72) em homozigose. Análises computacionais mostraram que a perda de sítios de ligação ao substrato e de modificações pós-traducionais, além do aumento da desordem na estrutura da proteína são indícios da patogenicidade desse alelo. *Etapa 4:* o estudo funcional das variantes c.472C>T (p.Arg158Trp); c.958G>A (p.Gly320Arg) e c.986T>C (p.Leu329Pro) evidenciaram uma atividade reduzida em todas as proteínas mutantes. Análises de *docking* indicaram que um aumento na afinidade por inibidores da FBPase pode ser o mecanismo envolvido na patogenicidade das variantes p.Gly320Arg e p.Leu329Pro.

Conclusões: Nossos resultados mostram que pacientes brasileiros com IHF apresentam um perfil genético homogêneo, o que permite a análise direcionada para a detecção de alelos frequentes como abordagem para o diagnóstico molecular desses pacientes. Já a DFB apresenta uma maior heterogeneidade alélica entre pacientes brasileiros, o mesmo que é observado em outras populações. O panorama observado através das análises evidenciou a necessidade de ampliação nos estudos a respeito dos erros inatos do metabolismo da frutose na população brasileira e em outras populações. Especialmente porque, com a epidemia crescente de doenças associadas ao consumo exacerbado desse monossacarídeo, os erros inatos do metabolismo envolvidos nessa rota podem servir de modelos ao estudo de outras doenças, como a DHGNA, por exemplo.

2. ABSTRACT

Introduction: Fructose is a monosaccharide available in free form or integrated to the sucrose molecule, being produced endogenously from sorbitol by sorbitol dehydrogenase. The metabolism of this sugar is carried out by three enzymes: 1) the fructokinase catalyzes the first reaction in the route, the phosphorylation to fructose-1P; 2) aldolase B (in the liver, intestine and kidneys) converts this molecule into two trioses (dihydroxyacetone-P and glyceraldehyde); 3) fructose-1,6-biphosphatase hydrolyzes the fructose-1,6-bisphosphate into fructose-6P. Three inborn errors are described, all of which are autosomal recessive inheritance, involving the fructose metabolism: essential fructuria (EF), hereditary fructose intolerance (HFI) and fructose-1,6-biphosphatase deficiency (FBD). EF is asymptomatic. HFI is caused by pathogenic variants in the *ALDOB* gene that result in deficient aldolase B. FBD is a consequence of pathogenic alterations in the *FBPI* gene. Currently, the main diagnosis method for HFI and FBD is the analysis of the *ALDOB* and *FBPI* genes, respectively. Both diseases are treated by a diet restricted in fructose, and the FBD indicates the consumption of raw corn starch, to help maintain normoglycemia.

Main objective: to characterize the genetic profile of Brazilian patients with HFI and FBD.

Specific objectives: I. To relate the recent discoveries involving fructose metabolism and their influence in the development of new therapeutic approaches for IHF and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD); II. To analyze the worldwide distribution of the most frequent pathogenic variants in *ALDOB*; III. To analyze the frequency of pathogenic and /or predicted variants as such in the *ALDOB* gene in gnomAD and estimate the prevalence of HFI from the frequency of heterozygotes for these variants; IV. To analyze the genetic profile of Brazilian patients with HFI by relating the pathogenic variants detected to the geographic region of the country; V. To develop an algorithm for the genetic diagnosis of Brazilian patients with HFI; VI. To identify the variants evolved with the pathogenesis of FBD in Brazilian patients; VII. To characterize by *in silico* approaches variants detected in the *FBPI* gene; VIII. To perform *in vitro* functional analysis of new *FBPI* variants detected in Brazilian patients.

Methodology: The study was carried out in stages. *Stage 1:* a narrative and systematic review about the molecular aspects of HFI was carried out. *Stage 2:* the genetic profile of Brazilian patients with clinical suspicion or diagnosis of HFI (n = 23) was determined by massive parallel sequencing. From this, an algorithm for the genetic diagnosis of Brazilian patients with HFI was developed. *Stage 3:* genetic analysis of Brazilian patients with FBD (n = 7) by massive parallel sequencing and automated Sanger sequencing. Pathogenic variants detected in *FBPI* were characterized by *in silico* analysis. *Stage 4:* functional analysis of the c.472C> T, c.958G> A and c.986T> C variants detected in *FBPI*.

Results: *Stage 1:* the literature review showed that the variants p.Ala150Pro, p.Ala175Asp and p.Asn120Lysfs * 32 account for ~ 70% of the pathogenic alleles identified in patients of different ethnicities. These variants have specific patterns of distribution which give evidence of their probable origins. In addition, HFI prevalence analysis was performed based on the frequency of heterozygous with pathogenic variants described in gnomAD. The results show that the estimated prevalence of HFI varies between populations, with the highest prevalence observed in non-Finnish Europeans (1 / 26,817). *Stage 2:* the analysis of Brazilian patients showed four variants involved in the pathogenesis of HFI: c.178C> T (p.Arg60Ter), c.360_363delCAAA (p.Asn120Lysfs), c.448G> C (p.Ala150Pro) and c.524C> A (p.Ala175Asp). It is observed that the pattern of distribution of these alleles varies according to the geographic region of the country. Thus, the most frequent variant in patients

in the South is p.Ala150Pro while in Minas Gerais it is p.Arg60Ter. From the analyzes performed, an algorithm for the molecular diagnosis of HFI in Brazilian patients was developed, so that the analysis directed to detecting the most frequent alleles in this population results in a diagnostic rate of ~ 100%. *Stage 3: FBPI* gene analyzes detected three pathogenic variants in patients from Rio Grande do Sul (n = 6): c.472C>T (p.Arg158Trp); c.958G>A (p.Gly320Arg) and c.986T>C (p.Leu329Pro). The last two alleles are not yet described in the literature. *In silico* analyzes did not show structural changes in the protein that would indicate the pathogenicity of these alleles. In addition, the analysis of a patient from Alagoas, daughter of consanguineous parents, evidenced the presence of the variant c.611_614delAAAA (p.Lys204Argfs*72) in homozygosis. Computational analyzes showed that the loss of substrate binding sites and post-translational modifications, in addition to increase in the disorder in the protein structure, are indications of the pathogenicity of this allele. *Stage 4:* the functional study of the c.472C>T (p.Arg158Trp); c.958G>A (p.Gly320Arg) and c.986T>C (p.Leu329Pro) variants evidenced a reduced activity in all mutant proteins. Docking analyzes indicated that an increase in affinity for FBPase inhibitors may be the mechanism involved in the pathogenicity of the p.Gly320Arg and p.Leu329Pro variants.

Conclusions: Our results show that Brazilian patients with HFI have a homogeneous genetic profile, which allows analysis directed towards the detection of frequent alleles in the molecular diagnosis of Brazilian patients. FBD, on the other hand, presents a greater allelic heterogeneity among Brazilian patients, the same thing that is observed in other populations. The panorama drawn by the analyzes evidenced the need for expansion in studies regarding the inborn errors of fructose metabolism in the Brazilian population and other populations. Especially because, with the growing epidemic of diseases associated with the exacerbated consumption of this monosaccharide, the inborn errors of metabolism involved in this route can serve as models for the study of other diseases, such as NAFLD, for example.

3. CONTEXTUALIZAÇÃO

No ano de 2014, o grupo de pesquisa “Avaliação de Tecnologias em Saúde para Genética Clínica” sob coordenação da Profa Dra Ida Vanessa Doederlein Schwartz deu início ao desenvolvimento do projeto intitulado “Análise de genes causadores de glicogenoses em pacientes brasileiros através de sequenciamento de nova geração utilizando a plataforma Ion Torrent PGM”.

Para o desenvolvimento das análises genômicas foi customizado um painel que contempla 14 genes, sendo a maioria causadora das glicogenoses hepáticas. Esse grupo de doenças está envolvido no metabolismo energético que acarretam em crises hipoglicêmicas nos pacientes. Esse sintoma é também a primeira manifestação em pacientes com erros inatos do metabolismo da frutose. Assim, em razão da sobreposição de sintomas, os genes *ALDOB* e *FBPI* foram incluídos ao painel customizado.

Dessa forma, vislumbrou-se a oportunidade de desenvolver um método de diagnóstico genético racional, a partir do momento que passássemos a conhecer os alelos envolvidos na patogênese dessas doenças no Brasil. Isso porque para o diagnóstico definitivo a partir da análise da atividade enzimática se faz necessária uma biopsia hepática, um procedimento invasivo que vem sendo evitado. Além disso, não há no Brasil laboratórios que realizem esse tipo de análise. O diagnóstico genético, por sua vez, pode ser financeiramente inviável para alguns pacientes, o que acarreta em subdiagnóstico. Com a portaria das doenças raras (Portaria 199 de 30 de janeiro de 2014) o governo deve fornecer diagnóstico para essas doenças, contudo a judicialização ainda é o principal meio de alcançar esse direito, o que pode levar algum tempo. Logo, uma sistematização dessa análise poderia diminuir os custos e torná-la viável e de maior abrangência.

Os erros inatos do metabolismo da frutose são raros, e até o início do presente trabalho apenas um estudo analisou os aspectos genéticos da intolerância hereditária à frutose em quatro pacientes brasileiros (Valadares et al., 2015). A deficiência de frutose-1,6-bifosfatase não havia sido previamente estudada no Brasil. Assim, em 2015 com a aprovação da aluna na seleção de doutorado do PPGBM se percebeu que era o momento de dar início aos estudos acerca dos erros inatos do metabolismo da frutose. A partir de 2016, com o início das atividades da aluna deu-se início a essa nova linha dentro do grupo de pesquisa.

4. INTRODUÇÃO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são um grupo de doenças genéticas que decorrem de anormalidades na atividade de enzimas ou proteínas transportadoras. Até o momento, cerca de 750 doenças são descritas como EIM, as quais em sua maioria apresentam uma herança autossômica recessiva. Quando analisadas de forma isolada essas se caracterizam como doenças raras, mas em conjunto são numerosas (Saudubray and Garcia-Cazorla, 2018). Conforme Waters e colaboradores (2018), a prevalência global de EIMs considerando todas as causas é de 50,9 a cada 100.000 nascidos-vivos (IC de 95% = 43,4-58,4). A razão global de casos fatais é de 33%, resultando em 23.529 (IC de 95% = 20.382-27.427) mortes por EIM por ano (Waters et al., 2018).

O bloqueio em uma rota metabólica resulta em doença por dois mecanismos básicos: (1) o acúmulo de um substrato, que pode ser tóxico ao organismo ou (2) falta de um produto. Essas alterações podem ocorrer de forma restrita a um órgão ou sistema, resultando em uma apresentação clínica específica; ou então, em rotas comuns a diferentes tipos celulares e órgãos. Conseqüentemente, há uma grande diversidade na manifestação de sintomas, dificultando o diagnóstico. Os EIMs podem ser categorizados em três grupos: 1) doenças do metabolismo intermediário afetando pequenas moléculas (ex.: fenilcetonúria, homocistinúria, tirosinemia, dentre tantas outras), 2) doenças do metabolismo energético primário (ex.: defeitos na oxidação de ácidos graxos, doenças congênitas de glicosilação, doenças mitocondriais, etc...) e 3) doenças envolvendo moléculas complexas (ex.: mucopolidose, mucopolissacaridose, glicogenoses, entre outras) (Saudubray et al., 2012; Saudubray and Garcia-Cazorla, 2018).

Neste contexto, o aporte energético é crítico para a manutenção e desenvolvimento do organismo, sendo um processo altamente regulado, constituído por múltiplas rotas metabólicas (gliconeólise, gliconeogênese, oxidação mitocondrial de ácidos graxos e cetogênese), que combinadas protegem o indivíduo da hipoglicemia. Essa, por sua vez, é a primeira manifestação clínica de EIMs que afetam alguma das rotas energéticas citadas anteriormente (Weinstein et al., 2018). Assim, a hipoglicemia é a primeira manifestação clínica de doenças que afetam o metabolismo da frutose, conforme será detalhado a seguir.

4.1. Metabolismo da frutose:

A frutose é um monossacarídeo que representa cerca de 10% das calorias em dietas ocidentais. Pode ser encontrada de forma livre em muitas frutas, mel e no xarope de milho (utilizado como adoçante em muitos alimentos industrializados). Além disso, compõe com a glicose a molécula do dissacarídeo sacarose.

A frutose, quando ingerida, é absorvida pelos enterócitos. Até algum tempo atrás, acreditava-se que essas células apenas carreavam a absorção desse monossacarídeo o encaminhando para o fígado através do sistema portal, para então ser metabolizado. Contudo, estudos recentes evidenciam que em ratos alimentados com baixas doses de frutose (0,02 $\mu\text{mol/g/min}$), cerca de 90% dessa é metabolizada em glicose, lactato e alanina pelo jejuno. Porém, o consumo de doses altas acarreta em >30% desse açúcar chegando até o fígado, evidenciando que o intestino “protege” o fígado da toxicidade da frutose (Jang et al., 2018).

Quando presente no lúmen intestinal, a frutose entra no enterócito por meio de difusão facilitada através da ação do transportador GLUT5 (codificado pelo gene *SLC2A5*), o qual é independente de insulina. Patel e colaboradores (2015) demonstraram que no citosol dessas células, a frutose é convertida a outro metabólito de modo dependente da atividade da cetohexoquinase (KHK). Esse metabólito ainda não foi identificado, mas pode ser resultado de uma reação subsequente à KHK (Patel et al., 2015a). O que se sabe é que não se trata de gliceraldeído-3-fosfato, um metabólito específico do metabolismo da frutose, o que pode indicar que essa sinalização ocorre antes da hidrólise da frutose em duas trioses (Patel et al., 2015b). A partir da formação dessa molécula inicia-se uma cascata regulatória que induz um aumento na expressão de *SLC2A5* com consequente aumento nos níveis de mRNA e da proteína GLUT5. Uma vez que essa proteína é formada no interior do retículo endoplasmático e recebe processamento no complexo de Golgi, é necessário que essa seja transportada até a membrana para que exerça sua atividade. O tráfego de GLUT5 dessas organelas até a porção apical da membrana do enterócito é realizado por um endossomo dependente de Rab11a (proteína relacionada à Ras 11 cérebro-específica) (Patel et al., 2015a), uma proteína monomérica que atua na reciclagem de receptores para a superfície celular (Kelly et al., 2012). Em síntese, a absorção de frutose no enterócito envolve uma cascata auto regulatória em que moléculas dessa hexose induzem o aumento da expressão e atividade de seu transportador nessas células, consequentemente sua absorção é aumentada.

Outra molécula-chave no metabolismo da frutose é o ativador transcricional ChREBP (*carbohydrate response element-binding protein*), o qual forma um complexo heterodímero com a proteína Mlx (*Max-like protein X*) que ativa a transcrição de genes alvo em resposta à glicose e à frutose. Uma dieta rica em frutose induz um aumento na expressão e atividade de ChREBP no intestino e fígado. Consequentemente há o aumento da expressão de genes envolvidos nas rotas glicolítica, frutolítica e lipogênica nesses tecidos (Lee and Cha, 2018).

Jang e colaboradores (2018) evidenciaram que o jejuno importa, fosforila e cliva a molécula de frutose em trioses que são convertidas em glicose e outros metabólitos por células desse órgão. A porção de frutose que não é metabolizada, cerca de 14%, sai do enterócito via carreador GLUT 2, o qual se encontra na região basal dessas células, e chega no fígado via sistema portal (Jang et al., 2018). A rota metabólica de degradação da frutose é a mesma, tanto no enterócito quanto no hepatócito (figura 1). Desse modo, o primeiro passo compreende a fosforilação no carbono 1 pela frutoquinase (cetohecoquinase, E.C. 2.7.1.3), que é codificada pelo gene *KHK*, resultando em frutose-1-fosfato (F1P). Essa, por sua vez, é clivada em duas trioses pela ação da aldolase B, também chamada frutose-bifosfato aldolase (E.C. 4.1.2.13), a qual é codificada pelo gene *ALDOB*. O gliceraldeído (GAH) e a diidroxiacetona-fosfato (DHA-P) são os metabólitos resultantes dessa reação. O GAH é fosforilado pela trioquinase a GAH-3P. Assim, os metabólitos intermediários da frutose entrarão na glicólise, no ciclo de Krebs e na lipogênese como trioses fosfatadas. Além disso, a aldolase B também catalisa a formação de frutose-1,6-bifosfato (F1,6P) a partir da DHA-P e do GAH-3P. Essa molécula, por sua vez, é desfosforilada pela ação da frutose-1,6-bifosfatase (E.C. 3.1.3.11), a qual é codificada pelo gene *FBP1*, sendo uma reação-chave na gliconeogênese (Bouteldja and Timson, 2010; Saudubray et al., 2012; Tran, 2017; Hannou et al., 2018). Em suma, a degradação da molécula de frutose compreende três enzimas: frutoquinase, aldolase B e frutose-1,6-bifosfatase.

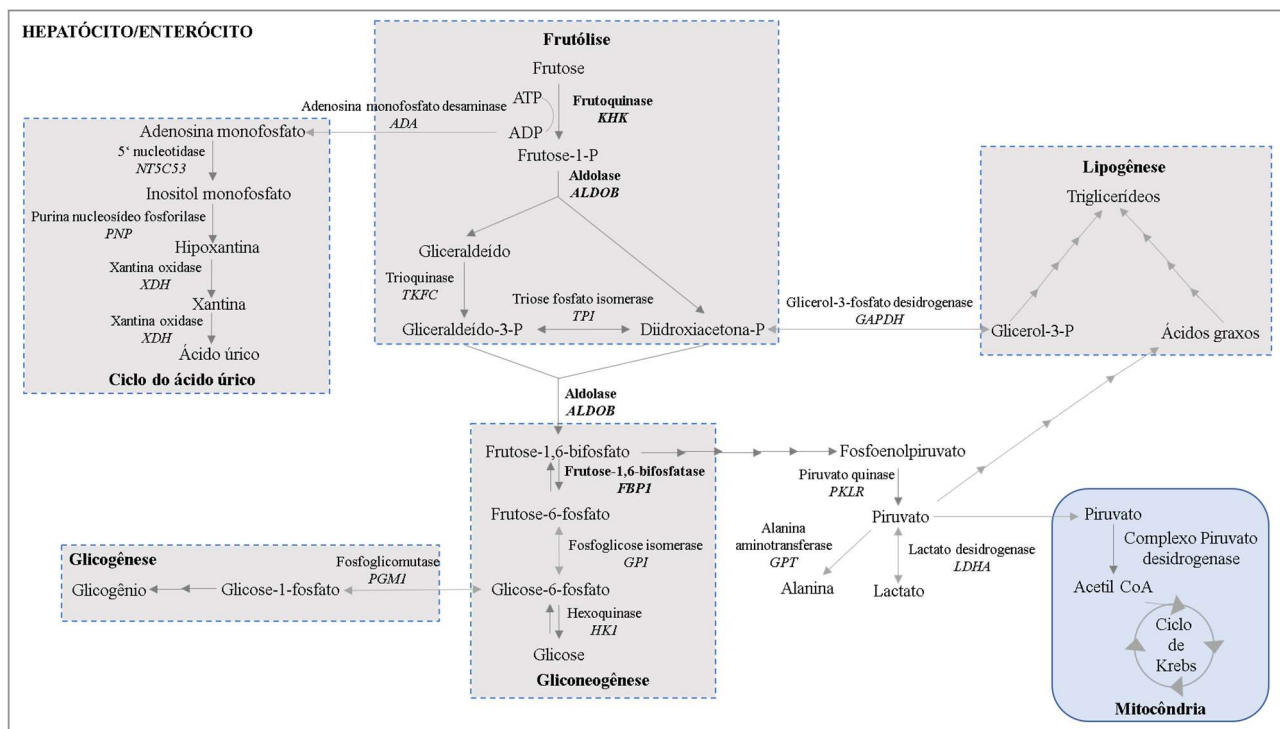


Figura 1: Metabolismo da frutose e rotas metabólicas relacionadas no hepatócito.

As enzimas destacadas em negrito são diretamente vinculadas ao metabolismo da frutose. Abaixo das enzimas descritas, consta o nome do gene que as codificam. Fonte: o autor, 2020.

4.2. DHGNA: doença associada ao metabolismo da frutose:

Além dos erros inatos envolvendo o metabolismo da frutose, destaca-se a importância de seu metabolismo visto o crescente consumo de alimentos industrializados contendo sacarose, como por exemplo, refrigerantes, bebidas esportivas e com sabor de frutas, além de sobremesas e doces, que tem sido associado à epidemia mundial de obesidade, diabetes do tipo 2 e DHGNA. Estudos têm mostrado que a frutose é particularmente prejudicial, pois em modelos animais altas doses dessa podem produzir rapidamente múltiplas características da síndrome metabólica, como obesidade, dislipidemia, fígado gordo, hipertensão, resistência à insulina e diabetes (revisado por Hannou et al, 2018). Em humanos, foi evidenciado que o consumo de frutose em excesso pode acarretar no aumento da adiposidade visceral, da hipertrigliceridemia pós-prandial e resistência à insulina (Stanhope et al., 2009).

Uma dieta rica em frutose pode acarretar em esteatose, que é o primeiro estágio da DHGNA, patologia caracterizada pelo acúmulo de gordura no citoplasma de hepatócitos, correspondendo a >5% do volume do fígado. Se o aumentado aporte de frutose prosseguir, a esteatose pode evoluir para cirrose e até mesmo hepatocarcinoma (Brunt et al., 2015). De

forma abreviada, o processo fisiopatológico dessa doença envolve: 1) aumento da lipogênese, 2) disfunção mitocondrial, 3) ativação de rotas inflamatórias e 4) resistência à insulina (Chen et al., 2017; Jegatheesan and De Bandt, 2017). A literatura mostra que a frutose está envolvida em todos esses processos afetando a homeostase do fígado. Assim, foi evidenciado que a frutose afeta a regulação da expressão de genes envolvidos em diferentes rotas metabólicas, como: alongação, oxidação e catabolismo de ácidos graxos; síntese e hidrólise de triglicerídeos; captação de lipídeos, lipogênese e lipólise (Distefano, 2019).

Os mecanismos moleculares pelos quais a frutose desencadeia a DHGNA ainda não estão totalmente esclarecidos, mas muito já se sabe (figura 2). Nesse contexto, o excesso de F1P acarreta em um aumento na glicólise levando a produção de acetil-CoA a níveis que superam a capacidade oxidativa do hepatócito, ativando a rota da lipogênese *de novo*. Além disso, essa saturação da rota glicolítica pode fazer com que metabólitos intermediários da glicólise sejam convertidos à glicerol-3-fosfato, o qual é usado na síntese de triglicerídeos (Softic et al., 2016; Chen et al., 2017; Ter Horst and Serlie, 2017). A disfunção mitocondrial causada pela frutose se dá por diferentes mecanismos: 1) A frutose gera 100 vezes mais espécies reativas de oxigênio (ERO) do que a glicose; 2) A formação de F1P consome ATP, sendo que a fosforilação catalisada pela frutoquinase é uma reação mais rápida que a clivagem de F1P pela aldolase B, o que pode levar a depleção de fosfato no hepatócito. Consequentemente, há o acúmulo de AMP resultando no aumento da síntese de ácido úrico, o qual estimula a produção de EROs; 3) A aceleração do fluxo glicolítico acarretada pela frutose, aumenta a formação de metilglioxal o qual é um potente agente de glicação que acarreta em alterações na sinalização de insulina e em estresse celular (Zhang et al., 2015; Jegatheesan and De Bandt, 2017; Ter Horst and Serlie, 2017). Outra organela afetada pelas altas cargas de frutose é o retículo endoplasmático (RE), já que nessa condição ocorre um aumento no metabolismo lipídico e na produção de VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*). O estresse do RE é causado pela frutossilção de proteínas de membrana dessa organela ou então pelo acúmulo de lipídeos ligados a essas. É então desencadeada a resposta à proteínas mal dobradas, o que reestabelece a homeostase do RE, porém uma exposição permanente à frutose torna o estresse do RE crônico, acarretando em inflamação, estresse oxidativo e apoptose. Constitui-se também em um mecanismo de progressão da esteatose hepática e resistência à insulina. Por fim, o estresse celular dos hepatócitos pode induzir um processo

inflamatório, o qual, por sua vez, pode ser exacerbado pela ativação de receptores do tipo Toll 4 (TLR4 – Toll-like receptor 4) por ácidos graxos como o palmitato, nas células de Kupffer no fígado (Chen et al., 2017; Jegatheesan and De Bandt, 2017; Ter Horst and Serlie, 2017). Em resumo, o consumo excessivo de frutose está associado com esteatose hepática, estresse celular e inflamação. Além disso, moléculas excretadas pelo fígado afetado irão alterar sua comunicação com outros órgãos e tecidos, como intestino, por exemplo.

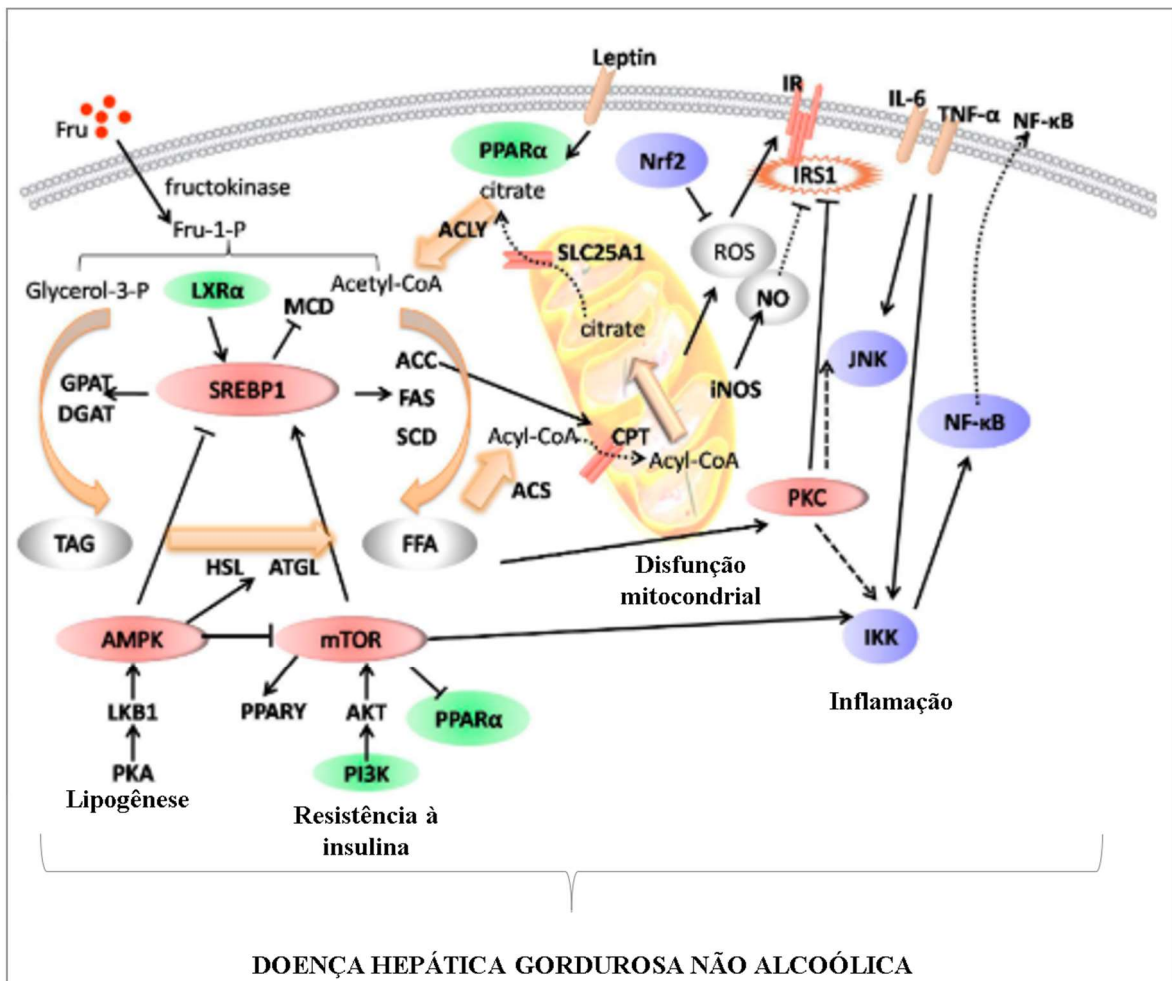


Figura 2: Aspectos moleculares envolvidos na fisiopatologia da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA).

Fonte: modificado de Chen e colaboradores (2017) (Chen et al., 2017). A frutose pode induzir a DHGNA através de diferentes processos patológicos, dentre eles: 1) aumento da lipogênese através da superexpressão do receptor X hepático α (LXR α) e da proteína de ligação à elemento regulador de esterol (SREBP1); 2) acarretando em uma disfunção mitocondrial pela depressão de receptores ativados por proliferadores de peroxissomo α (PPAR α) e fator 2 relacionado ao fator nuclear do eritróide 2 (Nrf2); 3) estimulando a ativação de rotas inflamatórias e 4) causando a resistência à insulina.

Pacientes com DHGNA apresentam alterações na composição da microbiota (disbiose), as quais podem levar a mudanças na permeabilidade intestinal em função da inibição da expressão de proteínas de junção nesse órgão. Além disso, a resistência à insulina, por si só, é associada a mudanças na permeabilidade intestinal. Em conjunto, a disbiose e as alterações na função de barreira do intestino ocasionam um aumento na translocação de endotoxinas em pacientes com DHGNA. Conseqüentemente, a exposição do fígado a essas toxinas, como lipopolissacarídeos, por exemplo, induz uma inflamação crônica que acarreta no agravamento das lesões hepáticas (Jegatheesan and De Bandt, 2017).

O consumo excessivo de frutose afeta o intestino de modo independente da presença de DHGNA. Assim, a capacidade de absorção de frutose pelo intestino é saturável, sendo que em um adulto saudável isso pode variar de menos de 5g até mais de 50g de frutose (Rumessen and Gudmand-Hoyer, 1986). Quando a capacidade de absorção é superada pelo consumo, ocorre a má-absorção da frutose. Essa síndrome é associada com a formação de gases, diarreia, hipersensibilidade visceral e síndrome do intestino irritável (Lee and Cha, 2018; Zhang et al., 2019). A fisiopatologia da má-absorção da frutose ainda não está totalmente esclarecida, mas alguns estudos têm apresentado aspectos importantes relacionados a esse processo. Em modelos animais isoladamente deficientes em frutoquinase, GLUT 5 e ChREBP foi mostrado que na ausência de atividade de qualquer uma dessas proteínas ocorre a má absorção da frutose (Jones et al., 2011; Jang et al., 2018; Oh et al., 2018).

De modo geral, se o transporte da frutose do lúmen intestinal para o interior do enterócito é afetado, maiores quantidades desse carboidrato permanecerão disponíveis no lúmen. E o que o excesso de frutose no lúmen intestinal pode causar? A frutose, em excesso, acarreta em uma carga osmótica que impulsiona o açúcar para regiões distais do intestino (íleo e cólon), onde entra em contato com a microbiota e passa pelo processo de fermentação, com conseqüente produção de gás, inchaço abdominal e diarreia (Choi, 2003). Além disso, foram evidenciadas alterações significativas na morfologia do ceco e na composição e abundância da microbiota intestinal. Isso faz com que haja alteração no perfil de proliferação e diferenciação de células entero-endócrinas do intestino, o que acarreta em alterações no perfil de hormônios gastrointestinais em todas as regiões desse órgão (jejuno, duodeno, íleo e ceco). Dentre os hormônios com perfil de expressão afetado está a colecistocinina (CCK), a qual apresentou um aumento de 5 a 8 vezes no ceco de ratos *knockout* em KHK quando

comparados com ratos selvagens [5]. Resumidamente, a má absorção da frutose pode ter consequências no organismo como um todo, já que afeta, dentre outros processos, a expressão de hormônios gastrointestinais amplamente distribuídos no organismo, sendo ainda desconhecido como isso afeta os humanos.

Em vista do crescente consumo de alimentos contendo frutose (principalmente na molécula de sacarose), o qual vem sendo associado à epidemia mundial de doenças metabólicas como DHGNA, diabetes e obesidade (Hannou et al., 2018), é imprescindível o conhecimento de todos os aspectos envolvidos no seu metabolismo. Nesse sentido, o estudo de pacientes com erros inatos do metabolismo da frutose pode auxiliar no entendimento dos efeitos tóxicos desse carboidrato bem como pode evidenciar oportunidades de intervenção terapêutica.

4.3. Erros Inatos do metabolismo da frutose

São três os erros inatos envolvendo o metabolismo da frutose, sendo que esses estão sumarizados na tabela 1.

Tabela 1: Erros inatos do metabolismo da frutose.

Doença	OMIM	Enzima afetada	Gene alterado	Localização do gene	Tipo de herança	Incidência
Frutoseúria Essencial (FE)	#229800	Frutoquinase (E.C. 2.7.1.4)	<i>KHK</i>	2p23.3	AR	1:120.000 (Laron, 1961)
Intolerância Hereditária à Frutose (IHF)	#229600	Aldolase B (E.C. 4.1.2.13)	<i>ALDOB</i>	9q31.1	AR	1:23.000 (Reino Unido)(James et al., 1996) 1:31.000 (Polônia)(Gruchota et al., 2006) 1:26.100 (Alemanha)(Santer et al., 2005)
Deficiência de frutose-1,6-bifosfatase (DFB)	#229700	Frutose-1,6-bifosfatase (E.C. 3.1.3.11)	<i>FBP1</i>	9q22.32	AR	1:350.000 (Holanda) (Bijarnia-Mahay et al., 2019) <1:900.000 (França)(Lebigot et al., 2015)

Nota: AR = autossômica recessiva

4.3.1. Frutoseúria Essencial (FE)

A FE constitui-se em uma doença assintomática em que a enzima frutoquinase não está funcional e, portanto, afeta o primeiro passo na rota metabólica da frutose, a fosforilação da frutose a F1P a partir de uma molécula de ATP. Essa alteração foi descrita pela primeira vez em 1876 de forma independente por Zimmer e Czapek, sendo que até 1960, apenas 50

casos foram descritos na literatura (Laron, 1961). Essa alteração é mais frequentemente associada à indivíduos de origem judaica (Bonthon et al., 1994; Saudubray et al., 2012).

4.3.1.1. Aspectos bioquímicos da FE:

Boesiger e colaboradores (1994) analisaram a presença de compostos fosforilados no fígado de indivíduos com FE e evidenciaram que as concentrações de F1P, ATP e Pi não eram alterados após uma carga intravenosa de frutose (Boesiger et al., 1994). A frutose ingerida é parcialmente excretada pela urina (10-20%) e o restante é metabolizado por rotas alternativas (Laron, 1961; Bonthon et al., 1994; Saudubray et al., 2012). Associado a isso, o aumento persistente das concentrações de frutose no sangue são as principais características clínicas da doença (Bonthon et al., 1994; Saudubray et al., 2012). Um estudo com ratos *KHK^{-/-}* evidenciou que esses animais apresentaram índices elevados de frutose no plasma e urina. Além disso, esses ratos apresentaram níveis significativos de frutose-6-fosfato (F6P) no tecido muscular esquelético, os quais não foram observados nos animais selvagens. Esses resultados sugerem que a frutose é metabolizada via hexoquinase muscular na ausência de *KHK* (Miller et al., 2018). Em indivíduos com FE, foi detectada a presença de F3P nos eritrócitos, mas não no fígado e nos músculos (Petersen et al., 1992). Em vista disso, sabe-se que há uma rota alternativa de degradação de frutose nesses indivíduos, porém essa permanece desconhecida. Em uma abordagem por modelagem matemática, Allen & Musante (2018) investigaram as adaptações no metabolismo de indivíduos com esse fenótipo. O modelo desenvolvido prediz que a absorção na veia porta é alterada, o metabolismo periférico torna-se mais lento, a reabsorção renal da frutose é reduzida e rotas alternativas para o metabolismo da frutose são melhoradas (Allen and Musante, 2018).

4.3.1.2. Aspectos moleculares da FE:

O gene *KHK* estende-se por 14Kb (Chr2: 27086760-27100762) compreendendo 8 éxons que codificam uma proteína com 298 aminoácidos (aa) (NCBI, 2004). *KHK* é regulado por um mecanismo ainda desconhecido que acarreta no *splicing* alternativo dos éxons adjacentes 3A e 3C de forma tecido-específica. Esse processo resulta em duas isoformas: KHK-A e KHK-C. A isoforma KHK-A é expressa em níveis baixos em vários tecidos e apresenta uma menor afinidade pela frutose, porém é mais termoestável (Asipu et al., 2003). Já a KHK-C apresenta alta afinidade pela frutose, acarretando em uma rápida formação da

F1P nos tecidos em que é expressa, tais como fígado, intestino e rins (Diggle et al., 2009; Ishimoto et al., 2012). Essa rápida fosforilação da frutose acarreta em uma depleção transiente dos níveis de ATP e Pi nas células.

Foram descritas duas variantes patogênicas em *KHK* em três irmãos de origem Suíça com FE, heterozigotos compostos para as variantes c.118G>A (p.Gly40Arg) e c.127G>A (p.Ala43Thr) (Bonthon et al., 1994). Ensaio funcionais analisaram essas proteínas mutantes e evidenciaram que a variante p.Gly40Arg resulta em ambas as isoformas de KHK (KHK-A e KHK-C) inativas e bastante insolúveis. A variante p.Ala43Thr retém a atividade enzimática, mas apresenta uma redução significativa na estabilidade térmica de ambas isoformas. Em uma temperatura fisiológica isso resulta em perda da atividade da isoforma KHK-C, mas não da KHK-A. Assim, os indivíduos com genótipo p.[Gly40Arg];[Ala43Thr] apresentam uma deficiência seletiva da isoforma hepática e preservação da atividade da KHK-A (Asipu et al., 2003).

4.3.2. Intolerância hereditária à frutose (IHF)

A IHF é causada pela deficiência na atividade da enzima aldolase B no fígado, rins e intestino. Chambers e Pratt (1956) relataram o primeiro caso descrito na literatura. Tratava-se de uma mulher de 24 anos que apresentava sintomas como fraqueza, dores abdominais e náusea quando ingeria frutose, sendo que a mesma apresentava uma forte aversão à doces e frutas. Os autores nomearam o caso de idiossincrasia à frutose (Chambers and Pratt, 1956). Contudo, apenas em 1963 foi reconhecida como um erro inato do metabolismo por parte de Froesch e seus colaboradores, que descobriram que a administração de frutose em sujeitos afetados provocava hipoglicemia (Froesch et al., 1963).

4.3.2.1 Aldolase B:

A aldolase B, uma aldolase de classe I, apresenta uma estrutura tetramérica composta por quatro subunidades iguais de peso molecular de 36 KDa com uma simetria do tipo 222, isto é, um eixo de dobra com duas dobras perpendiculares a ele, sendo que todos os eixos de simetria se cruzam em um ponto. Cada subunidade é formada por uma estrutura em forma de barril que resulta da interação de oito folhas β/α envolvendo a lisina na posição 230 que é a base Schiff [15]. O ácido glutâmico no códon 188 age como acceptor de prótons realizando a ligação da base Schiff (Lys230) ao grupo carbonila do substrato diidróxidoacetona

(DPHA). Adicionalmente, os resíduos de tirosina são cruciais a esse mecanismo e atuam estabilizando os aceptores de hidrogênio. O sítio de ligação ao substrato compreende os aminoácidos Arg56 e Lys147. Algumas modificações pós traducionais são importantes na manutenção da estrutura e atividade enzimática. Assim, a aldolase B apresenta um sítio de N-acetilação (Ala2), três sítios de N6-succinil-lisina (posições 13, 121 e 317), dez sítios de fosforilação sendo dois envolvendo o aminoácido treonina (posições 39 e 119) e oito envolvendo serinas (localizadas nos códons 36, 89, 132, 272, 276, 299, 301 e 309). A extremidade C-terminal da proteína está envolvida na determinação da atividade isozima-específica. A aldolase B apresenta quatro regiões específicas, sendo três delas codificadas pelo éxon 3 e a quarta na região C-terminal. Os aminoácidos dos códons 15 ao 364 formam o domínio glicolítico (<https://pfam.xfam.org/family/PF00274> e <https://www.uniprot.org/uniprot/P05062>).

4.3.2.2. Manifestações clínicas da IHF:

Em recém-nascidos com amamentação materna ou com formulações isentas de frutose, sacarose ou sorbitol não há manifestação de sintomas, sendo que esses aparecem quando são introduzidas outras fontes de alimento à criança. Os sinais clínicos incluem: dores abdominais, náusea, vômitos recorrentes, hipoglicemia e falhas no desenvolvimento. Os sintomas decorrem do acúmulo de F1P no fígado, o qual pode acarretar em outros distúrbios metabólicos em indivíduos não tratados, tais como: acidemia láctica, queda do fósforo sérico, hipermagnesemia e hiperalaninemia. Se não diagnosticada e o consumo de frutose persistir, a doença torna-se crônica e pode causar falhas no desenvolvimento, doença do fígado manifestada por hepatomegalia, icterícia, tendência a sangramento, edema, ascite e sinal de disfunção dos túbulos renais proximais (síndrome de Fanconi), podendo causar a morte em casos mais graves. Se não tratada, os danos hepáticos e renais podem se tornar irreversíveis. Muitos pacientes desenvolvem uma aversão protetiva contra alimentos doces que contém frutose, sendo muitas vezes considerada como de comportamento neurótico. Essa característica é importante no diagnóstico da doença e pode levar a um subdiagnóstico, pois sem contato com o agente tóxico não há manifestação de sintomas (Ali et al., 1998; Bouteldja and Timson, 2010; Saudubray et al., 2012; Demirbas et al., 2018).

Como falado anteriormente, a fosforilação da frutose pela frutoquinase é uma reação que ocorre rapidamente quando esse carboidrato entra na célula. Em condições normais,

ocorre uma depleção transitória dos níveis de fósforo na célula, mas em pacientes com IHF essa depleção é permanente (hipofosfatemia), pois o fósforo permanece ligado à molécula de frutose formando a F1P. Isso desencadeia uma série de reações, dentre elas ocorre a ativação da rota de degradação das purinas pela indução da atividade da AMP desaminase, que resulta no aumento dos níveis de ácido úrico (hiperuricemia). Além disso, a depleção de ATP leva à dissolução do complexo ATP-Mg, elevando os níveis de magnésio (hipermagnesemia). A hipoglicemia presente em pacientes com IHF resulta da inibição da glicogenólise e gliconeogênese pela F1P, em princípio pelo bloqueio da quebra do glicogênio no nível da fosforilase e pela diminuição da formação de intermediários gliconeogênicos como F1,6P e glicose-6-fosfato. O distúrbio da gliconeogênese associado à ativação da piruvato quinase acarreta no acúmulo de alanina, lactato e piruvato no fígado e, conseqüentemente, no desenvolvimento da acidemia láctica e hiperalaninemia. Outro achado clínico que pode auxiliar na investigação diagnóstica é a alteração no padrão de N-glicosilação em consequência da inibição da fosfomanose isomerase pela F1P (Ali et al., 1998; Bouteldja and Timson, 2010; Demirbas et al., 2018). Indivíduos heterozigotos para variantes em *ALDOB* não têm alterações significativas no metabolismo pós-prandial de frutose. Esses apresentam apenas aumento do ácido úrico em resposta à ingestão de quantidades modestas de frutose (Debray et al., 2018).

4.3.2.3. Diagnóstico da IHF:

O diagnóstico da IHF pode ser realizado a partir de três abordagens: teste de tolerância à frutose (TTF), ensaio da atividade enzimática de aldolase B (EAE) e análise do gene *ALDOB* (Ali et al., 1998; Saudubray et al., 2012). O teste de tolerância à frutose consiste de uma carga de frutose, seja por via oral ou infusão intravenosa, e acompanhamento de níveis séricos dos biomarcadores anteriormente citados. Além disso, a determinação da atividade de aldolase B a partir de uma biópsia hepática é outro modo de alcançar o diagnóstico definitivo da doença. Entretanto, esses dois testes são considerados altamente invasivos e, tem-se determinado que a análise do gene *ALDOB* resulte em um diagnóstico assertivo e menos invasivo ao paciente, de modo que, atualmente, tem sido a abordagem de escolha para o diagnóstico de IHF (Ali et al., 1998).

4.3.2.4. Aspectos moleculares da IHF:

Em humanos, há três isozimas aldolase ativas: Aldolases A, B e C. Essas apresentam um padrão de expressão tecido-específico com propriedades catalíticas distintas, de modo que quando uma está ausente, outra isoforma não compensa sua falta. A aldolase A é codificada pelo gene *ALDOA* (16p11.2, 30064279-30072207) e expressa na fase embrionária e nos músculos e cérebro do indivíduo adulto. Quando inativa, resulta na glicogenose tipo XII (GSD XII). O tipo B é codificado pelo gene *ALDOB*, sendo expresso no fígado, rins e intestino de adultos, estando inativo na IHF. E, por fim, a aldolase C é codificada por *ALDOC* (17q11.2, 28573115-28576963) e expressa no cérebro e coração de adultos. Não há relatos de doenças associadas a uma inatividade de aldolase C (NCBI, 2004).

O gene *ALDOB* apresenta nove éxons que são traduzidos em uma enzima de 364 aminoácidos. Já foram descritas 68 variantes patogênicas em *ALDOB* em pacientes com IHF, das quais 32 são consideradas privadas, conforme catálogo mantido pela Universidade de Boston (USA) (<http://www.bu.edu/aldolase/HFI/hfidb/hfidb.html>). Os alelos patogênicos mais frequentes e mundialmente distribuídos são: p.Ala150Pro, p.Ala175Asp e p.Asn335Lys, embora haja diferenças de prevalência entre as etnias (Tolan, 1995; Ali et al., 1998). Em relação aos aspectos moleculares envolvidos na IHF, o capítulo 2 da presente tese apresenta um artigo de revisão com informações detalhadas acerca das variantes descritas em *ALDOB* e sua distribuição mundial.

Embora os estudos iniciais a respeito de IHF tenham sugerido que pacientes com mutações de perda de sentido apresentavam fenótipo mais severo da doença (Cross and Cox, 1990; Kajihara et al., 1990; James et al., 1996), nenhum dado posterior confirmou esses achados. Assim, Coffe e seus colaboradores (2010) acreditam que as mortes relatadas foram em razão do diagnóstico tardio da doença (Coffe et al., 2010). Ainda que as variantes patogênicas descritas afetem de forma diferente o produto enzimático, isso não reflete em diferentes aspectos clínicos da IHF, de modo que até o momento não há uma relação genótipo-fenótipo estabelecida para a doença.

Tabela 2 – Variantes patogênicas descritas em *ALDOB*.

Localização	CDS	Mudança na proteína	Referências
<i>Alterações em único nucleotídeo</i>			
Éxon 2	c.2T>C	p.Met1Thr	(Ali et al., 1993)
Éxon 3	c.10C>T	p.Arg3*	(Ali et al., 1994)
	c.136A>T	p.Arg46Trp	(Esposito et al., 2010)
	c.170G>C	p.Arg57Pro	(Davit-spraul et al., 2008)
	c.178C>T	p.Arg59*	(Brooks and Tolan, 1994)
Éxon 4	c.221T>C	p.Ile73Thr	(Esposito et al., 2004)
	c.331C>T	p.Glu110*	(Esposito et al., 2004)
Éxon 5	c.403T>C	p.Cys135Arg	(Brooks and Tolan, 1994)
	c.442T>C	p.Trp148Arg	(ALI; COX, 1995)
	c.444G>A	p.Trp148*	(Davit-spraul et al., 2008)
	c.448G>C	p.Ala150Pro	(CROSS; TOLAN; COX, 1988)
	c.522C>G	p.Tyr174*	(Gruchota et al., 2006)
	c.524C>A	p.Ala175Asp	(CROSS; COX, 1990)
	c.532T>C	p.Cys178Arg	(Santer et al., 2005)
	c.554C>G	p.Pro184Arg	(SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ <i>et al.</i> , 2002)
Éxon 6	c.612T>A	p.Tyr203*	(ALI; ROSIEN; COX, 1993)
	c.612T>G	p.Tyr203*	(Santer et al., 2005)
	c.664G>T	p.Val222Phe	(Esposito et al., 2004)
	c.677G>A	p.Gly226Asp	(Bijarnia-mahay et al., 2015)
	c.686T>C	p.Leu229Pro	(Esposito et al., 2004)
	c.720C>A	p.Cys239*	(Kajihara et al., 1990)
Éxon 7	c.770T>C	p. Leu256Pro	(ALI <i>et al.</i> , 1994)
	c.839C>A	p.Ala280Asp	(Davit-spraul et al., 2008)
	c.851T>C	p.Leu284Pro	(Santer et al., 2005)
	c.910C>T	p. Arg303Trp	(SANTAMARIA <i>et al.</i> , 1996)
	c.911G>A	p.Arg303Glu	(SANTAMARIA <i>et al.</i> , 2000)
	c.932T>C	p.Leu311Pro	(Tolan, 1995)

<i>Continuação</i>				
Éxon 9		c.1005C>G c.1013C>T c.1027T>C	p. Asn334Lys p.Ala337Val p.Tyr343His	(CROSS; STOJANOV; COX, 1990) (Rellos et al., 1999) (Esposito et al., 2010)
<i>Deleções</i>				
Éxon 1	Deleção parcial do promotor e éxon 1			(Ferri et al., 2012)
Éxon 2		c.1_624del	p.Met1?	(Esposito et al., 2010; Wang et al., 2012)
Éxon 3		c.62delA c.113-1_115delGGTA c.146delT c.250delC	p. Ala20del p.Gly38fs p.Val49fs p. Leu83fs	(Santamaria et al., 1996) (Cross and Cox, 1990) (Davit-spraul et al., 2008) (Gruchota et al., 2006)
Éxon 4		c.345_372del c.360_363delCAAA	p.Pro115_Thr124del p.Asn120Lisfs*32	(Santer et al., 2005) (Dazzo and Tolan, 1990; Lazarin et al., 2013; Valadares et al., 2015)
Éxon 4-5	Deleção completa do éxon 4 e parte do éxon 5			(CROSS; COX, 1990)
Éxon 6-7	Deleção completa			(CROSS; COX, 1990)
Éxon 6		c.547_552delCTGGTA	p.Val182_Leu183del	(Santamaria et al., 1999; Esposito et al., 2002)
Éxon 7		c.689delA	p.Lys230fs	(Bijarnia-mahay et al., 2015)
Éxon 8		c.841_842delAC c.865delC c.953_994del	p. Thr281fs p. Asn288fs p.Ala318_Ala332del	(Santer et al., 2005) (CROSS <i>et al.</i> , 1990) (Davit-spraul et al., 2008)
<i>Inserções</i>				
Éxon 3		c.306_317dup12	p.Ile103_Gly106dup	(PAPPAS; TOLAN, 1997)
Éxon 7		c.683_688dupTGCTAA c.761dupT	p.Lys230MetfsX136 p.Val253fs	(Davit-spraul et al., 2008) (Choi et al., 2012)
Éxon 8		c.940dupT	p.Trp314fs	(Ferri et al., 2012)
IVS8		c.1000-1_1006delGGCTAACTinsTG		(Brooks et al., 1991)
Éxon 9		c.1044_1049delTTCTGGinsACACT	p.Ser348fs	(Santer et al., 2005)
<i>Splicing</i>				
IVS1		c.-11+1G>C		(Coffe et al., 2010)

<i>Continuação</i>		
IVS2	c.112+1delG c.112+1G>A c.113-1G>A	(Bijarnia-mahay et al., 2015) (Davit-spraul et al., 2008) (Santer et al., 2005)
IVS3	c.324G>A c.324+1G>A c.325-1G>C	(Sánchez-Gutiérrez et al., 2002) (Bijarnia-mahay et al., 2015) (Esposito et al., 2004)
IVS4	380-1G>A	(Bijarnia-mahay et al., 2015)
IVS5	c.540+1G>C	(Tolan, 1995; Ali et al., 1996)
IVS6	c.625-2A>G c.625-1G>A	(Esposito et al., 2004) (ALI <i>et al.</i> , 1994)
IVS7	c.799+2T>A	(Santer et al., 2005)

Fonte: Human Gene Mutation Database (HGMD).

4.3.2.5. Tratamento da IHF:

Atualmente, o tratamento da IHF consiste basicamente na eliminação de frutose, sacarose e sorbitol da dieta dos pacientes. Pacientes que têm uma boa adesão ao tratamento dietético apresentam um bom prognóstico com desenvolvimento normal (Demirbas et al., 2018).

Recentemente, um estudo com camundongos duplo nocaute *KHK^{-/-}ALDOB^{-/-}* evidenciou que a ausência de KHK é suficiente para evitar a manifestação de sintomas como hipoglicemia, alterações hepáticas e intestinais. Porém, dentre as alterações intestinais presentes nesses animais, os autores avaliaram apenas o processo inflamatório no intestino. Assim, os autores sugerem que a inibição de KHK-C pode ser uma abordagem terapêutica para o tratamento da IHF e também auxiliar no tratamento de pacientes com DHGNA (Lanaspa et al., 2018).

É natural pensar que ao evitar a fosforilação da frutose ocorra a diminuição na manifestação de sintomas na IHF, já que esses resultam do acúmulo de F1P em células hepáticas. Contudo, foi demonstrado em modelos animais que a ausência de KHK acarreta na má absorção de frutose, pois a sinalização celular para expressão de GLUT5 é afetada (Patel et al., 2015a). Associado a isso, há alterações nos níveis de glicose, succinato, propionato, lactato e na composição da microbiota intestinal. Como consequência dessas alterações ocorre o aumento na expressão do hormônio colecistocinina (Zhang et al., 2019). Assim, foi evidenciado que a ausência de atividade de KHK em camundongos pode afetar de maneira significativa a função endócrina do intestino, ao mesmo passo que acarreta em alterações importantes na diversidade da microbiota intestinal, o que pode afetar o organismo como um todo. Desse modo, o tratamento dietético permanece sendo o único disponível atualmente.

4.3.3. Deficiência de frutose-1,6-bifosfatase (DFB)

A frutose-1,6-bifosfatase (FBPase) catalisa de forma irreversível a conversão de F1,6P em F6P, uma reação chave na gliconeogênese. Essa rota compreende a formação de glicose a partir de fontes alternativas de energia, como lactato, glicerol, piruvato e aminoácidos, ocorrendo principalmente no fígado e rins (menor extensão). Baker & Winegrad (1970) descreveram o primeiro caso relatado na literatura de deficiência de frutose-1,6-bifosfatase, o qual era de uma menina de 5,5 anos de idade que manifestava

crises de hipoglicemia acompanhada de acidose metabólica em jejum (Baker and Winegrad, 1970).

4.3.3.1 Frutose-1,6-bifosfatase:

A enzima frutose-1,6-bifosfatase (FBPase) (E.C. 3.1.3.11) é uma monoester fosfohidrolase (esterase) que realiza a reação inversa da fosfofrutoquinase na glicólise, isto é, a hidrólise de frutose-1,6-bifosfato (F1,6P2) em frutose-6-P (F6P) e Pi, uma reação chave na gliconeogênese e glicogênese. Análises cristalográficas demonstraram que a FBPase é um homotetrâmero cuja subunidade apresenta uma massa de 37KDa. Sua atividade é modulada por cofatores e inibidores. Para que FBPase atinja sua atividade catalítica ótima, é necessária a presença de cátions divalentes (Mg^{2+} , Mn^{2+} e/ou Zn^{2+}) e monovalentes (K^+ , NH_4^+ , and TI^+). Já a inibição ocorre de forma sinérgica por adenosina 5' monofosfato (AMP) e fructose-2,6-fosfato (F2,6P2). O primeiro se liga ao sítio alostérico, enquanto que o segundo se liga ao sítio ativo da enzima competindo com o substrato F1,6P2. Cada subunidade apresenta um domínio alostérico AMP (resíduos 1-200) e um domínio catalítico (201-335). A concentração relativa de ligantes no sítio ativo e alostérico determina estados conformacionais distintos à enzima. Assim, AMP e F2,6P2 estabilizam a enzima em sua conformação T (forma inativa) e F1,6P2 ao estado R (cineticamente ativo) (Ke et al., 1989; Ke et al., 1990; Shi et al., 2013).

Em humanos e outros vertebrados há duas isozimas FBPases, uma expressa no fígado e rins (codificada pelo gene *FBP1*) e outra nos músculos (codificada pelo gene *FBP2*). As principais diferenças entre a isozima hepática e muscular são a sensibilidade aos íons Cálcio e a inibição por AMP. Sendo que, a isozima muscular apresenta uma maior afinidade pelo inibidor AMP que a isozima hepática (Shi et al., 2013). Ambos os genes estão localizados no cromossomo 9q22.32. e são separados por 9,3Kb. O gene *FBP1* (NC_000009.12, 94.603.133 - 94.640.257) resulta em um transcrito de 1.487pb e oito éxons, o qual é traduzido em um produto de 338 aminoácidos. *FBP2* (NC_000009.12, 94.558.714 – 94.593.832) apresenta sete éxons resultando em um transcrito de 1.305pb, traduzidos em um produto de 339 aminoácidos, dos quais 77% são idênticos a FBPase hepática (El-Maghrabi et al., 1995; Kikawa et al., 1997; Tillmann et al., 2000). Até o momento, não há na literatura nenhum estudo demonstrando que mutações no gene *FBP2* acarretem em alguma doença.

4.3.3.2. Manifestações clínicas da DFB:

Em neonatos e no início da infância, o requerimento de fontes endógenas de carboidratos é elevado em função do baixo estoque de glicogênio. Assim, a gliconeogênese é uma rota frequentemente usada para o aporte energético desses indivíduos em períodos de jejum prolongado (Weinstein et al., 2018). Em razão disso, a DFB costuma se manifestar entre o 1º e 4º dias de vida a partir da hiperventilação causada por uma profunda acidose láctica e hipoglicemia. A doença está associada a uma alta mortalidade, sendo apontada como uma das causas de morte súbita infantil. Podem ocorrer episódios de irritabilidade, sonolência ou coma, períodos de apneia, dispneia, taquicardia, hipotonia muscular e moderada hepatomegalia. Os sintomas são frequentemente induzidos por episódios catabólicos como jejum prolongado, febre alta, vômitos, diarreia ou infecções (Pagliara et al., 1972; Emery et al., 1988; Saudubray et al., 2012; Pinto et al., 2018; Weinstein et al., 2018).

Os achados laboratoriais durante a descompensação metabólica incluem: hipoglicemia cetótica, hiperlactatemia, hiperalaninemia, hipercetonemia, aumento da razão lactato/piruvato, elevação das concentrações plasmáticas de ácido úrico, glicerolúria e pseudo-hipertrigliceridemia (Weinstein et al., 2018). Os achados laboratoriais em uma crise podem ser confundidos como glicogenose hepática tipo I (Ia e Ib). Porém, nessas doenças a hipertrigliceridemia permanece após o tratamento da crise hipoglicêmica, o que não ocorre em pacientes com DFB que têm esse parâmetro normalizado (Afroze et al., 2013a).

4.3.3.3. Diagnóstico da DFB:

A suspeita clínica pode ser confirmada a partir do ensaio de atividade enzimática da FBPase em amostras de fígado. Porém, por necessitar de biópsia hepática, um método invasivo, essa metodologia tem sido descontinuada. Desse modo, a confirmação do diagnóstico pode ser feita pela detecção bialélica de variantes patogênicas no gene *FBPI* (Saudubray et al., 2012; Weinstein et al., 2018). Indivíduos diagnosticados e tratados precocemente têm um bom prognóstico.

4.3.3.4. Aspectos moleculares da DFB:

A variante patogênica c.959dupG (p.Ser321Ilefs*13) foi a primeira descrita em *FBP1*, em um paciente japonês (Kikawa et al., 1995). Desde então, já foram descritas 54 variantes diferentes em pacientes distribuídos por diferentes regiões geográficas. Diferentemente do que ocorre na IHF, a maioria das variantes descritas em pacientes é restrita a um grupo familiar ou região, de modo que não há uma variante mais prevalente. É fato que a variante c.959dupG é descrita em diferentes populações (chineses, europeus, japoneses e norte-americanos) (Kikawa et al., 1997; Herzog et al., 2001; Xu et al., 2014; Lebigot et al., 2015). Entretanto, a distribuição parece indicar que essa variante surgiu em diferentes momentos nessas populações, sem que tenha um efeito fundador ou de deriva atuando, já que se trata de um *hot spot* para eventos mutacionais do tipo inserção e/ou deleção (Kikawa et al., 1997). Além dessa, poucas variantes são descritas em diferentes populações, conforme pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3: Variantes patogênicas descritas em *FBP1*.

	CDS	Proteína	Origem étnica	Referência
Alterações em um único nucleotídeo				
Éxon 2	c.88G>T	p.Glu30*	Japão	(Kikawa et al., 1997)
Éxon 4	c.355G>A	p.Asp119Asn	China	(Li et al., 2017)
Éxon 5	c.359C>T	p.Pro120Leu	Turquia	(Santer et al., 2016)
	c.472C>T	p.Arg158Trp	França, Malásia, Índia, Israel e Brasil	(Ngu et al., 2014; Lebigot et al., 2015; Ijaz et al., 2017; Moey et al., 2018; Pinheiro et al., 2019; Yoav et al., 2019)
Éxon 6	c.490G>A	p.Gly164Ser	Japão/Coréia do Sul	(Kikawa et al., 1997; Moon et al., 2011; Lebigot et al., 2015)
	c.530C>A	p.Ala177Asp	Japão	(Kikawa et al., 1997)
	c.581T>C	p.Phe194Ser	Japão	(Matsuura et al., 2002)
	c.619G>C	p.Gly207Arg	Alemanha	(Santer et al., 2016)
	c.639C>G	p.Asn213Lys	França/?	(Herzog et al., 2001; Lebigot et al., 2015)
	c.648C>G	p.Tyr216*	Suíça	(Asberg et al., 2010)
Éxon 7	c.685C>T	p.Gln229*	Marrocos	(LEBIGOT <i>et al.</i> , 2015; Prah1 et al., 2006.)
Éxon 8	c.778G>A	p.Gly260Arg	Paquistão/Suíça	(Herzog et al., 1999; Asberg et al., 2010)
Éxon 8	c.841G>A	p.Glu281Lys	Paquistão/Turquia	(Afroze et al., 2013b)
	c.841G>T	p.Glu281*	Arábia Saudita	(Faiyaz-Ul-Haque et al., 2009)
Éxon 8	c.851C>G	p.Pro284Arg	Japão	(Matsuura et al., 2002)
	c.881G>T	p.Gly294Val	Europa/América do Norte	(Herzog et al., 2001)
Éxon 8	c.881G>A	p.Gly294Glu	Paquistão/Suíça	(Asberg et al., 2010; Afroze et al., 2013b)
	c.958G>A	p.Gly320Arg	Brasil	(Pinheiro et al., 2019)
	c.986C>T	p.Leu329Pro	Brasil	(Pinheiro et al., 2019)
Deleções				
Completa deleção do gene <i>FBP1</i>		p.?	Alemanha/Suíça	(Asberg et al., 2010; Santer et al., 2016)
Éxon 1	Completa deleção	p.?		(HERZOG <i>et al.</i> , 2001)
Éxon 2	c.-24-26_170 + 5192del	p.?	Turquia/Armênia	(Santer et al., 2016)
	c.35delA	p.Asn12Thrfs*2	Turquia/Alemanha	(Herzog et al., 1999)
<i>Continuação</i>				

Éxon 3-7	c.48delC	p.Phe17Serfs*15	França	(Lebigot et al., 2015)
Éxon 5	Completa deleção	p.?	França	(Lebigot et al., 2015)
Éxon 6	c.704delC	p.Pro235GlnfsX42	China	(Li et al., 2017)
	c.616_619delAAAG	p.Lys206Val*70	Turquia	(ALI <i>et al.</i> , 2011)
	c.660delT	p.Phe220Leufs*57	Turquia	(Eren et al., 2013)
	c.720_729del	p.Tyr241GlyfsX33	China	(Li et al., 2017)
Éxon 7	c.807delG	p.Lys270Argfs*7	?	(Herzog et al., 2001)
Éxon 8	Completa deleção	p.?	Alemanha	(Santer et al., 2016)
	c.838delT	p.Tyr280Thrfs*25	Coréia do Sul	(Moon et al., 2011)
	c.966delC	p.Asp323Thrfs*7	Iran	(Herzog et al., 1999)
Inserção/duplicação				
Éxon 2	c.114_119dupCTGCAC	p.Cys39_Thr40dup	Arábia Saudita	(Faiyaz-Ul-Haque et al., 2009)
Éxon 6	c.704dupC	p.Asp236Argfs*2	?	(Herzog et al., 2001)
Éxon 8	c.865dupA	p.Met289Asnfs*45	Grécia	(Lebigot et al., 2015)
	c.959dupG	p.Ser321Ilefs*13	Japão/Europa/China	(Kikawa et al., 1995; Herzog et al., 2001; Xu et al., 2014; Lebigot et al., 2015)
Indel				
Éxon 7	c.731_738delins20	p.Arg244_Tyr245delins6	Turquia	(Lebigot et al., 2015)
Splicing				
Intron 4	c.427-1delG	p.Lys143_Pro189del	?	(Lebigot et al., 2015)
Intron 5	c.690-75+11del		Israel	(Yoav et al., 2019)
Intron 6	c.761-1G>A		Israel	(Yoav et al., 2019)
Intron 7	c.825+1G>A	p.?	?	(Lebigot et al., 2015)

Fonte: Human Gene Mutation Database e Santer et al., 2016; com adaptações.

4.3.3.5. Tratamento da DFB:

O manejo de pacientes com DFB ainda é controverso, sendo que não há uma diretriz universal que determine a melhor forma de tratamento da doença. Resumidamente, consiste na prevenção de crises hipoglicêmicas a partir de uma intervenção dietética. Assim, Pinto e colaboradores (2018) abordaram a terapêutica aplicada em diferentes regiões da Europa, Ásia (Iraque e Arábia Saudita), Oceania (Nova Zelândia) e Américas (EUA e Brasil). De modo geral, algumas abordagens incluem a restrição rígida a alimentos doces, frutas e verduras. Mas esse é um aspecto bastante variável de modo que há países que não incluem restrições alimentares aos pacientes, sendo essa uma prática executada apenas em momentos de crise metabólica. Por outro lado, há centros especializados que indicam uma restrição total de alimentos contendo frutose (Pinto et al., 2018). É importante ressaltar que em momentos de descompensação metabólica deve-se evitar o uso de frutose ou sacarose como fontes de energia, pois a rápida fosforilação da frutose à F1P inibe a glicogênio fosforilase, inibindo a glicogenólise, o que ativará a gliconeogênese, que é afetada nesses indivíduos agravando a crise hipoglicêmica (Weinstein et al., 2018).

Conforme dito anteriormente, a manifestação de sintomas é induzida por episódios catabólicos como jejum e febre alta. Em recém-nascidos isso é especialmente importante, pois após a retirada da mamada noturna o período de jejum entre a última mamada da noite e a primeira da manhã pode ser demasiado nesses indivíduos. Logo, para se evitar o desenvolvimento de crises metabólicas tem sido indicado o uso de amido de milho cru (1g/kg) antes de dormir, conforme é aplicado no tratamento de pacientes com glicogenoses hepáticas (Burlina et al., 1990). Isso é justificável, pois esse é um carboidrato complexo de digestão lenta que o corpo demorará mais tempo para processá-lo, liberando energia aos poucos para o organismo. A tolerância a períodos de jejum vai aumentando com a idade do indivíduo, pois as reservas de glicogênio tornam-se maiores, acarretando numa menor dependência da gliconeogênese para a manutenção da normoglicemia (Pinto et al., 2018). Assim, o amido de milho de cru pode deixar de ser usado rotineiramente.

Além disso, dois centros de referência no tratamento da doença indicam o tratamento com Glycosade (VitaFlo®), um amido de milho modificado de liberação lenta (Pinto et al., 2018). Em momentos de crises, há uma concordância em relação ao manejo dos pacientes entre os países representados no estudo de Pinto et al. (2018), pois todos indicam o tratamento com polímeros de glicose (10% dextrose) para emergências (Pinto et al., 2018;

Weinstein et al., 2018). Em vista do exposto, ressalta-se a necessidade do desenvolvimento de diretrizes para o tratamento mais adequado desses pacientes.

5. JUSTIFICATIVA

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são um grupo de doenças genéticas que se caracterizam por um defeito enzimático que acarreta em alterações em alguma via metabólica. O padrão-ouro para o diagnóstico dessas doenças é o ensaio de atividade enzimática. Contudo, no Brasil não há laboratórios que realizem a análise da atividade da aldolase B e para o ensaio da atividade de frutose-1,6-bifosfatase é necessária a realização de uma biópsia hepática, um processo invasivo que vem sendo evitado. Nesse sentido, o diagnóstico genético dessas doenças é uma alternativa menos invasiva e que vem sendo implementada como rotina em outros países.

Análises das sequências dos genes *ALDOB* e *FBPI* em pacientes com suspeita clínica de EIM da frutose em diferentes países têm evidenciado a heterogeneidade alélica dessas doenças. Assim, em relação à deficiência de frutose-1,6-bifosfatase é observada uma maior frequência de variantes patogênicas privadas ou restritas a uma determinada região. Já quando se considera a intolerância hereditária à frutose, observam-se alguns poucos alelos respondendo pela maior parte dos casos descritos da doença em diferentes etnias. O conhecimento da distribuição dos alelos patogênicos em *ALDOB* nos permite conhecer o panorama mundial da doença, ao mesmo passo que evidencia a possibilidade do uso de abordagens direcionadas ao diagnóstico de alelos mais frequentes em cada população. Além disso, a análise de bancos de dados genômicos populacionais para identificar a frequência de alelos patogênicos associados à doença, nos possibilita estimar a prevalência da doença a partir da frequência de heterozigotos. Essa abordagem vem sendo aplicada no estudo de outras doenças e pode trazer luz acerca da prevalência estimada da IHF em populações com dados escassos a esse respeito.

No Brasil, os EIM da frutose são doenças muito pouco estudadas e que apresentam uma dificuldade de diagnóstico em razão da sobreposição de sintomas com outras doenças que também afetam rotas metabólicas energéticas, como as glicogenoses hepáticas. A presença de sintomas e achados clínicos inespecíficos acarretam em uma longa jornada em busca do diagnóstico definitivo. Isso gera estresse na família em relação ao prognóstico do probando e pode retardar o início do tratamento adequado. Em relação ao tratamento, ambas as doenças são dieteticamente tratáveis a partir da restrição ao consumo de frutose. Além dessa restrição, pacientes com DFB necessitam do

consumo de amido de milho cru para auxiliar na manutenção da normoglicemia, já que esses indivíduos apresentam alterações na gliconeogênese. O diagnóstico precoce e o tratamento adequado resultam em um excelente prognóstico aos pacientes, evitando-se manifestações mais severas de ambas as doenças.

Nesse contexto, o conhecimento dos alelos envolvidos na patogênese dessas doenças no Brasil nos permite sistematizar as análises dos genes *ALDOB* e *FBP1* de modo a tornar o diagnóstico genético mais rápido e acessível. Isso diminuirá o tempo e os custos envolvidos no diagnóstico definitivo.

Contudo, é necessário ponderar alguns aspectos importantes envolvendo o diagnóstico genético. Primeiro, deve-se considerar sempre as limitações das técnicas empregadas, pois ao se realizar a análise da sequência de um determinado gene, normalmente analisam-se as regiões codificantes desses. Assim, ao não se detectar alterações possivelmente patogênicas, não se pode excluir a existência dessas. Adicionalmente, os métodos de sequenciamento mais utilizados no diagnóstico genético não são os mais indicados para a detecção de deleções de éxons inteiros, ainda que plataformas de NGS possam sinalizar a presença desse tipo de variante. Segundo, há de se levar em conta que variantes não descritas em outros pacientes, ou mesmo aquelas descritas em um número reduzido de indivíduos, devem ser criteriosamente classificadas para se indicar sua patogenicidade. Logo, muitas alterações permanecem como de significado incerto, o que não as exclui como envolvidas na patogênese da doença, mas também não as coloca como determinantes para o desenvolvimento da mesma. Estudos funcionais de variantes novas são fundamentais para a correta classificação dessas como patogênicas ou não.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo Geral

Analisar o perfil genético de pacientes brasileiros com intolerância hereditária à frutose (IHF) e deficiência de frutose-1,6-bifosfatase (DFB) e relacionar os achados genéticos a outras populações do mundo.

6.2. Objetivos específicos

I. Analisar as frequências de variantes patogênicas no gene *ALDOB* descritas na literatura em pacientes com IHF relacionando suas distribuições entre as diferentes populações.

II. Analisar a frequência de variantes patogênicas ou preditas como tal no gene *ALDOB*, presentes no banco de dados genômicos populacionais gnomAD, e estimar a prevalência da IHF para todas as populações descritas nesse banco de dados a partir da frequência de heterozigotos para esses alelos.

III. Analisar o perfil genético de pacientes brasileiros com IHF relacionando as variantes patogênicas detectadas com a região de origem desses pacientes.

IV. Desenvolver um algoritmo para uma abordagem diagnóstica de IHF em pacientes brasileiros considerando as características genéticas dessa população.

V. Identificar as variantes envolvidas na patogênese da DFB em pacientes brasileiros.

VI. Caracterizar por abordagens *in silico* variantes detectadas no gene *FBP1*.

VII. Realizar a análise funcional *in vitro* de variantes novas no gene *FBP1* detectadas em pacientes brasileiros.

7. CAPÍTULOS

7.1. Capítulo 1: Intolerância hereditária à frutose: distribuição mundial de variantes patogênicas descritas em *ALDOB* e estimativa da prevalência baseada em bancos de dados genômicos.

O segundo capítulo consiste em uma revisão narrativa e sistemática que descreve aspectos moleculares importantes acerca da IHF. Além disso, descrevemos a distribuição mundial dos cinco alelos patogênicos mais frequentes em pacientes com IHF em diferentes populações discutindo hipóteses para a origem de cada um desses alelos. Adicionalmente, analisamos a frequência das variantes patogênicas em *ALDOB* presentes em um banco de dados genômicos populacional, estimando a prevalência da IHF em todas as populações descritas nesse banco a partir da frequência de heterozigotos. Esse capítulo responde pelos objetivos I e II.

Esse capítulo será apresentado na forma de artigo que será submetido à revista “Cellular and Molecular Life Sciences”, cujo fator de impacto é 7.014 e o Qualis Capes da área Genética (Ciências Biológicas I) é A1. O formato obedece às normas da revista.

Situação do artigo: em preparação.

Intolerância Hereditária à Frutose: distribuição mundial de variantes patogênicas em *ALDOB* e estimativa da prevalência baseada em bancos de dados genômicos.

Autores:

Franciele Cabral Pinheiro^{a, b, c}

Fernanda Sperb Ludwig^{a, b}

Ida Vanessa Doerderlein Schwartz^{a, b, d, e}

Afiliação:

^aPrograma de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

^bLaboratório BRAIN, Centro de Pesquisa Experimental (CPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

^cUniversidade Federal do Pampa (Unipampa), Itaqui, RS, Brasil.

^dDepartamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

^eServiço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, RS, Brasil.

Autor Correspondente:

Para todo o processo de publicação: Franciele Cabral Pinheiro (fcpbio@gmail.com)

Endereço presente/permanente:

Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 350, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil.

RESUMO:

A intolerância hereditária à frutose (IHF) é um erro inato do metabolismo da frutose, de herança autossômica recessiva, causado por mutações no gene *ALDOB* que acarreta na deficiência de aldolase B no fígado, rins e intestino. Rotas energéticas importantes ao organismo, como glicólise e gliconeogênese, são alteradas. Os pacientes manifestam sintomas como hipoglicemia cetótica, vômitos e náuseas, além de hepatomegalia e outras disfunções hepáticas e renais. O tratamento consiste em uma dieta restrita em frutose resultando em um bom prognóstico. Estudos têm demonstrado o perfil de pacientes de diferentes etnias e evidenciado a heterogeneidade alélica da doença. Até o momento, 68 variantes patogênicas foram descritas em *ALDOB*. Mas, cinco variantes, mundialmente distribuídas, respondem pela maior parte dos casos estudados. Nesse contexto, revisamos os aspectos moleculares e a distribuição mundial de variantes patogênicas em *ALDOB* entre pacientes e bancos de dados populacionais. Adicionalmente, estimamos a prevalência de IHF em diferentes populações a partir de dados do gnomAD.

Palavras-chave: IHF, Intolerância Hereditária à Frutose; perfil de mutações; estimativa de prevalência; p.Ala150Pro; p.Ala175Asp.

1. Introdução:

A intolerância hereditária à frutose (IHF; OMIM: 229600) é uma doença de herança autossômica recessiva causada pela deficiência da enzima frutose-1,6-bisfosfato aldolase B (aldolase B; E. C. 4.1.2.13) no fígado, rins e intestino [1].

O primeiro caso relatado na literatura foi descrito por Chambers e Pratt em 1956. Na ocasião, uma mulher inglesa de 24 anos foi investigada por apresentar um comportamento fóbico em relação a frutas ou açúcares e manifestar vômitos após a ingestão desses alimentos. A investigação consistiu de vários testes de tolerância à diferentes bebidas doces, e concluiu que a paciente tinha intolerância apenas à frutose. Os autores indicaram a rota metabólica afetada na doença e chamaram atenção para pacientes com restrições alimentares [2]. Estudos bioquímicos mostraram que a aldolase B é a enzima deficiente na IHF e a herança autossômica recessiva da doença [3]. Ao longo do tempo, muitos casos foram relatados em diferentes etnias.

Normalmente, os sintomas se manifestam durante o período de desmame e inserção de outros alimentos à dieta da criança, quando essa passa a ter contato com frutose. A ingestão desse açúcar acarreta em hipoglicemia cetótica, dores abdominais, vômitos e náuseas. O consumo prolongado de frutose acarreta em danos ao fígado e rins que podem progredir para hepatomegalia e esteatose hepática. Uma característica bem importante da doença é a fobia, manifestada pelos pacientes, em relação à alimentos que desencadeiam a manifestação de sintomas. O tratamento consiste na exclusão de frutose, sacarose e sorbitol da dieta do paciente e, se seguido adequadamente, o prognóstico é excelente. Os aspectos bioquímicos da doença foram objeto de excelentes revisões no passado [4, 5], sendo que uma recentemente publicada, evidenciou os novos insights em relação à fisiopatologia da

doença [6]. Em se tratando dos aspectos moleculares, há uma revisão publicada há mais de 20 anos [7].

No presente estudo analisamos a distribuição das variantes patogênicas descritas em *ALDOB* em paciente com IHF de diferentes populações e estimamos a prevalência da doença em populações presentes no banco de dados genômicos Genome Agregation Database (gnomAD v2.1.1 – *controls*).

2. Metodologia

Primeiramente, foi realizada uma revisão narrativa acerca dos aspectos moleculares envolvendo o gene *ALDOB* e a proteína Aldolase B.

2.1. Análise da distribuição mundial de variantes patogênicas em *ALDOB*:

Para analisar a frequência das variantes patogênicas em *ALDOB* entre diferentes populações, foi realizada uma busca no PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) usando os termos “*ALDOB mutation*”; “*Hereditary fructose intolerance mutation*”; “*HFI mutation*” no período de 03 a 05 de outubro de 2019. Os artigos encontrados foram selecionados a partir dos seguintes critérios de inclusão: informação sobre o país ou continente de origem do paciente; número de alelos no estudo e de cada variante. Foram selecionados 126 artigos, dos quais 46 foram utilizados na revisão após exclusão dos trabalhos que não atendiam aos critérios de inclusão. Adicionalmente foram utilizados artigos que constavam nas referências dos trabalhos selecionados para as análises.

Os pacientes com IHF descritos nos estudos selecionados foram classificados de acordo com seu país de origem e as frequências alélicas foram calculadas para cada país e/ou continente e para cada variante. Indivíduos homocigotos com consanguinidade relatada

tiveram apenas um alelo computado na análise de frequência. Além das cinco variantes mais frequentes, outras variantes detectadas nos estudos selecionados foram agrupadas e computadas no cálculo da frequência alélica para cada país e/ou continente. A frequência de alelos raros foi computada separadamente para cada país.

É importante salientar que estudos que descreveram a origem dos pacientes relacionando-os a um continente e/ou região de um continente sem detalhar o país de origem foram considerados apenas nos cálculos de frequência dos continentes, por isso o número de alelos é maior quando se analisa a informação por territórios continentais.

Os resultados encontrados foram comparados com os dados de frequência descritos no gnomAD v2.1.1 (*controls*).

2.2. Estimativa da prevalência de IHF:

Foram utilizadas duas abordagens para a seleção de variantes a serem analisadas para estimar a prevalência de IHF a partir da frequência de heterozigotos no gnomAD. Abordagem 1: analisamos todas as variantes detectadas em *ALDOB* no gnomAD v.2.1.1 (*controls*). Foram encontradas 428 variantes no total, dessas 22 estavam nas regiões 3'UTR e 5'UTR, 131 eram intrônicas, 176 eram variantes de sentido trocado, 19 estavam localizadas em sítio de splicing, 8 eram sem sentido, 1 variante de perda de códon de parada, 64 eram sinônimas e 7 eram variantes de alteração de fase de leitura. Para proceder a estimativa da prevalência de IHF, as variantes foram selecionadas considerando os seguintes critérios: frequência menor que 1%, localização gênica, sendo consideradas aquelas em regiões codificantes com conseqüente alteração da sequência de aminoácidos ou então em sítio de *splicing*. Assim, variantes intrônicas, sinônimas e nas regiões 3'UTR e 5'UTR foram desconsideradas das análises. Variantes do tipo de sentido trocado foram analisadas pelo

software Condel [8] o qual realiza a análise de variantes não-sinônimas por cinco algoritmos diferentes: SIFT, Polyphen2, MutationAssessor, FATHMM e Condel. Foram mantidas nas análises apenas as variantes preditas como patogênicas por todos os algoritmos analisados, totalizando 92 variantes. As variantes em sítio de *splicing* foram analisadas pelo preditor Human Splicing Finder (HSF), permanecendo nas análises apenas 10 variantes que podem resultar em alteração no *splicing*, conforme predição. Além dessas, permaneceram nas análises 8 variantes sem sentido, 1 variante de perda de códon de parada e 7 variantes de mudança de fase de leitura. Desse modo, foram analisadas as frequências de 118 variantes em *ALDOB* provavelmente patogênicas.

Abordagem 2: considerou apenas as variantes patogênicas descritas em pacientes e que estavam presentes no banco de dados Human Gene Mutation Database (HGMD), assim dentre as 68 variantes descritas em *ALDOB*, 16 alelos patogênicos foram descritos entre indivíduos controles do gnomAD v2.1.1.

Após a seleção das variantes, foram tabeladas as frequências dessas de acordo com as populações descritas no gnomAD. Para cada abordagem, foram somadas as frequências observadas das variantes para determinar a frequência de heterozigotos para esses alelos e proceder o cálculo da prevalência aplicando os princípios de Hardy-Weinberg (tabela 3).

3 Resultados/Discussão:

3.1. Aspectos moleculares da Aldolase B:

Há três isozimas aldolase em humanos denominadas A, B e C, codificadas pelos genes *ALDOA*, *ALDOB* e *ALDOC*, respectivamente. Essas são expressas de forma tecido específica e apresentam diferentes afinidades aos dois substratos da enzima: frutose-1-

fosfato (F1P) e frutose-1,6-bifosfato (FBP). A isozima A é expressa no período embrionário, e no tecido muscular e cerebral na fase adulta, apresentando maior afinidade pela FBP. A aldolase B é expressa no fígado, rins e intestino na fase adulta mostrando igual afinidade pelos dois substratos. O tipo C apresenta alta homologia com a isozima A (78%) sendo expresso no cérebro e com maior afinidade pela FBP [9, 10].

O gene *ALDOB* se expande por 15 Kb no cromossomo 9 na orientação telômero → centrômero (localizado no NC_000009.12 – 101420560_101435774) [9]. É composto por nove éxons e oito íntrons (Figura 1A). Os éxons são numerados de 1 até 9 e apresentam 115, 122, 212, 55, 161, 84, 193, 200 e 526 pares de bases (pb) de extensão, respectivamente [11]. O promotor está localizado entre as posições -246 e +85, englobando todo o éxon 1. Apresenta sítios de ligação para os fatores de transcrição NFY (Nuclear Transcription Factor Y) e HNF1 (Hepatocyte Nuclear Factor 1) [12]. Além desses, apresenta uma sequência reforçadora situada à 8.3 Kb à jusante do sítio de início de transcrição (Chr9: 101,430,945-101,451,831), a qual apresenta sítios de reconhecimento para 169 fatores de transcrição (www.genecards.org) [13]. A região 5'UTR apresenta cerca de 67 nucleotídeos localizados no éxon 1 e parte do éxon 2. A região 3'UTR se estende por 440 pb no éxon 9 [14] e apresenta dois sítios independentes de poliadenilação [15].

A aldolase B, uma aldolase de classe I, apresenta uma estrutura tetramérica composta por quatro subunidades iguais de peso molecular de 36 KDa com uma simetria do tipo 222, isto é, um eixo de dobra com duas dobras perpendiculares a ele sendo que todos os eixos de simetria se cruzam em um ponto. Cada subunidade é formada por uma estrutura em forma de barril que resulta da interação de oito folhas β/α envolvendo a lisina na posição 230 que é a base Schiff [16]. O ácido glutâmico no códon 188 age como aceptor de prótons realizando a ligação da base Schiff (Lys230) ao grupo carbonila do substrato diidróxidoacetona

(DPHA). Adicionalmente, os resíduos de tirosina são cruciais a esse mecanismo e atuam estabilizando os aceptores de hidrogênio. O sítio de ligação ao substrato compreende os aminoácidos Arg56 e Lys147. Algumas modificações pós traducionais são importantes na manutenção da estrutura e atividade enzimática. Assim, a aldolase B apresenta um sítio de N-acetilação (Ala2), três sítios de N6-succinil-lisina (posições 13, 121 e 317), dez sítios de fosforilação sendo dois envolvendo o aminoácido treonina (posições 39 e 119) e oito envolvendo serinas (localizadas nos códons 36, 89, 132, 272, 276, 299, 301 e 309). A extremidade C-terminal da proteína está envolvida na determinação da atividade isozima-específica. A aldolase B apresenta quatro regiões específicas, sendo três delas codificadas pelo éxon 3 e a quarta na região C-terminal. Os aminoácidos dos códons 15 ao 364 formam o domínio glicolítico (figura 1C) (<https://pfam.xfam.org/family/PF00274> e <https://www.uniprot.org/uniprot/P05062>) [11, 16, 17].

3.2. Variantes patogênicas descritas no gene *ALDOB*:

Já foram descritas 68 mutações no gene *ALDOB* relacionadas à patogênese da IHF (HGMD; Figura 1A). Dentre essas, 32 são alterações de troca de bases sendo 23 mutações de sentido trocado e 9 sem sentido. São descritas 11 variantes em sítios canônicos de splicing, duas substituições em regiões regulatórias, sendo uma na região promotora e outra na região 3'UTR. Já foram observadas dez deleções de até 6 pb e 7 deleções que compreendem de 28 pb até quatro éxons inteiros. Além dessas, quatro inserções de 1 até 12 pb e 2 indels contam entre as variantes já descritas em pacientes (HGMD). Essas alterações estão distribuídas ao longo de todo o gene *ALDOB* sendo presentes em maior número no éxon 5, incluindo as duas mutações mais frequentes, p.Ala150Pro e p.Ala175Asp. Os demais

éxons apresentam um número de mutações por éxon que varia entre 4 (éxons 2, 4 e 9) e 9 (éxon 8) (figura 1A).

Antes mesmo de iniciarem as abordagens diagnósticas envolvendo a análise do gene *ALDOB*, um estudo analisou a diferença entre as enzimas de controles normais e de pacientes com IHF. Através de diferentes técnicas bioquímicas, como radioimunoensaio, SDS-PAGE e cromatografia de imunoafinidade, os autores evidenciaram que pacientes e indivíduos heterozigotos tinham uma enzima com apenas 10-25% e 50% da imunorreatividade de controles normais, respectivamente, além de outras alterações nas propriedades catalíticas da enzima mutante [18]. Mais tarde, mostrou-se que essa alteração na atividade enzimática de aldolase B resultava da variante p.Ala150Pro em homozigose, no primeiro estudo genético de *ALDOB* [19].

Dentre as variantes patogênicas identificadas em *ALDOB* apenas 11 foram funcionalmente descritas: p.Ile74Thr, p.Trp148Arg, p.Ala150Pro, p.Ala175Asp, p.Leu183_Val184del, p.Val222Phe, p.Leu229Pro, p.Leu257Pro, p.Arg304Trp, p.Asn335Lys e p.Ala338Val [20–24]. Por mecanismos distintos, todas as mutações acarretaram em alterações na atividade da enzima. As variantes p.Arg304Trp e p.Ala150Pro situam-se na região do sítio ativo da enzima, mas enquanto o triptofano no códon 304 impede a ligação ao substrato, a prolina no códon 150 distorce as subunidades que formam a estrutura tetramérica estável da enzima ativa [21]. Adicionalmente, análises de cristalografia evidenciaram que o resíduo de prolina em uma α -hélice (p.Ala150Pro) causa uma desordem na região do sítio da mutação, a qual se propaga às folhas β e loops adjacentes. Conseqüentemente, a estrutura quaternária é afetada em razão de incongruências na interface de conexão entre as subunidades do tetrâmero [22, 24]. Essa mesma região é afetada pela

mutação p.Leu257Pro, a qual retém cerca de 40% da atividade da enzima em ambos os substratos (frutose-1P e frutose bifosfato) [21, 22].

As mutações na região C-terminal p.Asn335Lys e p.Ala338Val acarretam em distorções na integridade da subunidade levando a dissociação do tetrâmero em monômeros inativos [21]. Análises utilizando a técnica de dicroísmo circular deram indícios que a enzima mutante p.Ala338Val é parcialmente não dobrada e, ensaios com fluorescência, mostraram uma maior afinidade ao produto da reação nesse mutante. Assim, evidenciou-se que a extremidade C-terminal de aldolase B está relacionada a liberação do produto da reação catalisada [20].

As mutações p.Ile74Thr, p.Ala175Asp, p.Leu183_Val184del, p.Val222Phe e p.Leu229Pro, não foram obtidas na forma solúvel (nativa), de modo que impossibilitou uma análise mais detalhada. Uma possível causa para isso é que essas enzimas mutantes apresentam alterações estruturais tão significativas que as tornam termolábeis, instáveis e também sofrem ações proteolíticas [21, 23, 25]. No entanto, um aspecto a se considerar de todos os ensaios funcionais citados é que eles foram desenvolvidos em modelos *in vitro* utilizando células procarióticas, o que pode influenciar diretamente os resultados obtidos. Posto que, algumas enzimas mutantes não foram purificadas na temperatura fisiológica adequada e o processamento pós traducional entre procariotos e eucariotos apresenta relevantes diferenças, vieses experimentais poderiam ser reduzidos com a utilização de células eucarióticas como modelo de estudo [26].

Além disso, a alteração na região promotora c.-214G>A evidenciou uma alteração no perfil de fatores de transcrição que ligam-se ao promotor de *ALDOB* [12]. A mutação acarreta em uma perda do sítio de ligação ao fator de transcrição TBX5 que atua como ativador em genes expressos no fígado [12, 27].

3.3. Distribuição mundial de variantes patogênicas em *ALDOB*:

A maioria das mutações descritas em pacientes com IHF são privadas ou restritas a um grupo étnico. Contudo, cinco variantes são mundialmente distribuídas e respondem pela maior parte dos casos identificados: c.178C>T (p.Arg60Ter), c.360_363delCAAA (p.Asn120Lysfs*32), c.448G>C (p.Ala150Pro), c.524C>A (p.Ala175Asp) e c.1005C>G (p.Asn335Lys). Assim, a tabela 1 e a figura 2 apresentam a frequência e distribuição das cinco mutações mais prevalentes para cada país e também para os continentes. A tabela 2 mostra a frequência de alelos raros entre as diferentes populações estudadas.

As análises evidenciaram que as variantes p.Ala150Pro, p.Ala175Asp e p.Asn335Lys são as mais frequentes respondendo por cerca de 75% dos alelos descritos em diferentes etnias (tabela 1), corroborando estudos anteriores [28]. A variante p.Ala150Pro é a mais frequente respondendo por 52.4% de todos os alelos identificados mundialmente, com frequência variável entre as diferentes regiões geográficas analisadas (tabela 1 e figura 2).

3.3.1. p.Ala150Pro

A variante p.Ala150Pro foi o primeiro alelo patogênico identificado no gene *ALDOB* de um paciente com IHF de origem judaica [19]. Posteriormente, essa variante foi detectada em 13 de 15 alelos investigados no Reino Unido [29] e concluiu-se que se tratava de um alelo comum naquela população. Outros estudos evidenciaram que essa variante também era comum em outras populações europeias [30] e na América do Norte [31]. Esse alelo foi o único a ser detectado em pacientes de todos os continentes amostrados nos estudos nos quais se basearam essa revisão. A frequência da variante p.Ala150Pro em pacientes varia de 12.9% na Ásia até 72.29% no Norte Europeu (tabela 1 e figura 2) sendo mais relacionada a

indivíduos caucasianos. No continente asiático essa variante foi detectada apenas no Iraque [32] e em um grupo de judeus Ashkenazi residentes em Israel (tabela 1 e figura 2) [5]. Os territórios desses países ficam no leste Mediterrâneo, sendo geograficamente próximos ao continente europeu, o que facilita o fluxo gênico entre essas regiões. Poucos alelos foram descritos em populações asiáticas, mas a variante p.Ala150Pro não foi detectada em países como China, Japão e Índia. Esse dado corrobora com achados genéticos de outras doenças, evidenciando o diferente pool gênico dessas populações em relação a populações europeias, por exemplo [33].

Dados do gnomAD indicam que a variante p.Ala150Pro apresenta uma frequência de 0.003127 na população total tendo alelos detectados em finlandeses (0,4108%), europeus não-finlandeses (0,479%), latinos (0,1391%) e africanos (0,0904%).

Um aspecto interessante é que essa variante apresenta uma frequência na Europa que forma um gradiente crescente do Sul para o Norte, conforme já havia sido observado anteriormente [30]. Esse mesmo perfil também foi observado em outras doenças [34]. Adicionalmente, estudos mostraram que a variante p.Ala150Pro está em desequilíbrio de ligação com um haplótipo (rs681 e rs682) em pacientes com IHF, o que indica que esse alelo apresenta uma única origem [35]. Assim, esse conjunto de dados indica que essa variante tem origem mais provável entre os povos Escandinavos (vikings), os quais invadiram e dominaram vários territórios no continente Europeu entre os séculos VIII e XI, dentre eles o Reino Unido, Norte da França e algumas regiões na Itália e Península Ibérica. Esse alelo se manteve nessas populações e se propagou por deriva genética e efeito fundador [34, 36]. Esse alelo provavelmente chegou aos Estados Unidos e Oceania através da colonização inglesa. No Brasil, esse alelo pode ter chegado no período das grandes navegações (séculos XV e XVI) através de portugueses e/ou espanhóis ou no século XIX com o movimento

migratório de outras populações europeias, como alemães e poloneses [33, 37]. A expansão do domínio da península Ibérica pode ter propagado esse alelo para populações africanas.

3.3.2. p.Ala175Asp

A segunda variante patogênica em *ALDOB* mais frequente é a p.Ala175Asp, a qual responde por ~14% dos alelos identificados em diferentes etnias. Esse alelo foi primeiramente identificado em pacientes da antiga Iugoslávia, Suíça e Itália [30], mas já foi descrito em outros países europeus e também americanos. Os países europeus com maior frequência desse alelo entre pacientes (com mais de 2 alelos avaliados) são: Itália (~29%), Suíça (~24%) e Iugoslávia (~22%). Em relação a Ásia, esse alelo foi detectado apenas em um paciente iraquiano (Sul da Ásia).

No gnomAD esse alelo apresenta uma frequência geral de 0,03001%, tendo alelos detectados em populações europeias não-finlandesas (0,03562%), latinas (0,02928%), africanas (0,004757%) e sul asiáticas (0,03279%).

As frequências desse alelo em pacientes de diferentes populações europeias evidenciam um gradiente crescente do Norte para o Sul (tabela 1 e figura 2), caso contrário do que é observado para p.Ala150Pro. As análises indicam que a variante p.Ala175Asp tem origem provável no Império Romano, se espalhando pelo continente europeu do Sul em direção ao Norte durante a expansão do mesmo, assim como foi evidenciado em outras doenças [38]. No auge de sua expansão, o Império Romano atingiu regiões no Norte da África e Sul da Ásia [39] o que pode explicar a presença desse alelo em amostras dessas regiões geográficas no gnomAD. Os dados mostram uma frequência baixa desse alelo em pacientes da Espanha (5,13%) e do Reino Unido (9,33%) (tabela 1 e figura 2), o que reflete

na frequência desse alelo em pacientes de origem americana (9,51%), os quais foram, principalmente, colonizados por esses países europeus.

3.3.3. p.Asn120Lysfs*32

A variante p.Asn120Lysfs*32 é a terceira mais frequente entre as populações estudadas, contabilizando ~5% de todos os alelos patogênicos identificados. As maiores frequências desse alelo foram observadas entre pacientes da Península Ibérica (~26%) e Brasil (25%) (tabela 1). Nas demais regiões avaliadas a mutação p.Asn120Lysfs*32 esteve presente entre 1% e 6% dos alelos identificados (tabela 1 e figura 2). No gnomAD, este alelo apresenta uma frequência de 0,006981% na população em geral, tendo sido detectado em amostras de europeus não-finlandeses (0,004647%), africanos (0,0119%) e latinos (0,007325%).

Há duas hipóteses que podem explicar a origem desse alelo: (a) ter surgido em um único evento mutacional, espalhando-se para outras populações por deriva genética ou efeito fundador ou (b) ter surgido em diferentes eventos mutacionais apresentando mais de uma origem. Admitindo-se que a primeira hipótese é verdadeira e considerando as frequências observadas entre pacientes e em amostras de bancos de dados, pode-se inferir que essa variante surgiu na península Ibérica, mais precisamente na Espanha. Posto que, em território europeu, essa variante foi também detectada entre pacientes italianos (5,1%), alemães (2,89%), franceses (0,38%) e poloneses (1,92%) (tabela 1 e figura 2). Assim, pode-se imaginar que essa variante tenha surgido na Espanha e tenha se espalhado pelo continente europeu durante a expansão do Império Espanhol que dominou parte dos Países Baixos, França e também Itália entre os séculos XV e XIX, indicando um efeito fundador nessas regiões, conforme já foi visto para mutações em outros genes [40]. O mesmo efeito pode ser

observado quando se analisa a frequência dessa mutação no Brasil e continente americano. O estudo que evidencia um aumento desse e de outros alelos nulos em populações americanas analisou amostras de diferentes países, mas não esclarece a origem exata de cada alelo e/ou genótipo [28], o que não nos permite avaliar se esse alelo foi detectado em pacientes de países de colonização ibérica ou inglesa. Contudo, a presença desse alelo em populações latinas nos bancos de dados genômicos sugere a Península Ibérica como provável origem dessa alteração. No Brasil foram analisados pacientes do estado de Minas Gerais [41]. Esse estado, teve sua colonização iniciada por Bandeirantes (<https://www.mg.gov.br/conheca-minas/historia>), os quais apresentavam diferentes origens, tais como portugueses e espanhóis dentre outros backgrounds europeus [42, 43]. Em conjunto, esses achados podem indicar a origem ibérica desse alelo.

Porém, a segunda hipótese também pode explicar a origem dessa mutação, já que trata-se de uma deleção de 4 pares de bases (5'CAA3') no éxon 4 do gene *ALDOB*. A região em que esse evento mutacional ocorre pode ser classificada como um *hot spot*, pois é uma região repetitiva (5'-GGAACAAACCAAAGAAACCACC-3') o que facilita o deslizamento da DNA polimerase e a ocorrência de mutações do tipo deleção ou inserção [44]. Nesse caso, admite-se que a mesma alteração pode ter surgido em diferentes etnias de modo independente e por isso não se visualiza um efeito fundador atuando na propagação da mesma. Como não há relatos de análises de haplótipos ligados a essa variante, o que poderia auxiliar na elucidação da origem dessa alteração, ambas as hipóteses podem ser verdadeiras.

3.3.4. p.Asn335Lys

O alelo c.1005C>G (p.Asn335Lys) foi o quarto mais frequentemente identificado entre pacientes, presente em aproximadamente 4.2% dos alelos analisados. Essa variante foi detectada principalmente em pacientes de origem europeia apresentando uma frequência entre 2,1% (Alemanha) e 100% (Bósnia) (tabela 1 e figura 2). Em bancos de dados genômicos, essa variante apresenta uma frequência de 0,01047% na população em geral, sendo detectada apenas em Europeus não-finlandeses (0,02323%). Ao analisarmos esses dados conjuntamente, podemos imaginar que a variante p.Ala175Asp tenha surgido na região dos Balcãs. Essa é uma região de muitos conflitos ao longo da história, o que acarretou em vários movimentos emigratórios para outras regiões da Europa, principalmente [45, 46]. Todos esses movimentos migratórios podem ter acarretado na distribuição desse alelo por alguns países do continente europeu e americanos seja por deriva genética ou efeito fundador.

3.3.5. p.Arg60Term

Presente em menos de 2% (0.018) dos alelos identificados entre pacientes, a variante sem sentido p.Arg60Ter é a quinta mais frequente nos estudos analisados. A variante c.178C>T (p.Arg60Ter) está localizada em um dinucleotídeo CpG, o que pode se considerar uma região *hot spot* quando essa citosina é metilada. Posto que a 5-metilcitosina pode ser desaminada à timina, o que pode induzir uma mutação do tipo transição, se houver falhas no mecanismo de reparo [47].

Essa variante foi detectada apenas em países americanos e europeus: Alemanha (1,45%), Áustria (16,67%), França (1,92%), Reino Unido (1,33%), Brasil (25%) e EUA (7,69%) (tabela 1 e figura 2). No gnomAD a frequência desse alelo é de 0,01257% para a

população em geral, estando distribuída nas seguintes populações: europeus finlandeses (0,02169%) e não-finlandeses (0,009551%), latinos (0,01464%) e africanos (0,002383%).

Em razão da distribuição no continente europeu, podemos imaginar que essa variante tenha surgido no leste europeu tendo se disseminado para Alemanha e França, formando um gradiente de Leste para Oeste. Possivelmente, esse alelo pode ter chegado ao Reino Unido a partir da Invasão Normanda no século XI. Padrões de frequência semelhantes foram observados em pacientes europeus com a síndrome de Smith-Lemli-Opitz [48]. A partir daí, um efeito fundador e cruzamentos preferenciais de acordo com origem ou religião [49] podem estar atuando na manutenção da frequência desse alelo em populações americanas (3,64%).

3.3.6. Outras variantes:

Entre as demais variantes de *ALDOB*, a mutação de sentido trocado p.Ala338Val é amplamente distribuída, tendo alelos detectados na França (1,9%), América (0,75%), Turquia (7,1%) e Índia (10,53%) (figura 2). No gnomAD esse alelo está presente em diferentes populações, como europeus não-finlandeses (0,001549%) e africanos (0,03093%). Além disso, é o único alelo presente em asiáticos do leste (0,06386%) e do Sul (0,09901%). É possível inferir que esse alelo tenha origem no Império Otomano e se disseminado entre diferentes populações durante a expansão do mesmo [50].

O continente asiático mostrou um perfil genético bastante distinto dos demais continentes (figura 2), sendo que o país com maior número de alelos analisados foi a Índia (19 alelos). Com um perfil bastante heterogêneo, dentre as seis variantes detectadas em pacientes indianos, a mutação em sítio de splicing c.324+1G>A responde por 45% dos alelos identificados (tabela 2). Essa foi considerada uma variante fundadora em Agarwal, uma

comunidade ao Norte da Índia [51]. Em geral, essas comunidades apresentam altas taxas de casamentos consanguíneos, o que contribui para a disseminação de alelos patogênicos em doenças genéticas de herança autossômica recessiva como a IHF [51], dentre outras já reportadas [52]. Em outros países asiáticos, poucos alelos foram descritos, sendo que no Japão e na Coreia foram descritas duas mutações detectadas em homozigose p.Cys240Ter [53] e p.(Thr255Asnfs*23) [54], respectivamente (tabela 2). Ambas alterações não foram detectadas no gnomAD. Esses achados corroboram com um estudo em pacientes com hiperfenilalaninemia por deficiência de BH4, o qual mostrou que mutações identificadas em pacientes do leste asiático tendem a ser mais restritas a determinadas regiões geográficas [55].

De modo geral, a Europa apresenta uma homogeneidade alélica para determinadas regiões, como já foi descrito para populações da Dinamarca [56] e Alemanha [57]. Porém, a análise conjunta dos dados evidencia uma heterogeneidade alélica acentuada na Itália, em que foram descritos 19 alelos diferentes entre os 138 analisados. É importante ressaltar que na presente revisão, a Itália foi considerada como um todo, não distinguindo as regiões geográficas do território. Contudo, estudos têm evidenciado que a Itália apresenta um perfil genético bastante particular e heterogêneo quando se comparam as diferentes regiões do país [58–60].

3.4. Estimativa da prevalência de IHF:

Na Suíça, a prevalência da IHF foi estimada em 1:20.000, a partir da detecção de cinco casos entre 96.000 nascidos-vivos [citado por 61]. Mais tarde, o conhecimento das mutações mais frequentes possibilitou a triagem de neonatos e a estimativa da prevalência da doença a partir de dados de frequência de portadores de alelos patogênicos aplicando-se

os princípios de Hardy-Weinberg. Dessa forma, a análise de 2050 recém-nascidos detectou a presença de 27 portadores da variante p.Ala150Pro, resultando em uma prevalência 1:23.000 no Reino Unido [61]. A mesma abordagem foi aplicada em um estudo com a população polonesa (n=1049) e evidenciou uma frequência de portadores de 1:131 e prevalência de 1:31.000 nessa população [62]. A triagem das três mutações mais frequentes (p.Ala150Pro, p.Ala175Asp e p.Asn335Lys) entre 2.000 neonatos alemães resultou em uma frequência de portadores igual a 1:95. A prevalência estimada foi de 1:36.300 (1:17.500-1:110.000), sendo que a correção para alelos menos frequentes resultou em 1:26.100 (1:12.600 – 1:79.000) [63].

As informações disponibilizadas em bancos de dados genômicos podem ser usadas seguindo os mesmos princípios aplicados nos estudos anteriormente citados para estimar a prevalência de doenças genéticas, principalmente monogênicas e recessivas [64, 65]. Assim, a prevalência de IHF foi estimada utilizando duas abordagens para seleção das variantes analisadas e os resultados estão resumidos na tabela 3.

Os dados evidenciam uma grande diferença entre as abordagens aplicadas, de modo que a prevalência para a população total foi estimada em 1:11.082 pela abordagem 1 e em 1:52.311 pela abordagem 2 (tabela 3). A prevalência estimada para europeus pelo método 2 (1:26.590) está próxima daquela mostrada em estudos de triagem genética entre alemães e poloneses [62, 63], corroborando estudos anteriores que mostraram que essa abordagem pode ser aplicada para determinar a prevalência de doenças monogênicas [64, 66]. Contudo, deve-se considerar que a maior parte das mutações descritas em *ALDOB* foram detectadas em pacientes europeus. Por isso, a semelhança entre os resultados dos estudos anteriormente citados e a presente análise.

A estimativa da prevalência baseada em dados genéticos, seja por triagem neonatal de alelos específicos ou análise de bancos de dados genômicos populacionais, é maior quando corrigida para alelos menos frequentes ou alelos que não foram descritos em pacientes [63, 65]. Assim, a abordagem 1 fornece mais informações acerca de populações subrepresentadas em bancos de dados genômicos, pois pouco se conhece a respeito das variantes envolvidas na patogênese de IHF nessas populações.

Os dados mostram dois vieses importantes nessas análises. Primeiro, as análises de prevalência que consideram apenas os alelos conhecidoamente envolvidos com a patogênese da doença são mais realistas quando se conhece muito bem o perfil genético da população-alvo. Além disso, quando se trata da estimativa de prevalência a partir da frequência de portadores em bancos de dados genômicos faz-se necessário que a população estudada esteja bem representada em bancos de dados de populações controle. É o caso da população europeia, pois 65% dos pacientes com IHF descritos na literatura têm origem no velho continente (tabela 1 e 3), bem como é a população melhor amostrada no gnomAD v.2.1.1 (~50%). Isso aproxima a estimativa baseada em bancos de dados genômicos daquela calculada a partir da triagem neonatal de alelos específicos [62, 63]. Contudo, essa abordagem pode acarretar em uma subestimativa da prevalência da doença, sendo mais visível em outras populações, como os asiáticos por exemplo. Pouco se conhece a respeito das variantes patogênicas associadas a IHF nessas populações e, além disso, essas estão subamostradas no gnomAD (cerca de 4%), assim como outras.

O segundo viés é a inclusão de alelos não descritos em pacientes nas análises, a partir de uma predição de patogenicidade de dados de sequenciamento massivo paralelo depositados em bancos de dados [65]. Isso, adiciona o viés da classificação de variantes, pois há relatos de mutações preditas como patogênicas quando essas são benignas e vice-

versa [67]. Além disso, estudos têm mostrado que a combinação de diferentes ferramentas preditoras não é suficiente para sanar as falhas intrínsecas a essa abordagem seja em variantes em regiões codificantes ou não-codificantes [67, 68]. Adicionalmente, há de se considerar que há critérios desenvolvidos pelo *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMGG) para a classificação adequada de variantes como patogênicas [69]. Nesse contexto, a predição de patogenicidade por softwares é apenas um dos muitos critérios utilizados nessa classificação. Assim, a inclusão de alelos baseados apenas na predição *in silico* nas análises de prevalência pode acarretar em um efeito contrário do anterior, e levar a uma superestimativa desse parâmetro. Adicionalmente, há de se considerar que muitos alelos não apresentam penetrância completa, de modo que é variável a manifestação fenotípica dessas variantes e que isso não há como ser predito. Outro aspecto relevante à essas análises é que não há como saber se existem heterozigotos compostos descritos em bancos de dados genômicos, o que é relevante para os cálculos de estimativa. Nesse contexto, a melhor abordagem para estudos de estimativa de prevalência a partir da frequência de heterozigotos depende dos dados disponíveis acerca da população-alvo e de quão representada essa está em bancos de dados genômicos.

6. Conclusão:

A IHF se apresenta como uma doença mundialmente distribuída, com aspectos genéticos distintos entre as populações. De modo geral, as variantes patogênicas em *ALDOB* estavam submetidas a uma baixa pressão de seleção até a Revolução Industrial, já que o consumo de frutose antes desse período era bastante reduzido, em comparação a dieta ocidental atual [70]. Isso pode ter favorecido a disseminação desses alelos por deriva genética e efeito fundador entre as diferentes populações. Além disso, deve-se considerar

que o desenvolvimento de meios de locomoção, facilitou atravessar grandes distâncias, o que propicia o fluxo gênico entre populações de diferentes continentes levando a disseminação de alelos.

Outros aspectos devem ser considerados quando analisamos a prevalência e a frequência de alelos patogênicos em IHF. O ponto principal é que pacientes desenvolvem uma fobia bastante forte aos alimentos nocivos à sua saúde, isso faz com que esses ao não consumir frutose não manifestem sintomas e permaneçam sem diagnóstico da doença. Nesse contexto, as populações orientais apresentam um consumo menor de sacarose (glicose mais frutose) e frutose [71], o que pode colaborar para o sub diagnóstico em populações asiáticas.

A IHF apresenta um tratamento efetivo e de fácil acesso, o qual conduz a um bom prognóstico, se seguido adequadamente. Nesse sentido, a análise genética oferece um método diagnóstico rápido, seguro e pouco invasivo para o paciente. Assim, conhecer os alelos mais frequentemente envolvidos na patogênese da doença em cada população pode indicar alternativas eficazes e mais acessíveis financeiramente para o diagnóstico. Pois, em muitos países a análise direcionada à detecção de alelos específicos pode resolver a maioria dos casos com suspeita clínica.

Esse é o primeiro estudo de prevalência de IHF a partir de bancos de dados genômicos e que apresenta estimativas de prevalência para populações pouco representadas na literatura disponível sobre a doença. Além disso, revisamos de forma detalhada a distribuição de variantes patogênicas em *ALDOB* e traçamos um panorama mundial da doença. Infelizmente, não pudemos detalhar melhor os aspectos genéticos da doença em populações orientais e africanas em razão da inexistência ou escassez de dados a respeito dessas populações. Dessa forma, os dados mostram a necessidade de aumentar a amostragem de populações sub-representadas nos bancos de dados genômicos para que se possa estimar

a prevalência de doenças recessivas, a partir da frequência de heterozigotos de forma mais fidedigna.

7. Agradecimentos:

Os autores agradecem ao FIPE-HCPA, CAPES, CNPq, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular - UFRGS pelo apoio.

8. Referências:

1. Heinz F, Lamprecht W, Kirsch J (1968) Enzymes of fructose metabolism in human liver. *J Clin Invest* 47:1826–1832. <https://doi.org/10.1172/JCI105872>
2. Chambers RA, Pratt RTC (1956) Idiosyncrasy to fructose. *Lancet* August 18:340. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(56\)92196-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(56)92196-1)
3. Froesch ER, Wolf HP, Baitsch H (1963) Hereditary Fructose Intolerance. An Inborn Defect of Hepatic Fructose-1-Phosphate Splitting Aldolase. *Am J Med* 34:151–167. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(63\)90050-0](https://doi.org/10.1016/0002-9343(63)90050-0)
4. Ali M, Rellos P, Cox TM (1998) Hereditary fructose intolerance. *J Med Genet* 35:353–365
5. Cox TM (1994) Aldolase B and fructose intolerance. *FASEB J* 8:62–71
6. Buziau AM, Schalkwijk CG, Stehouwer CDA, et al (2019) Recent advances in the pathogenesis of hereditary fructose intolerance : implications for its treatment and the understanding of fructose - induced non - alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci*. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03348-2>
7. Toland DR (1995) Molecular Basis of Hereditary Fructose Intolerance : Mutations and Polymorphisms in the Human Aldolase B Gene. *Hum Mutat* 6:210–218

8. González-Pérez A, López-Bigas N (2011) Improving the assessment of the outcome of nonsynonymous SNVs with a consensus deleteriousness score, *Condel. Am J Hum Genet* 88:440–449. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.03.004>
9. NCBI (2004) Gene [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>. Accessed 5 Dec 2019
10. Dalby AR, Tolan DR, Littlechild JA (2001) The structure of human liver fructose-1, 6-bisphosphate aldolase. *Biol Crystallogr* D57:1526–1533
11. Huret JL, Ahmad M, Arsaban M, et al (2013) Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology in 2013. *Nucleic Acids Res* 41:920–924. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1082>
12. Coffe EM, Tolan DR (2010) Mutations in the promoter region of the Aldolase B gene that cause Hereditary Fructose Intolerance. *J Inhe* 33:715–725. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9192-5>
13. Belinky F, Nativ N, Stelzer G, et al (2015) PathCards: Multi-source consolidation of human biological pathways. *Database* 2015:1–13. <https://doi.org/10.1093/database/bav006>
14. Paolella G, Santamaria R, Izzo P, et al (1984) Isolation and nucleotide sequence of a full-length cDNA coding for aldolase B from human liver. *Nucleic Acids Res* 12:7401–7410
15. Mukai T, Yatsuki H, Arai Y, et al (1987) Human Aldolase B Gene: Characterization of the Genomic Aldolase B Gene and Analysis of Sequences Required for Multiple Polyadenylations. *J Biochem* 102:1043–1051. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122142>

16. Pezza JA, Choi KH, Berardini TZ, et al (2003) Spatial clustering of isozyme-specific residues reveals unlikely determinants of isozyme specificity in fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *J Biol Chem* 278:17307–17313. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209185200>
17. El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, et al (2019) The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res* 47:D427–D432. <https://doi.org/10.1093/nar/gky995>
18. Cox TM, O'Donnell MW, Camilleri M, Burghes AH (1983) Isolation and characterization of a mutant liver aldolase in adult hereditary fructose intolerance. Identification of the enzyme variant by radioassay in tissue biopsy specimens. *J Clin Invest* 72:201–213
19. Cross NCP, Tolan DR, Cox TM (1988) Catalytic deficiency of human aldolase B in hereditary fructose intolerance caused by a common missense mutation. *Cell* 53:881–885. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(88\)90349-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(88)90349-2)
20. Rellos P, Ali M, Vidailhet M, et al (1999) Alteration of substrate specificity by a naturally-occurring aldolase B mutation (Ala337-->Val) in fructose intolerance. *Biochem J* 327:321–327. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3400321>
21. Rellos P, Sygusch J, Cox TM (2000) Expression , Purification , and Characterization of Natural Mutants of Human Aldolase B. *J Biol Chem* 275:1145–1151
22. Esposito G, Vitagliano L, Santamaria R, et al (2002) Structural and functional analysis of aldolase B mutants related to hereditary fructose intolerance. *FEBS Lett* 531:152–156. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03451-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03451-8)
23. Esposito G, Santamaria R, Vitagliano L, et al (2004) Six Novel Alleles Identified in Italian Hereditary Fructose Intolerance Patients Enlarge the Mutation Spectrum of the Aldolase B Gene. *Hum Mutat* 761:1–8. <https://doi.org/10.1002/humu.9290>

24. Malay AD, Allen KN, Tolan DR (2005) Structure of the Thermolabile Mutant Aldolase B , A149P : Molecular Basis of Hereditary Fructose Intolerance. *J Mol Biol* 347:135–144. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.01.008>
25. Santamaria R, Esposito G, Vitagliano L, et al (2000) Functional and molecular modelling studies of two hereditary fructose intolerance-causing mutations at arginine 303 in human liver aldolase. *Biochem J* 350 Pt 3:823–828. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3500823>
26. Li N, Chang G, Xu Y, et al (2017) Clinical and molecular characterization of patients with fructose 1,6-bisphosphatase deficiency. *Int J Mol Sci* 18:1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms18040857>
27. Fuxman Bass JI, Sahni N, Shrestha S, et al (2015) Human gene-centered transcription factor networks for enhancers and disease variants. *Cell* 161:661–673. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.003>
28. Coffe EM, Coffee EM, Yerkes L, et al (2010) Increased prevalence of mutant null alleles that cause hereditary fructose intolerance in the American population. *J Inherit Metab Dis* 33:33–42. <https://doi.org/10.1007/s10545-009-9008-7>
29. Cross NCP, Cox TM (1989) Molecular analysis of aldolase b genes in the diagnosis of hereditary fructose intolerance in the united kingdom. *Qjm* 73:1015–1020. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.qjmed.a068388>
30. Cross NCPP, Franchis R de, Sebastio G, et al (1990) Molecular analysis of aldolase B genes in hereditary fructose intolerance. *Lancet* 335:306–309. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)90603-3](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)90603-3)
31. Tolan DR, Brooks CC (1992) Molecular analysis of common aldolase B alleles for hereditary fructose intolerance in North Americans. *Biochem Med Metab Biol* 48:19–

25. [https://doi.org/10.1016/0885-4505\(92\)90043-X](https://doi.org/10.1016/0885-4505(92)90043-X)
32. Kullberg-Lindh C, Hannoun C, Lindh M (2002) Simple method for detection of mutations causing hereditary fructose intolerance. *J Inher Metab Dis* 25:571–575
33. Poletto E, Pasqualim G, Giugliani R, et al (2018) Worldwide distribution of common IDUA pathogenic variants. 95–102. <https://doi.org/10.1111/cge.13224>
34. Milman N, Pedersen P (2003) Evidence that the Cys282Tyr mutation of the HFE gene originated from a population in Southern Scandinavia and spread with the Vikings. *Clin Genet* 64:36–47. <https://doi.org/10.1034/j.1399-0004.2003.00083.x>
35. Brooks CC, Tolan DR (1993) Association of the widespread A149P hereditary fructose intolerance mutation with newly identified sequence polymorphisms in the aldolase B gene. *Am J Hum Genet* 52:835–840
36. Mcfarlane RM (2002) Clinical Perspective On the Origin and Spread of Dupuytren ' s Disease. 385–390. <https://doi.org/10.1053/jhsu.2002.32334>
37. Urreiziti R, Asteggiano ÆC, Bermudez ÆM, et al (2006) The p . T191M mutation of the CBS gene is highly prevalent among homocystinuric patients from Spain , Portugal and South America. 305–313. <https://doi.org/10.1007/s10038-006-0362-0>
38. Russo R, Gambale A, Esposito MR, et al (2011) Two founder mutations in the SEC23B gene account for the relatively high frequency of CDA II in the Italian population. *Am J Hematol* 86:727–732. <https://doi.org/10.1002/ajh.22096>
39. Arnason JP, Raaflaub KA (2011) *The Roman Empire in Context: Historical and Comparative Perspectives*. Wiley-Blackwell, Chichester; Malden
40. Vega A, Campos B, Bressac-de-Paillerets B, et al (2001) The R71G BRCA1 is a founder Spanish mutation and leads to aberrant splicing of the transcript. *Hum Mutat* 17:520–521. <https://doi.org/10.1002/humu.1136>

41. Valadares ER, Cruz AF Da, Adelino TER, et al (2015) Hereditary fructose intolerance in Brazilian patients. *Mol Genet Metab Reports* 4:35–38. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2015.05.007>
42. Hennessy A (1993) The Nature of the Conquest and the Conquistadors. *Proc Br Acad* 81:5–36
43. Kehdy FSG, Gouveia MH, Machado M, et al (2015) Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. *PNAS* 112:8696–8701. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504447112>
44. Kikawa Y, Inuzuka M, Jin BY, et al (1997) Identification of genetic mutations in Japanese patients with fructose- 1,6-bisphosphatase deficiency. *Am J Hum Genet* 61:852–861
45. Franek M (2017) Description of the most important wars , which took place on Balkan territory. *Izzivi prihodnosti/ Challenges Futur* 2:27–43
46. Bonifazi C, Mamolo M (2004) Past and current trends of Balkan migrations. *Espace-Populations-Societes* 519–531. <https://doi.org/10.4000/eps.356>
47. Holliday R, G. W. Grigg (1993) DNA methylation and mutation. *Mutat Res* 285:61–67. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(93\)90052-h](https://doi.org/10.1016/0027-5107(93)90052-h)
48. Witsch-Baumgartner M, Ciara E, Löffler J, et al (2001) Frequency gradients of DHCR7 mutations in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome in Europe: Evidence for different origins of common mutations. *Eur J Hum Genet* 9:45–50. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200579>
49. De Oliveira MZ, Schüler-Faccini L, Demarchi DA, et al (2013) So Close, So Far Away: Analysis of Surnames in a Town of Twins (Cândido Godói, Brazil). *Ann Hum Genet* 77:125–136. <https://doi.org/10.1111/ahg.12001>

50. Goffman D (2012) *The Ottoman Empire and Early Modern Europe* (New approaches to European History). Cambridge University Press
51. Bijarnia-mahay S, Movva S, Gupta N, et al (2015) Molecular Diagnosis of Hereditary Fructose Intolerance : Founder Mutation in a Community from India. *JIMD Rep* 85–93. https://doi.org/10.1007/8904_2014_374
52. Ankala A, Kohn JN, Dastur R, et al (2012) ANCESTRAL FOUNDER MUTATIONS IN CALPAIN-3 IN THE INDIAN AGARWAL COMMUNITY : HISTORICAL , CLINICAL , AND MOLECULAR PERSPECTIVE. *Muscle Nerve* 47:931–937. <https://doi.org/10.1002/mus.23763>
53. Kajihara S, Mukai T, Arai Y, et al (1990) Hereditary fructose intolerance caused by a nonsense mutation of the aldolase B gene. *Am J Hum Genet* 47:562–567
54. Choi HW, Lee YJ, Oh SH, et al (2012) A novel frameshift mutation of the ALDOB gene in a Korean girl presenting with recurrent hepatitis diagnosed as hereditary fructose intolerance. *Gut Liver* 6:126–128. <https://doi.org/10.5009/gnl.2012.6.1.126>
55. Chiu Y, Chang Y, Chang Y, et al (2012) Mutation spectrum of and founder effects affecting the PTS gene in East Asian populations. *J Hum Genet* 145–152. <https://doi.org/10.1038/jhg.2011.146>
56. Athanasiadis G, Cheng JY, Als TD, et al (2016) Nationwide Genomic Study in Denmark Reveals. *204*:711–722. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.189241>
57. Steffens M, Lamina C, Illig T, et al (2006) SNP-Based Analysis of Genetic Substructure in the German Population. *Hum Hered* 62:20–29. <https://doi.org/10.1159/000095850>
58. Rendine S, Calafell F, Cappello N, et al (1997) Genetic history of cystic fibrosis mutations in Italy . I . Regional distribution. 411–424

59. Candore G, Mantovani V, Balistreri CR, et al (2002) Frequency of the HFE Gene Mutations in Five Italian Populations. 29:267–273. <https://doi.org/10.1006/bcmd.2002.0567>
60. Raveane A, Aneli S, Montinaro F, et al (2019) Population structure of modern-day Italians reveals patterns of ancient and archaic ancestries in Southern Europe. *Sci Adv* 5:1–13. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw3492>
61. James CL, Rellos P, Ali M, et al (1996) Neonatal screening for hereditary fructose intolerance: frequency of the most common mutant aldolase B allele (A149P) in the British population. *J Med Genet* 33:837–41
62. Gruchota J, Pronicka E, Korniszewski L, et al (2006) Aldolase B mutations and prevalence of hereditary fructose intolerance in a Polish population. *Mol Genet Metab Reports* 87:376–378. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.11.010>
63. Santer R, Rischewski J, von Weihe M, et al (2005) The Spectrum of Aldolase B (ALDOB) Mutations and the Prevalence of Hereditary Fructose Intolerance in Central Europe. *Hum Mutat* 25:594. <https://doi.org/10.1002/humu.9343>
64. Schrodi SJ, DeBarber A, He M, et al (2015) Prevalence estimation for monogenic autosomal recessive diseases using population-based genetic data. *Hum Genet* 134:659–669. <https://doi.org/10.1007/s00439-015-1551-8>
65. Brezavar D, Bonnen PE (2019) Incidence of PKAN determined by bioinformatic and population-based analysis of ~ 140 , 000 humans. *Mol Genet Metab* 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.09.002>
66. Fujikura K (2016) Global Carrier Rates of Rare Inherited Disorders Using Population Exome Sequences. *PLoS One* 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155552>
67. Ernst C, Hahnen E, Engel C, et al (2018) Performance of in silico prediction tools for

- the classification of rare BRCA1 / 2 missense variants in clinical diagnostics. 1–10
68. Liu L, Sanderford MD, Patel R, Chandrashekar P pathogenicity of noncoding variants. *Nat Commun*. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08270-y>
 69. Nykamp K, Anderson M, Powers M, et al (2017) Sherlock: a comprehensive refinement of the ACMG – AMP variant classification criteria. *Genet Med* 19:1105–1117. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.37>
 70. Lustig RH (2010) Fructose: metabolic, hedonic, and societal parallels with ethanol. *J Am Diet Assoc* 110:1307–1321. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2010.06.008>
 71. Fujiwara A, Murakami K, Asakura K, et al (2018) Estimation of Starch and Sugar Intake in a Japanese Population Based on a Newly Developed Food Composition Database. *Nutrients* 10:1474. <https://doi.org/10.3390/nu10101474>
 72. Ferri L, Caciotti A, Cavicchi C, et al (2012) Integration of PCR-Sequencing Analysis with Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification for Diagnosis of Hereditary Fructose Intolerance. *JIMD Rep* 4:31–37. https://doi.org/10.1007/8904_2012_125
 73. Souza M de, Lindeman R, Volpato F, et al (1990) Mutation of aldolase B genes in hereditary fructose intolerance. *Lancet* 335:973. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)90969-c](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)90969-c)
 74. Wilson JD, Robertson T, Whiley M (1995) Hereditary fructose intolerance in an adult. *Aust N Z J Med* 25:1994–1995
 75. Cross NCP, Stojanov LM, Cox TM (1990) A new aldolase B variant, N334K, is a common cause of hereditary fructose intolerance in Yugoslavia. *Nucleic Acids Res* 18:1925. <https://doi.org/10.1093/nar/18.7.1925>
 76. Ali M, Tunçman G, Cross NCP, et al (1994) Null alleles of the aldolase B gene in patients with hereditary fructose intolerance. *J Med Genet* 31:499–503.

- <https://doi.org/10.1136/jmg.31.6.499>
77. Santer R, Rischewski J, von Weihe M, et al (2005) The spectrum of aldolase B (ALDOB) mutations and the prevalence of hereditary fructose intolerance in Central Europe. *Hum Mutat* 25:594. <https://doi.org/10.1002/humu.9343>
 78. Chi Z, Hong J, Yang J, et al (2007) Clinical and genetic analysis for a Chinese family with hereditary fructose intolerance. *Endocrine* 32:122–126. <https://doi.org/10.1007/s12020-007-9013-2>
 79. Morales-alvarez MC, Ricardo-silgado ML, Lemus HN, et al (2019) Fructosuria and recurrent hypoglycemia in a patient with a novel c . 1693T > A variant in the 3 ' untranslated region of the aldolase B gene. 0–4. <https://doi.org/10.1177/2050313X18823098>
 80. Davit-spraul A, Costa C, Zater M, et al (2008) Hereditary fructose intolerance : Frequency and spectrum mutations of the aldolase B gene in a large patients cohort from France — Identification of eight new mutations. *Mol Genet Metab* 94:443–447. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2008.05.003>
 81. Costa C, Costa JM, Deleuze J-F, et al (1998) Simple, Rapid Nonradioactive Method to Detect the Three Most Prevalent Hereditary Fructose Intolerance Mutations. *Clin Chem* 44:1041–1043. <https://doi.org/9590379>
 82. Hillebrand G, Schneppenheim R, Oldigs HD, Santer R (2000) Hereditary fructose intolerance and alfa-1 antitrypsin deficiency. *Arch Dis Child* 83:72–73. <https://doi.org/10.1136/adc.83.1.72>
 83. Prisca DX, Lozzo D, Rizzo D, Fabio DX (2018) When Long-Lasting Food Selectivity Leads to an Unusual Genetic Diagnosis : A Case Report. *J Adolesc Heal* 000:1–2. <https://doi.org/10.1016/j.jadohealth.2018.07.014>

84. Santamaria R, Vitagliano L, Tamasi S, et al (1999) Novel six-nucleotide deletion in the hepatic fructose-1, 6-bisphosphate aldolase gene in a patient with hereditary fructose intolerance and enzyme structure-function implications. *Eur J Hum Genet* 7:409–414. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200299>
85. Ali M, Rosien U, Cox TM (1993) DNA diagnosis of fatal fructose intolerance from archival tissue. *Q J Med* 86:25–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.qjmed.a068733>
86. Dato F Di, Spadarella S, Puoti MG, et al (2019) Daily Fructose Traces Intake and Liver Injury in Children with Hereditary Fructose Intolerance. *Nutrients* 11:1–12. <https://doi.org/10.3390/nu11102397>
87. Cross NCP, Cox TM, de Franchis R, et al (1990) Molecular analysis of aldolase B genes in hereditary fructose intolerance. *Lancet* 335:306–309. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)90603-3](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)90603-3)
88. Sebastio G, de Franchis R, Strisciuglio P, et al (1991) Aldolase B mutations in Italian families affected by hereditary fructose intolerance. *J Med Genet* 28:241–3. <https://doi.org/10.1136/jmg.28.4.241>
89. Santamaria R, Scarano MI, Esposito G, et al (1993) The Molecular Basis of Hereditary Fructose Intolerance in Italian Children. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 31:675–678. <https://doi.org/10.1515/cclm.1993.31.10.675>
90. Santamaria R, Tamasi S, Piano G Del, et al (1996) Molecular basis of hereditary fructose intolerance in Italy: identification of two novel mutations in the aldolase B gene. *J Med Genet* 33:786–788. <https://doi.org/10.1136/jmg.33.9.786>
91. Ali M, Sebastio G, Cox TM (1994) Identification of a novel mutation (Leu 256—Pro) in the human aldolase B gene associated with hereditary fructose intolerance. *Hum*

- Mol Genet 3:203–204. <https://doi.org/10.1093/hmg/3.1.203>
92. Caciotti A, Alice M, Adami A, et al (2008) Different genotypes in a large Italian family with recurrent hereditary fructose intolerance. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 20:118–121
 93. Ali M, James CL, Cox M (1996) A Newly Identified Adolase B Splicing Mutation (G-->C, 5 ' intron 5) in Hereditary Fructose Intolerance From New Zealand. *Hum Mutat* 7:155–157. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1996\)7:2<155::AID-HUMU11>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1996)7:2<155::AID-HUMU11>3.0.CO;2-1)
 94. Larsen K, Adnanes O, Aarskog NK, et al (1994) [Congenital fructose intolerance. New molecular aspects]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 114:3312–3314
 95. Brandão C, Pedrosa C, Oliveira L, et al (2002) Intolerância Hereditária à Frutose : A Propósito de Dois Casos Clínicos. *Acta Pedriatica Port* 33:213–216
 96. Sánchez-Gutiérrez JC, Benlloch T, Leal MA, et al (2002) Molecular analysis of the aldolase B gene in patients with hereditary fructose intolerance from Spain. *J Med Genet* 39:e56. <https://doi.org/10.1136/jmg.39.9.e56>
 97. Vega AI, Medrano C, Navarrete R, et al (2016) Original Research Article Molecular diagnosis of glycogen storage disease and disorders with overlapping clinical symptoms by massive parallel sequencing. *Genet Med* 1–7. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.217>
 98. Aldamiz-Echevarria L, Heras J de las, Couce ML, et al (2019) Clinical Nutrition Non-alcoholic fatty liver in hereditary fructose intolerance. *Clin Nutr* 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.02.019>
 99. Long WW, Pawel B, Morrow G (1997) Pathological Case of the Month. Hereditary Fructose Intolerance. *Arch Pediatr Adolesc Med* 151:1165–1166.

<https://doi.org/10.1001/archpedi.1997.02170480095017>

100. DURSUN1 A, KALKANOGLU HS, COSYKUN T, et al (2001) Mutation analysis in Turkish patients with hereditary fructose intolerance. *J Inherit Metab Dis* 24:523–526
101. Karabulut HG, Halsall DJ, Sayin BD, et al (2006) Aldolase b mutations in Turkish families from Central Anatolia. *Genet Couns* 17:457–460
102. Kriegshäuser G, Halsall D, Rauscher B, Oberkanins C (2007) Semi-automated , reverse-hybridization detection of multiple mutations causing hereditary fructose intolerance. *Mol Cell Probes* 21:226–228. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2007.01.001>
103. Brooks CC, Tolan DR (1994) A partially active mutant aldolase B from a patient with hereditary fructose intolerance. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 8:107–113. <https://doi.org/10.1096/fasebj.8.1.8299883>
104. Ali M, Cox TM (1995) Diverse mutations in the aldolase B gene that underlie the prevalence of hereditary fructose intolerance. *Am J Hum Genet* 56:1002–5
105. STORMON MO, CUTZ E, FURUYA K, et al (2004) A six-month-old infant with liver steatosis. *J Pediatr* 144:258–263. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2003.11.037>
106. Kaiser UB, Hegele RA (1991) Case Report: Heterogeneity of Aldolase B in Hereditary Fructose Intolerance. *Am J Med Sci* 302:364–368. <https://doi.org/10.1097/00000441-199112000-00008>
107. Brooks CC, Buist N, Tuerckt J, Tolan DR (1991) Identification of a Splice-Site Mutation in the Aldolase B Gene from an Individual with Hereditary Fructose Intolerance. *Am J Hum Genet* 49:1075–1081
108. Davit-spraul A, Costa C, Zater M, et al (2008) Hereditary fructose intolerance : Frequency and spectrum mutations of the aldolase B gene in a large patients cohort

from France — Identification of eight new mutations. *Mol Genet Metab* 94:443–447.
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2008.05.003>

109. Brooks CC, Buist N, Tuerck J, et al (1991) Identification of a Splice-Site Mutation in the Aldolase B Gene from an Individual with Hereditary Fructose Intolerance. *Am J Hum Genet* 49:1075–1081

Tabela 1 – Distribuição mundial das variantes patogênicas mais comuns em *ALDOB* descritas na literatura,

Localização	Número de alelos	Frequência de variantes (número de alelos)					
		p,Arg60Term	p,Asn120Lysfs*32	p,Ala150Pro	p,Ala175Asp	p,Asn335Lys	Outras/não identificadas
Albânia	2[70]				0,5 (1)		0,5 (1)
Alemanha	138 [75, 80]	0,014493 (2)	0,028986 (4)	0,688406 (95)	0,115942 (16)	0,021739 (3)	0,130435 (18)
Austrália	10[71, 72]			0,8 (8)			0,2 (2)
Áustria	6[5, 73, 74]	0,1666667 (1)		0,333333 (2)		0,333333 (2)	0,1666667 (1)
Bósnia	8[75]					1 (8)	
Brasil	8 [40]	0,25 (2)	0,25 (2)	0,125 (1)	0,375 (3)		
China	2[76]						1 (2)
Colômbia	2[77]						1 (2)
Coreia	2[53]						1 (2)
Espanha	76[94–96]		0,263158 (20)	0,618421 (47)	0,052632 (4)	0,039474 (3)	0,026316 (2)
Estados Unidos da América (EUA)	13[81, 101–103]	0,076923 (1)	0,076923 (1)	0,307692 (4)	0,230769 (3)		0,307692 (4)
França	261[5, 73, 74, 78, 79]	0,019157 (5)	0,003831 (1)	0,689655 (180)	0,157088 (41)	0,034483 (9)	0,095785 (25)
Índia	19[27, 50]		0,052632 (1)				0,947368 (18)
Iraque	2[31]			0,5 (1)	0,5 (1)		
Israel (Ashkenazi)	4[5]			0,75 (3)			0,25 (1)
Itália	235[5, 22, 87–90, 24, 70, 81–86]		0,051064 (12)	0,4 (94)	0,289362 (68)	0,051064 (12)	0,208511 (49)
Iugoslávia	14[73, 81]			0,285714 (4)	0,214286 (3)	0,5 (7)	
Japão	2[52]						1 (2)
Noruega	4[92]			1 (4)			
Nova Zelândia	2[91]			0,5 (1)			0,5 (1)
Polônia	52[61]		0,019231 (1)	0,673077 (35)	0,057692 (3)		0,25 (13)
Portugal	4[93]		0,25 (1)	0,5 (2)			0,25 (1)
Reino Unido	73[5, 28, 81, 100]	0,0133333 (1)	0,026667 (2)	0,706667 (53)	0,093333 (7)	0,08 (6)	0,08 (6)
Suécia	2[31]			1 (2)			
Suíça	37[5, 81, 97]			0,594595 (22)	0,243243 (9)		0,162162 (6)
Turquia	28[5, 19, 74, 98, 99]			0,392857 (11)	0,035714 (1)		0,571429 (16)

América	412[11, 27, 30, 40, 77, 81, 101–104]	0,036408 (15)	0,046117 (19)	0,390777 (161)	0,099515 (41)	0,014563 (6)	0,412621 (170)
Ásia	31[5, 27, 31, 50, 53, 76]		0,032258 (1)	0,129032 (4)	0,032258 (1)		0,806452 (25)
Europa	958[100, 105]*	0,009395 (9)	0,042797 (41)	0,587683 (563)	0,160752(154)	0,05428 (52)	0,145094 (139)
<i>Norte Europeu</i>	83	0,012048 (1)	0,024096 (2)	0,722892 (60)	0,084337 (7)	0,072289 (6)	0,084337 (7)
<i>Centro Europeu</i>	536	0,014925 (8)	0,011194 (6)	0,651119 (349)	0,136194 (73)	0,039179 (21)	0,147388 (79)
<i>Sul Europeu</i>	325		0,101538 (33)	0,44 (143)	0,224615 (73)	0,070769 (23)	0,163077 (53)
Oceania	12[71, 72, 91]			0,75 (9)			0,25 (3)
Total	1413	0,016985 (24)	0,043171 (61)	0,521585(737)	0,138712 (196)	0,041047 (58)	0,2385 (337)

Nota: Norte Europeu = Noruega, Reino Unido, Suécia; Centro Europeu = Alemanha, Iugoslávia, Áustria, França, Polônia, Suíça, Turquia; Sul Europeu = Albânia, Bósnia, Espanha, Itália e Portugal, * Referências de estudos que mostram resultados para o continente como um todo ou em partes, os quais foram analisados juntos com outros países de cada região. Variantes foram nomeadas de acordo com a sequência referência NP_000026.2.

Tabela 2 – Frequências de variantes patogênicas de *ALDOB* descritas na literatura com distribuição restrita.

Localização	Alelo (mRNA) NM_000035,3	Defeito predito na proteína NP_000026,2	Número de alelos	Frequência	Referência
Albânia	c.940dupT	p.(Trp314Leufs*22)	1	0,5	[70]
Alemanha	c.113-1G>A		1	0,007246	[62]
	c.345-372del28		1	0,007246	[62]
	c.532T>C	p.Cys178Arg	1	0,007246	[62]
	c.612T>A [#]	p.Tyr204Term	1	0,007246	[62]
	c.612T>G [#]	p.Tyr204Term	1	0,007246	[62]
	c.841_842delAC	p.(Thr281Serfs*54)	2	0,014493	[62]
	c.799+2T>A		2	0,014493	[62]
	c.851T>C	p.Leu284Pro	1	0,007246	[62]
	c.865delC	p.(Leu289Phefs*10)	2	0,014493	[62]
c.1044_1049delTTCTGGinsACACT	p.(Ser349Hisfs*24)	1	0,007246	[62]	
América	c.-11+1G>C		4	0,01	[11]
	c.770T>C	p.Leu257Pro	6	0,015	[11, 27]
	c.1013C>T	p.Ala338Val	3	0,0075	[27]
China	c.479_482delAACA		2	1	[76]
Colômbia	c.*516T>A		2	1	[77]
Coreia	c.761dupT	p.(Thr255Asnfs*23)	2	1	[53]
Espanha	c.324G>A		1	0,013158	[94]
	c.554C>G	p.Pro185Arg	1	0,013158	[94]
EUA	c.403T>C	p.Cys135Arg	1	0,076923	[101]
	c.442T>C	p.Trp148Arg	1	0,076923	[102]
	c.770T>C [#]	p.Leu257Pro	1	0,076923	[103]
França	c.625-1G>A		2	0,007663	[85, 106]
	c.1013C>T [#]	p.Ala338Val	5	0,019157	[106]
Índia	c.112+1delG		2	0,105263	[50]
	c.324+1G>A		9	0,105263	[50]
	c.380-1G>A		1	0,473684	[50]
	c.677G>A	p.Gly226Asp	2	0,052632	[50]
	c.689delA	p.(Lys230Serfs*5)	1	0,052632	[50]
	c.1013C>T [#]	p.Ala338Val	2	0,105263	[50]
Itália	delPromoter & exon1		1	0,004255	[70]
	c.2T>C	p.Met1Thr	1	0,004255	[89]
	c.62delA	p.(Gln21Argfs*17)	2	0,08511	[84]
	c.221T>C	p.Ile74Thr	2	0,08511	[22]
	c.325-1G>C		1	0,004255	[22]
	c.331C>T	p.Gln111Term	1	0,004255	[22]
	c.548_553delTTGGTAC	p.(Leu183_Val194del)	1	0,004255	[88]
	c.612T>G [#]	p.Tyr204Term	15	0,063830	[22, 84, 89, 90]
	c.625-2A>G		2	0,008511	[22]
	c.664G>T	p.Val222Phe	1	0,004255	[22]
	c.686T>C	p.Leu229Pro	2	0,008511	[22, 90]
	c.770T>C [#]	p.Leu257Pro	2	0,08511	[84, 85]
	c.865delC	p.Leu289Phefs*10	2	0,08511	[90]
	c.910C>T	p.Arg304Trp	1	0,004255	[84]
c.911G>A	p.Arg304Gln	1	0,004255	[24]	
g,2840_9288del6449		4	0,017021	[70, 90]	
Japão	c.720C>A	p.Cys240Term	2	1	[52]
Norte Europeu	c.1000-1_1006delGGCTAACTinsTG		1	0,012048	[107]
Nova Zelândia	c.540+1G>C		1	0,5	[60]
Polônia	c.250delC	p.(Leu84Serfs*26)	2	0,038462	[61]
	c.313_314ins12nt		1	0,019231	[61]
	c.522C>G	p.Tyr174Term	2	0,038462	[61]
	c.612T>G [#]	p.Tyr204Term	1	0,019231	[61]

	g.922_925delGTA		2	0,038462	[61]
	c.554C>G	p.Pro185Arg	1	0,013158	[94]
Turquia	c.10C>T	p.Arg4Term	1	0,035714	[74]
	c.1013C>T [#]	p.Ala338Val	2	0,071429	[5, 19]

Nota: [#] Mutações detectadas em diferentes países.

Tabela 3 – Frequência de heterozigotos e prevalência estimada de Intolerância Hereditária à Frutose baseada no gnomAD v2.1.1.

População	Abordagem 1			Abordagem 2		
	Frequência de heterozigotos	Prevalência estimada	Número de alelos patogênicos	Frequência de heterozigotos	Prevalência estimada	Número de alelos patogênicos
Africana	1:97	1:9.481	98	1:709	1:503.349	13
Europeia (não finlandesa)	1:100	1:10.100	402	1:163	1:26.590	293
Finlandesa	1:59	1:3.479	248	1:235	1:55.008	62
Judeus Ashkenazi	1:196	1:38.613	12	1:196	1:38.613	12
Latina	1:150	1:22.450	115	1:394	1:154.971	44
Leste asiático	1:152	1:23.165	62	1:1309	1:1.712.772	7
Outras	1:119	1:14.133	19	1:229	1:52.302	10
Sul asiático	1:219	1:48.090	72	1:212	1:44.920	74
Total	1:105	1:11.082	1033	1:229	1:52.311	515

Note: Abordagem 1 = baseada em todas as variantes possivelmente patogênicas descritas no gnomAD; Abordagem2 = baseada na frequência de alelos patogênicos descritos no Human Gene Mutation Database (HGMD),

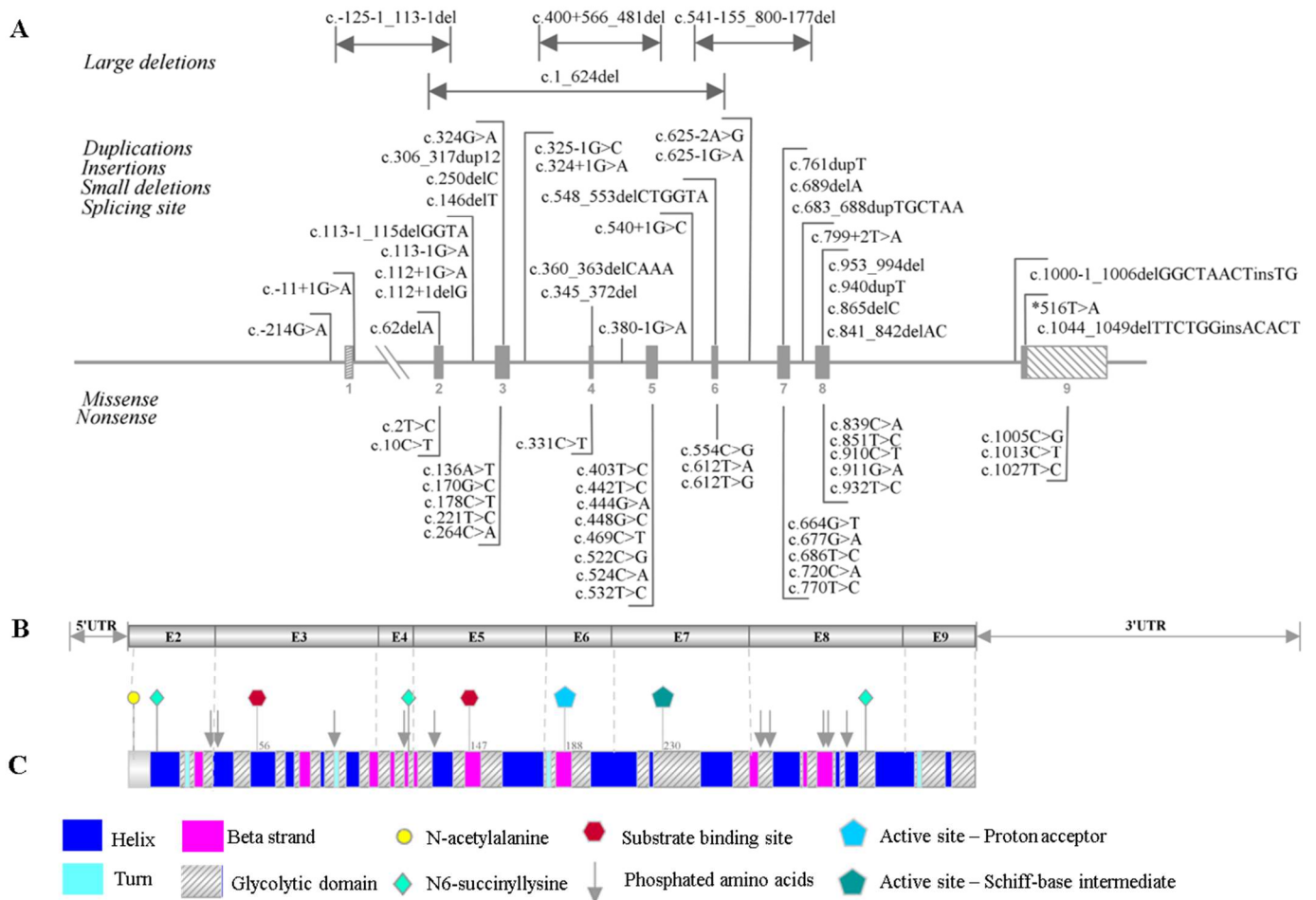


Figura 1: Gene *ALDOB*, mRNA e estrutura da proteína. A) O gene *ALDOB* é representado com éxons codificantes numerados como caixas cinzas. Caixas rachuradas representam éxons que codificam as regiões 5'UTR e 3'UTR. A posição de variantes descritas no HGMD é representada. B) mRNA do *ALDOB* é mostrado como uma barra cinza e éxons numerados. As setas duplas indicam as regiões 5'UTR e 3'UTR em proporção. C) Estrutura secundária da aldolase B é representada com linhas indicando a correspondência dos éxons do mRNA na proteína. Modificações pós-traducionais são indicadas acima e os sítios ativo e de ligação ao substrato são numerados.

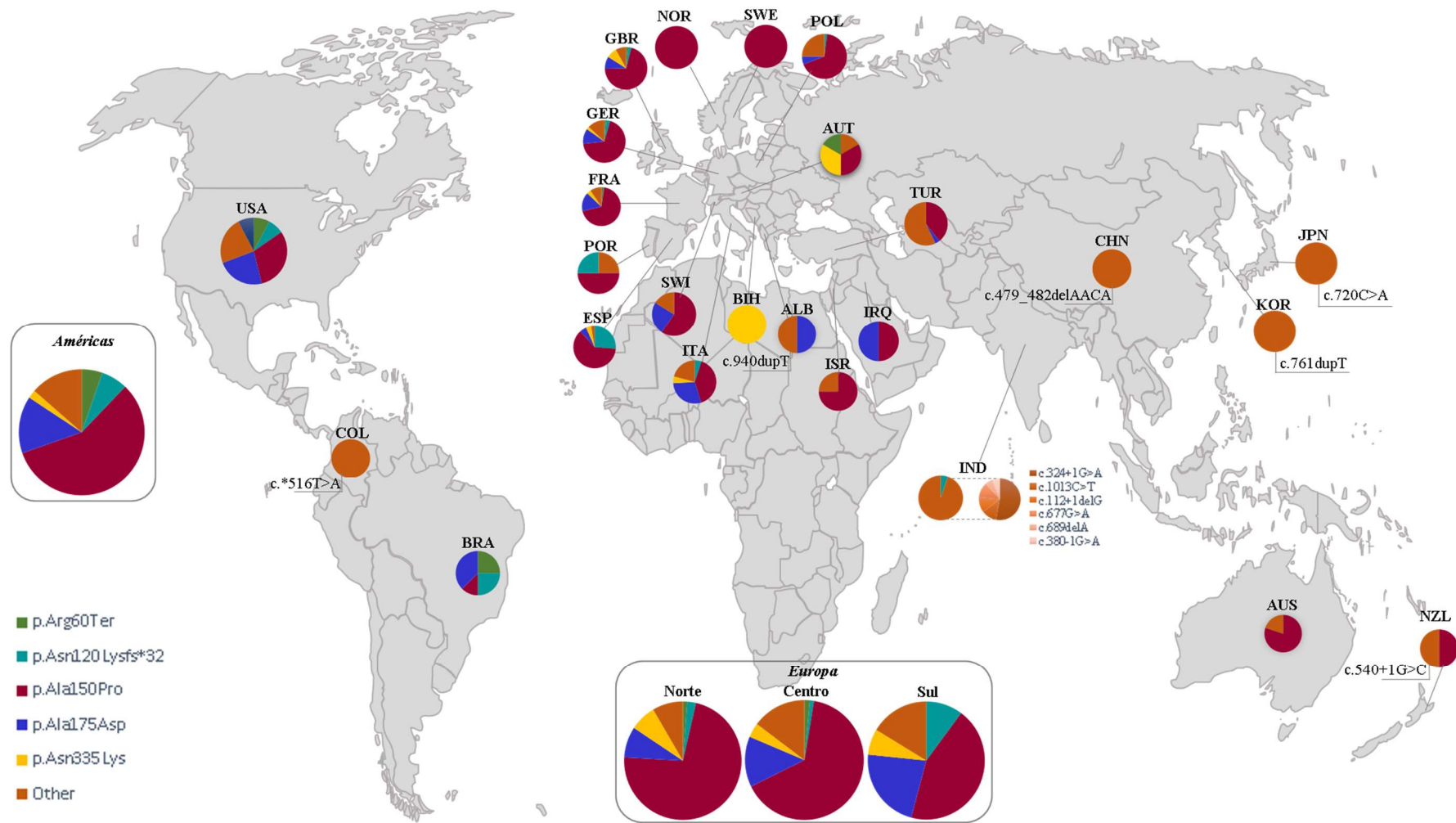


Figura 2: Distribuição mundial das variantes patogênicas mais comuns em *ALDOB*. A abreviação acima de cada gráfico indica o país analisado como segue: ALB=Albânia; AUS=Austrália; AUT=Áustria; BIH=Bósnia and Herzegovina; BRA=Brasil; CHN=China; COL=Colômbia; FRAN=França; GBR=Reino Unido; GER=Alemanha; IND=Índia; IRQ=Iraque; ISR=Israel; ITA=Itália; KOR=Coreia; NZL=Nova Zelândia; NOR=Noruega; POL=Polônia; POR=Portugal; ESP=Espanha; SWE=Suécia; SWI=Suíça; TUR=Turquia; USA=Estados Unidos da América.

7.2. Capítulo 2: A análise genética de pacientes brasileiros com intolerância hereditária à frutose revela alta prevalência das variantes p.Arg60* e p.Asn120Lysfs*32.

O segundo capítulo consiste na análise do gene *ALDOB* de 22 pacientes brasileiros com suspeita clínica ou diagnóstico de IHF. Inicialmente, usamos uma abordagem baseada no sequenciamento massivo paralelo em plataforma Ion Torrent PGM com um painel de genes customizados. A partir dos resultados obtidos nessas análises, desenvolvemos um algoritmo para o diagnóstico de IHF no Brasil, considerando as características genéticas de nossos pacientes. Adicionalmente, discutimos as frequências das variantes patogênicas detectadas a luz de análises de haplótipos que evidenciaram que o perfil genético de pacientes apresenta um padrão específico para as diferentes regiões geográficas analisadas.

Esse capítulo responde pelos objetivos específicos III e IV.

Esse capítulo será apresentado na forma de artigo que será submetido à revista “Molecular Genetics and Metabolism”, cujo fator de impacto é 3.610 e o Qualis Capes da área Genética (Ciências Biológicas I) é A2. O formato obedece às normas da revista.

Situação do artigo: em preparação.

A análise genética de pacientes brasileiros com intolerância hereditária à frutose revela alta prevalência das variantes p.Arg60* e p. Asn120Lysfs*32

Franciele Cabral Pinheiro^(1,2,3), Fernanda Sperb-Ludwig^{*(1,2)}, Camila Matuella⁽²⁾, Carolina Fischinger Moura de Souza⁽⁴⁾, Maria Lúcia Alves Pedroso⁽⁵⁾, Ana Cecília Menezes⁽⁶⁾, Eleonora Duvre Tavares Fagundes⁽⁷⁾, Mauri Félix de Lima⁽⁸⁾, Osvaldo Artigalás⁽⁹⁾, Fabiano Poswar⁽⁴⁾, Ida Vanessa Doederlein Schwartz^(1,2,4).

Filiação:

¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular – UFRGS, Brasil.

²Laboratório BRAIN, Centro de Pesquisa Experimental – HCPA, Brasil

³Universidade Federal do Pampa – Campus Itaqui, Brasil.

⁴Serviço de Genética Médica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

⁵Universidade Federal do Paraná – UFPR, Brasil.

⁶CETREIM - Brasil

⁷Departamento de Pediatria, faculdade de Medicina – UFMG, Brasil.

⁸Universidade Federal de Goiás – UFG, Brasil.

⁹Hospital da Criança, Grupo Hospitalar Conceição – Brasil.

*Correspondence author:

Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Bairro: Santa Cecília – Porto Alegre

Brazil – CEP 930035-903.

Email: fsperb@hcpa.edu.br

RESUMO:

Introdução: A intolerância hereditária à frutose (IHF) é um erro inato do metabolismo causado pela atividade deficiente de aldolase B (codificada por *ALDOB*). As manifestações clínicas incluem hepatomegalia, hipoglicemia e aversão a doces e frutas. Estudo prévio realizado no sudeste do Brasil mostrou uma alta prevalência da variante p.Ala175Asp (exon 5 de *ALDOB*) em pacientes com IHF. O objetivo do presente estudo foi determinar o perfil genético de pacientes brasileiros com IHF. **Metodologia:** Estudo observacional, com amostragem por conveniência. Foram analisados vinte e dois pacientes não-relacionados (consanguinidade parental= 1/22) com suspeita clínica (grupo A, n=16) ou diagnóstico genético prévio (grupo B, n=6) de IHF, e quinze pais. Quinze pacientes foram analisados por NGS em plataforma Ion Torrent PGM com um painel de genes customizado incluindo *ALDOB*. A partir da determinação dos alelos mais frequentes entre pacientes brasileiros, um algoritmo para a investigação genética foi desenvolvido e aplicado nos demais pacientes. **Resultados:** O diagnóstico de IHF foi confirmado em 11 pacientes (grupo A= 5/16, B= 6/6 e, consanguinidade parental= 1), provenientes de diferentes regiões brasileiras (Sul=6; Sudeste=4 e Nordeste=1). Foram encontradas 4 variantes patogênicas: p.Arg60* (éxon 3, 6 alelos), p.Asn120Lysfs*32 (éxon 4, 8 alelos), p.Ala150Pro (éxon 5, 6 alelos) e p.Ala175Asp (éxon 5, 1 alelo). A análise de haplótipos evidenciou que a variante p.Ala150Pro apresenta um único haplótipo, e que a variante p.Asn120Lysfs*32 apresenta três diferentes haplótipos, enquanto o alelo c.Arg60* apresenta dois haplótipos diferentes, na população brasileira. **Conclusão:** A investigação genética de pacientes brasileiros com suspeita de IHF pode ser dirigida inicialmente para a detecção das variantes p.Ala175Asp, p.Ala150Pro, p.Asn120Lysfs*32 e p.Arg60*.

Palavras-chave: *ALDOB*, NGS, erros inatos do metabolismo da frutose, diagnóstico molecular.

1. INTRODUÇÃO:

A intolerância hereditária à frutose (OMIM #229600, IHF) é um erro inato do metabolismo (EIM) de herança autossômica recessiva causado por deficiência na atividade da enzima aldolase B (E.C. 4.1.2.13), a qual é expressa no fígado, rins e intestino. Essa é uma doença rara com incidência variável entre as diferentes populações estudadas, estimada entre 1:26.100 e 1:31.000 [1–3]. A IHF costuma se manifestar quando a criança começa a receber alimentos que contenham frutose, sacarose ou sorbitol. As manifestações clínicas são causadas pelo acúmulo de frutose-1-fosfato (F1P) e incluem crises de hipoglicemia acompanhadas de acidose láctica, vômitos e dores abdominais após o consumo de frutose. Dentre os achados laboratoriais estão: hipofosfatemia, hiperuricemia, hipermagnesemia e hiperalaninemia [4–6]. Alguns pacientes podem apresentar distúrbios na rota de N-glicosilação que acarreta em um padrão alterado de isofocalização de transferrina [7]. O consumo frequente de frutose pode acarretar em alterações hepáticas e renais como hepatomegalia, esteatose e síndrome de Fanconi. Contudo, os pacientes desenvolvem uma aversão à alimentos contendo frutose, a qual os protege dos efeitos desencadeados por esse carboidrato. Isso pode fazer com que muitos pacientes permaneçam sem diagnóstico [4–6]. Outro fator a ser considerado, é o fato de que muitas pessoas com má absorção da frutose manifestam sintomas gastrointestinais e isso pode ser confundido com a IHF [8].

Atualmente, a forma mais indicada para o diagnóstico definitivo da doença é a análise do gene *ALDOB* (codifica a aldolase B), pois dentre as abordagens disponíveis é a menos invasiva ao paciente [9]. O gene *ALDOB* estende-se por 15,2 kb no cromossomo 9q31.1 e inclui 9 éxons que codificam uma enzima de 36 KDa com 364 aminoácidos [10]. De modo geral, três variantes patogênicas são as mais prevalentes entre diferentes populações: c.448G>C (p.Ala150Pro), c.524C>A (p.Ala175Asp) e c.1005C>G (p.Asn335Lys) [8]. A primeira é a mais frequente globalmente e está em desequilíbrio de ligação com os SNPs rs681 e rs682 formando um haplótipo, o que pode ser indicativo de uma origem única dessa variante [11]. Em relação as alterações p.Ala175Asp e p.Asn335Lys não há relatos de haplótipos associados que possam indicar suas origens. Por outro lado, a Índia é um exemplo de população que apresenta um espectro particular de variantes envolvidas na patogênese da IHF sendo que a variante mais frequente nessa população é a c.324+1G>A [9]. Até o

presente momento, há um único estudo com quatro pacientes brasileiros que mostrou que a variante p.Ala175Asp é a mais frequente (37,5%) [12]. Nesse sentido, a literatura tem evidenciado que o conhecimento das variantes patogênicas mais frequentes em uma população pode direcionar a análise do gene *ALDOB*, de modo a garantir um diagnóstico da doença mais ágil, assertivo e a um custo mais baixo [8,9,13].

No presente estudo realizamos a análise genética de pacientes brasileiros com IHF e estabelecemos um algoritmo para o diagnóstico molecular desses pacientes. Adicionalmente, determinamos os haplótipos presentes na população brasileira para identificar a origem das principais variantes patogênicas encontradas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Esse é um estudo transversal e observacional com uma amostragem por conveniência que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o nº 2017-0450. Todos os pacientes e/ou seus guardiões legais assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido concordando com a participação na pesquisa.

2.1. Pacientes:

Foram incluídos vinte e dois pacientes com suspeita clínica ou diagnóstico de IHF de diferentes localidades do Brasil. Os critérios de inclusão foram: manifestação de sintomas relacionados ao consumo de frutose e/ou pacientes com diagnóstico genético prévio de IHF. Esses pacientes foram agrupados em duas coortes, uma de teste (n=15) e outra de validação (n=7).

2.2. Análises genéticas:

Amostras de DNA dos pacientes e pais (quando disponíveis) foram isoladas de sangue com o Easy-DNA gDNA Purification Kit (Thermo Fisher®) ou de saliva com o kit preplT-L2P (DNA Genotec), de acordo com as instruções dos fabricantes. As análises de sequenciamento massivo paralelo foram executadas em plataforma Ion Torrent PGM (Life Technologies) com um painel de genes customizados. As regiões codificantes e bordas exon-intron do gene *ALDOB* foram incluídas com uma cobertura de 100% e cada amplicon apresentou uma profundidade mínima de leitura de 200X.

O alinhamento das sequências foi realizado usando como referência o genoma humano GRCh37 (hg19) do Genome Reference Consortium através do software IonStates. A chamada de variantes foi salva em arquivos nos formatos VCF e bam, os quais foram analisados nos softwares Enlis (Genomics) e Ion Reporter (Thermo Fisher). As análises foram realizadas incluindo todas as variantes detectadas em *ALDOB*. Para determinar quais variantes estavam envolvidas na patogênese da doença foram adotados os seguintes critérios: frequência alélica menor que 1% no gnomAD [14] e ABraOM [15], localização no gene, impacto na proteína (variantes de sentido trocado, sem sentido ou em sítio de splicing), variantes previamente descritas em pacientes e/ou preditas como patogênica por diferentes algoritmos. O software IGV [16] foi utilizado para verificar a presença de grandes inserções ou deleções e confirmar a profundidade dos sequenciamentos. Os critérios estabelecidos pelo *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) [17] foram considerados na classificação de variantes.

O sequenciamento automatizado de Sanger, realizado na plataforma ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), foi utilizado para confirmação da presença e/ou ausência de variantes patogênicas em amostras submetidas à análise por NGS. Esse mesmo método foi aplicado, de forma direcionada, na análise dos pais com o objetivo de verificar a fase das variantes patogênicas detectadas nos pacientes e SNPs relacionados a essas variantes. O software Chromas 2.6.1 (Technelysium) foi utilizado para a análise dos resultados, tendo a sequência NM_000035.4 como referência.

2.3. Análises *in silico*:

O software PHASE foi usado para determinar a fase das variantes detectadas, não resolvidas pela análise dos pais, e identificar os haplótipos associados a essas. O módulo LDhap do algoritmo LDlink [18] foi utilizado para verificar as frequências dos haplótipos detectados. Essas análises consideraram todas as populações representadas no banco de dados 1000 Genomes (1000G) [19] e incluíram os seguintes SNPs: rs1929480 (c.540+84A>C, intron 5); rs506571 (c.800-76T>C, intron 7); rs681 (c.999+84T>C, intron 8); rs682 (c.999+105G>A, intron 8).

3. RESULTADOS:

Os dados clínicos dos pacientes foram retrospectivamente obtidos e estão descritos na tabela 1.

A análise das regiões codificantes do gene *ALDOB* confirmou o diagnóstico de IHF em onze dos vinte e dois pacientes investigados (tabela 2). Na coorte de teste, 15 pacientes (1-4, 6, 8, 12-15, 18-22) foram analisados pelo método de sequenciamento massivo paralelo, confirmando o diagnóstico em seis desses (pacientes 1-4, 6 e 8). As análises desses indivíduos evidenciaram que apenas três variantes, previamente descritas na literatura, respondiam por todos os alelos mutados. As variantes identificadas foram: p.Arg60* (éxon 3); p.Asn120Lysfs*32 (éxon 4) e p.Ala150Pro (éxon 5). Todos os pacientes, incluindo os que não tiveram variantes patogênicas detectadas, apresentaram uma profundidade adequada do sequenciamento. Todos os resultados foram confirmados pelo método de sequenciamento automatizado de Sanger.

Com base em nossos achados desenvolvemos um algoritmo para o diagnóstico de pacientes brasileiros com suspeita clínica de IHF que prioriza a detecção das variantes mais frequentes, tornando a análise mais ágil e barata (figura 1). Assim, o sequenciamento automatizado de Sanger, direcionado para a detecção dos alelos patogênicos mais frequentes, foi o método usado na análise da coorte de validação (n=7, pacientes 5, 7, 9-11, 17-18). Com essa abordagem, confirmamos o diagnóstico de IHF no paciente 5 (sem diagnóstico genético prévio) em que detectou-se as variantes p.Asn120Lysfs*32 e c.524C>A (p.Ala175Asp), no éxon 5. Os pacientes 7, 9-11, com diagnóstico molecular prévio, foram analisados de forma cegada e os resultados confirmaram os genótipos pré-estabelecidos.

A tabela 3 apresenta a frequência das variantes patogênicas detectadas em comparação aos resultados obtidos por Valadares et al (2015) [12].

Foi identificado que os polimorfismos rs506571, rs681 e rs682 formam um haplótipo, o qual tem uma frequência de 45% na população total do banco de dados 1000G. Essa frequência é variável entre as diferentes populações representadas nesse banco de dados, sendo menor na população europeia (37%) e maior entre indivíduos do sul asiático (~62%). Esse haplótipo está independentemente associado às variantes p.Arg60* (rs118204429) e p.Asn120Lysfs*32 (rs387906225) (tabela 2 e figura 2). A variante p.Arg60* apresenta dois haplótipos diferentes na população brasileira (haplótipos A e B). Já, a variante p.Asn120Lysfs*32 apresenta três diferentes haplótipos (C, D e E). O SNP

rs1929480 está ligado, de forma independente, às três variantes mais comuns na população em estudo, p.Arg60*, p.Asn120Lysfs*32 e p.Ala150Pro (tabela 2 e figura 2). O haplótipo F formado entre a variante patogênica p.Ala150Pro (rs1800546) e o SNP rs1929480 apresenta uma frequência de 0,18% entre todas as populações presentes no 1000G, sendo detectado exclusivamente entre indivíduos europeus (0,89%). Na figura 2 são apresentados os dados de frequência das variantes envolvidas na patogênese de IHF entre pacientes brasileiros de diferentes regiões, bem como os haplótipos detectados.

4. DISCUSSÃO:

A IHF é um EIM raro e pouco estudado no Brasil [12], o qual apresenta um quadro clínico inespecífico e com aspectos comuns com outras doenças, tais como glicogenoses hepáticas e doença congênita de glicosilação [20,21]. Isso pode direcionar erroneamente a investigação clínica atrasando o correto diagnóstico e tratamento adequado. Considerando esses aspectos, uma coorte de teste, em que dentre as hipóteses de diagnóstico havia a suspeita clínica de IHF, foram analisados por NGS com um painel customizado para incluir genes envolvidos com doenças que resultam em hepatomegalia e hipoglicemia [22]. As análises mostraram que cerca de 60% (9/15) dos pacientes não apresentavam variantes patogênicas em regiões codificantes do gene *ALDOB*, sugerindo que esses pacientes não têm IHF. Dentre os sintomas mais frequentes nesses indivíduos estão alterações gastrointestinais associadas ao consumo de frutose (64%). Uma possível causa dessas manifestações é a má absorção da frutose, cujas causas ainda não estão esclarecidas, mas que pode acarretar nesse quadro clínico em razão da presença de frutose em regiões distais do intestino [23]. Contudo, deve ser considerado que o método aplicado não incluiu a análise da região promotora do gene e que não é o indicado para a identificação de grandes deleções. Entretanto, a profundidade na leitura de todos os amplicons de *ALDOB* foi adequada e semelhante entre todas as amostras, de modo que não há indícios da presença de grandes deleções ou de perda de alelos nesses pacientes.

Entre os pacientes com diagnóstico de IHF confirmado, os sintomas mais prevalentes foram: aversão à doces e/ou frutas (71%), lesões hepáticas (71%) e sintomas gastrointestinais (64%). Isso reforça que a aversão à doces associada a lesões hepáticas (hepatomegalia e/ou esteatose) podem ser fortes indicativos da doença. Além disso, a alteração do padrão de N-glicosilação pode auxiliar na investigação clínica, ainda que nem todos os pacientes

apresentem essa característica, pois essa está fortemente relacionada a presença de frutose na dieta [24].

O quadro clínico inespecífico apresentado pelos pacientes dificulta o estabelecimento de uma relação genótipo-fenótipo na IHF, sendo que não há uma relação estabelecida para variantes envolvidas na doença. Di Dato et al (2019) analisaram diferentes parâmetros bioquímicos em um grupo de pacientes em tratamento, com dez anos de seguimento, e demonstraram que pacientes homozigotos para a variante p.Ala175Asp apresentam elevação nos níveis séricos de ALT [24]. Até o momento, essa é a única relação genótipo-fenótipo estabelecida na IHF.

As análises por NGS mostraram que três variantes respondiam por todos os alelos patogênicos identificados (n=12 alelos): p.Arg60*, p.Asn120Lysfs*32 e p.Ala150Pro. Essas variantes foram previamente descritas na literatura e estão entre as mais frequentes em pacientes com IHF de diferentes origens [1,25–27]. Com base nesses achados, foi desenvolvido um algoritmo para o diagnóstico molecular de IHF em pacientes brasileiros direcionado à detecção dos alelos mais frequentes nessa população. Essa abordagem tem se mostrado eficiente no diagnóstico da doença e aplicável a diferentes populações, de modo que diminui custos e o tempo de investigação [9,13,28].

Seguindo o algoritmo desenvolvido (figura 1), a investigação inicial incluiu a detecção das variantes mais frequentes p.Arg60*, Asn120Lysfs*32 e p.Ala150Pro através do sequenciamento automatizado de Sanger. Essa metodologia foi aplicada no estudo de sete pacientes (coorte de validação), identificando-se genótipos concordantes com a doença em cinco desses, incluindo aqueles com diagnóstico prévio confirmado por nossas análises. Nossos resultados indicam que, caso nenhum alelo patogênico comum tenha sido detectado, é necessário analisar outras regiões codificantes do gene *ALDOB* e reavaliar a apresentação clínica do paciente. Posto que uma investigação mais aprofundada das manifestações clínicas do paciente pode indicar outras possibilidades diagnósticas para o direcionamento da análise molecular. Em casos assim, as plataformas de NGS com painel de genes podem ser uma abordagem mais indicada para a análise, por testarem diferentes possibilidades diagnósticas simultaneamente.

Surpreendentemente, os resultados mostram que o Brasil, um país de dimensões continentais com um pool gênico variável entre as diferentes regiões geográficas, apresenta um perfil alélico homogêneo, isto é, com poucas variantes patogênicas envolvidas com a

doença. Essa homogeneidade alélica propicia o desenvolvimento de abordagens metodológicas voltadas para detecção de alelos específicos. Assim, o algoritmo desenvolvido mostrou-se uma abordagem promissora, ao passo que detectou os alelos patogênicos presentes na amostra. Isso possibilita a aplicação de metodologias de detecção alelo-específicas mais baratas no diagnóstico molecular, como já foi sugerido em outras populações [8,9,13,29]. No presente estudo o sequenciamento automatizado de Sanger foi a metodologia aplicada na análise dos pacientes. Entretanto, os resultados evidenciam que outras abordagens alelo específicas, como enzimas de restrição ou ASOs (Allele Specific Oligonucleotides) [30–32], podem ser aplicadas no diagnóstico molecular de IHF no Brasil.

Considerando os 22 alelos do presente estudo e o de Valadares et al (2015), as variantes detectadas na população brasileira p.Ala150Pro (28%), p.Asn120Lysfs*32 (32%), p.Arg60* (24%) e p.Ala175Asp (16%), são amplamente distribuídas entre populações de diferentes pools gênicos [2,8,13]. Entretanto, o perfil alélico de pacientes brasileiros com IHF é distinto de outras populações, tais como europeus, em que p.Ala150Pro (65%) é o alelo mais frequente, seguido por p.Ala175Asp (11%) e p.Asn335Lys (8%). Nessas populações, os alelos p.Asn120Lysfs*32 e p.Arg60* ocupam o quarto e o quinto lugares, respectivamente [33]. É na frequência desses alelos nulos que está a maior diferença da população brasileira para as demais, já que os índices observados no presente estudo são os mais altos entre todas as populações descritas [2,13,29]. Tais resultados confirmam os achados de Coffe et al (2010) que mostraram que a frequência desses alelos nulos é mais alta em países americanos, de modo que o alelo p.Asn335Lys passa a ocupar o quinto lugar em frequência na América [8], sendo que na amostra de pacientes brasileiros estudados esse alelo não foi detectado.

A variante mais frequente na população brasileira foi a p.Asn120Lysfs*32 (32%), a qual resulta em uma proteína truncada provavelmente com pouca ou nenhuma atividade residual. Essa variante apresenta uma distribuição mais proporcional entre as regiões avaliadas (figura 2) e com uma frequência semelhante à observada em um estudo anterior com quatro pacientes brasileiros [12]. O alelo p.Asn120Lysfs*32 está presente em diferentes populações com frequências entre 0,5% (França) e 16% (Espanha) [29,34]. No Brasil, a variante c.360_363delCAAA está presente em 3 haplótipos, de modo que podemos concluir que a mesma tem três diferentes origens nessa população. O haplótipo C, formado com os SNPs rs506571, rs681 e rs682 é o mais frequente (~71%) entre pacientes portadores dessa

variante, estando presente em todos os pacientes do Sul que têm a variante patogênica (pacientes 1,3-5) e em um paciente da região Sudeste (paciente 9), o que pode indicar uma origem comum ou efeito fundador. Outro haplótipo detectado na população brasileira é o E, o qual está presente em dois pacientes do sudeste, o que pode indicar uma segunda origem desse alelo. Já, o haplótipo D está presente em um paciente da região Nordeste, indicando uma terceira origem para esse alelo. Assim, a variante p.Asn120Lysfs*32 surgiu independentemente em três ocasiões evidenciando três possíveis origens desse alelo na população brasileira. Essa hipótese é reforçada pela análise da região mutada (5'-GAACAAACCAAGAAACCACC-3'), pois trata-se de uma sequência repetitiva que acaba sendo *hotspot* para mutações dos tipos inserção e deleção.

A variante p.Ala150Pro está localizada na região do sítio ativo da aldolase B, e acarreta em alterações na estrutura quaternária afetando a conformação ativa da enzima [35,36]. Essa variante responde globalmente por 57% dos alelos patogênicos identificados em pacientes com IHF, sendo o alelo mais comum entre todas as populações estudadas [3,13,29,33], com exceção da Índia [9]. Na Europa, a frequência dessa variante é de aproximadamente 65%, sendo que sua distribuição forma um gradiente crescente de Sul para Norte, de modo que na Itália essa é de 37,3% [13], enquanto que na França e Reino Unido é 64% e 90%, respectivamente [29,37]. No Brasil, a frequência desse alelo é ainda mais baixa que no sul europeu (28%) e menor que no continente americano em geral (44%) [8]. Contudo, esse índice é variável entre as regiões geográficas analisadas (Figura 2). Assim, no sul a variante p.Ala150Pro está presente em 50% dos alelos patogênicos identificados, enquanto que na região Sudeste sua frequência foi estimada em 12,5% em um estudo prévio [12], não tendo sido detectada em paciente dessa região no presente estudo. Essa variante apresentou um único haplótipo (F) entre as amostras analisadas, o qual é formado pelo rs1929480 e pelos alelos c.999+84T e c.999+105G (Figura 1). A relação desses dois últimos alelos com a variante p.Ala150Pro já foi mostrada por Brooks et al (1993) [11]. Desse modo, nossos resultados são congruentes com estudos prévios que indicam que essa variante tenha surgido uma única vez e se espalhado entre as diferentes populações do mundo através de deriva genética e/ou efeito fundador [11]. No Brasil, podemos imaginar que o efeito fundador é o principal mecanismo pelo qual esse alelo vem sendo disseminado, pois a distribuição do mesmo evidencia uma maior frequência no Sul, que é a região brasileira com maior índice de ancestralidade europeia [38].

O alelo p.Arg60* está localizado no éxon 3, que apresenta três das quatro regiões específicas da aldolase B, as quais estão relacionadas a especificidades da enzima em relação as outras isozimas aldolase (A e C) em humanos [39]. Essa variante acarreta em um códon de parada prematuro e na perda de 304 aminoácidos, o que possivelmente desencadeia o decaimento de RNA mediado por códon de parada prematuro. É a terceira variante mais frequente entre pacientes brasileiros com IHF (24%), corroborando achados prévios que indicavam uma frequência de 25% desse alelo [12]. Essa variante está dispersa em uma baixa frequência (1,4% - 4%) exclusivamente em países da Europa Central [2,29] e América [8]. A análise de haplótipos revelou duas origens diferentes entre pacientes do Brasil, sendo que no haplótipo A essa variante está em desequilíbrio de ligação com o SNP rs1929480 e em B com os SNPs rs506571, rs681 e rs682 (figura 2). O primeiro está distribuído nas três regiões estudadas (Sul, Sudeste e Nordeste), enquanto o segundo está presente apenas em pacientes do Sudeste. Esses dados sugerem que esse alelo possa ter surgido de forma independente em dois eventos mutacionais.

Finalmente, a variante p.Ala175Asp, a qual acarreta em alterações significativas na estrutura tetramérica da aldolase B mutante [40], é a segunda mais frequente na maioria das populações estudadas [2,8,13,24,29]. Porém, na amostra analisada, foi detectada apenas em um paciente da região Sul (6%). Conjuntamente a amostra de pacientes brasileiros (o presente estudo e Valadares et al (2015)) mostra que a frequência desse alelo chega a 16% (tabela 3), sendo mais comum em pacientes do sudeste. No paciente 7, essa variante está ligada aos SNPs rs506571, rs681 e rs682. Porém, não é possível saber se esse alelo tem uma origem única entre pacientes brasileiros porque não há dados de haplotipagem em estudo prévio [12].

Um aspecto importante, é que ainda que tenhamos uma tríade (Europeus, Africanos e Ameríndios) formando a etnia brasileira, os índices de contribuição de cada grupo são diferenciados entre as regiões, sendo também diferentes entre as regiões, as subpopulações prevalentes em cada grupo [41]. Esses aspectos influenciam na distribuição dos alelos envolvidos na patogênese de IHF, o que foi evidenciado no presente estudo.

5. CONCLUSÃO:

Nossos achados evidenciam que uma análise simplificada do gene *ALDOB*, direcionada à detecção de variantes patogênicas frequentes, pode resultar em uma alta taxa

de detecção de alelos envolvidos em IHF na população brasileira. Além disso, foi mostrado que variantes mundialmente distribuídas apresentam mais de uma origem em nossa população, indicando diferentes eventos mutacionais causando essas alterações, e a regionalização do perfil alélico de pacientes brasileiros.

6. REFERÊNCIAS:

- [1] N.C.P.P. Cross, R. de Franchis, G. Sebastio, C. Dazzo, D.R. Tolan, C. Gregori, M. Odievre, M. Vidailhet, V. Romano, G. Mascali, C. Romano, S. Musumeci, B. Steinmann, R. Gitzelmann, T.M. Cox, R. de Franchis, G. Sebastio, C. Dazzo, D.R. Tolan, C. Grégori, M. Odievre, M. Vidailhet, V. Romano, G. Mascali, C. Romano, S. Musumeci, B. Steinmann, R. Gitzelmann, Molecular analysis of aldolase B genes in hereditary fructose intolerance, *Lancet*. 335 (1990) 306–309. doi:10.1016/0140-6736(90)90603-3.
- [2] R. Santer, J. Rischewski, M. von Weihe, M. Niederhaus, S. Schneppenheim, K. Baerlocher, A. Kohlschütter, A. Muntau, H.-G. Posselt, B. Steinmann, R. Schneppenheim, M. von Weihe, M. Niederhaus, S. Schneppenheim, K. Baerlocher, A. Kohlschütter, A. Muntau, H.-G. Posselt, B. Steinmann, R. Schneppenheim, M. von Weihe, M. Niederhaus, S. Schneppenheim, K. Baerlocher, A. Kohlschütter, A. Muntau, H.-G. Posselt, B. Steinmann, R. Schneppenheim, The Spectrum of Aldolase B (ALDOB) Mutations and the Prevalence of Hereditary Fructose Intolerance in Central Europe, *Hum. Mutat.* 25 (2005) 594. doi:10.1002/humu.9343.
- [3] J. Gruchota, E. Pronicka, L. Korniszewski, B. Stolarski, A. Pollak, Aldolase B mutations and prevalence of hereditary fructose intolerance in a Polish population, *Mol. Genet. Metab. Reports*. 87 (2006) 376–378. doi:10.1016/j.ymgme.2005.11.010.
- [4] M. Ali, P. Rellos, T.M. Cox, Hereditary fructose intolerance, *J. Med. Genet.* 35 (1998) 353–365.
- [5] D. Demirbas, W.J. Brucker, G.T. Berry, Inborn Errors of Metabolism with Hepatopathy, *Pediatr. Clin. North Am.* 65 (2018) 337–352. doi:10.1016/j.pcl.2017.11.008.
- [6] J.M. Saudubray, G. Van Den Berghe, J.H. Walter, B. Steinmann, R. Santer, G. van der Berghe, Inborn metabolic diseases diagnosis and treatment, in: *Inborn Metab. Dis. Diagnosis Treat.*, Springer Berlin Heidelberg, 2012: pp. 1–657. doi:10.1007/978-3-642-15720-2.
- [7] M. Adamowicz, R. Płoski, D. Rokicki, E. Morava, M. Gizewska, H. Mierzewska,

- A. Pollak, D.J. Lefeber, R.A. Wevers, E. Pronicka, Transferrin hypoglycosylation in hereditary fructose intolerance: using the clues and avoiding the pitfalls., *J. Inherit. Metab. Dis.* 30 (2007) 407. doi:10.1007/s10545-007-0569-z.
- [8] E.M. Coffe, E.M. Coffee, L. Yerkes, E.P. Ewen, T. Zee, D.R. Tolan, Increased prevalence of mutant null alleles that cause hereditary fructose intolerance in the American population, *J. Inherit Metab. Dis.* 33 (2010) 33–42. doi:10.1007/s10545-009-9008-7.
- [9] S. Bijarnia-mahay, S. Movva, N. Gupta, D. Sharma, R.D. Puri, U. Kotecha, R. Saxena, M. Kabra, N. Mohan, I.C. Verma, Molecular Diagnosis of Hereditary Fructose Intolerance : Founder Mutation in a Community from India, *JIMD Rep.* (2015) 85–93. doi:10.1007/8904_2014_374.
- [10] NCBI, Gene [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, (2004). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> (accessed December 5, 2019).
- [11] C.C. Brooks, D.R. Tolan, Association of the widespread A149P hereditary fructose intolerance mutation with newly identified sequence polymorphisms in the aldolase B gene, *Am. J. Hum. Genet.* 52 (1993) 835–840.
- [12] E.R. Valadares, A.F. Da Cruz, T.E.R. Adelino, V.D.C. Kanufre, M.D.C. Ribeiro, M.G.M.G. Penido, L.A. Peret Filho, L.M.S.V.E. Valadares, Hereditary fructose intolerance in Brazilian patients, *Mol. Genet. Metab. Reports.* 4 (2015) 35–38. doi:10.1016/j.ymgmr.2015.05.007.
- [13] G. Esposito, M.R. Imperato, L. Ieno, R. Sorvillo, V. Benigno, G. Parenti, R. Parini, L. Vitagliano, A. Zagari, F. Salvatore, F.I.I. Napoli, I.F. Sdn, E. Gianturco, F. Ii, C. Pediatrica, O.S. Gerardo, S. Biologiche, L. Leno, R. Sorvillo, V. Benigno, G. Parenti, R. Parini, L. Vitagliano, A. Zagari, F. Salvatore, L. Ieno, R. Sorvillo, V. Benigno, G. Parenti, R. Parini, L. Vitagliano, A. Zagari, F. Salvatore, F.I.I. Napoli, I.F. Sdn, E. Gianturco, F. Ii, C. Pediatrica, O.S. Gerardo, S. Biologiche, Hereditary Fructose Intolerance : Functional Study of Two Novel ALDOB Natural Variants and Characterization of a Partial Gene Deletion, *Hum. Mutat.* 31 (2010) 1294–1303. doi:10.1002/humu.21359.
- [14] K.J. Karczewski, L.C. Francioli, G. Tiao, B.B. Cummings, J. Alföldi, Q. Wang, R.L. Collins, K.M. Laricchia, A. Ganna, D.P. Birnbaum, L.D. Gauthier, H. Brand, M. Solomonson, N.A. Watts, D. Rhodes, M. Singer-Berk, E.M. England, E.G. Seaby, J.A. Kosmicki, R.K. Walters, K. Tashman, Y. Farjoun, E. Banks, T. Poterba, A. Wang, C. Seed,

- N. Whiffin, J.X. Chong, K.E. Samocha, E. Pierce-Hoffman, Z. Zappala, A.H. O'Donnell-Luria, E.V. Minikel, B. Weisburd, M. Lek, J.S. Ware, C. Vittal, I.M. Armean, L. Bergelson, K. Cibulskis, K.M. Connolly, M. Covarrubias, S. Donnelly, S. Ferriera, S. Gabriel, J. Gentry, N. Gupta, T. Jeandet, D. Kaplan, C. Llanwarne, R. Munshi, S. Novod, N. Petrillo, D. Roazen, V. Ruano-Rubio, A. Saltzman, M. Schleicher, J. Soto, K. Tibbetts, C. Tolonen, G. Wade, M.E. Talkowski, T.G.A.D. Consortium, B.M. Neale, M.J. Daly, D.G. MacArthur, Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance across human protein-coding genes, *BioRxiv*. (2019) 531210. doi:10.1101/531210.
- [15] M.S. Naslavsky, G.L. Yamamoto, T.F. de Almeida, S.A.M. Ezquina, D.Y. Sunaga, N. Pho, D. Bozoklian, T.O.M. Sandberg, L.A. Brito, M. Lazar, D.V. Bernardo, E. Amaro, Y.A.O. Duarte, M.L. Lebrão, M.R. Passos-Bueno, M. Zatz, Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database, *Hum. Mutat.* 38 (2017) 751–763. doi:10.1002/humu.23220.
- [16] H. Thorvaldsdóttir, J.T. Robinson, J.P. Mesirov, Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration, *Brief. Bioinform.* 14 (2013) 178–192. doi:10.1093/bib/bbs017.
- [17] K. Nykamp, M. Anderson, M. Powers, J. Garcia, B. Herrera, Y. Ho, Y. Kobayashi, N. Patil, J. Thusberg, M. Westbrook, T. Invitae, C. Genomics, S. Topper, Sherlock : a comprehensive refinement of the ACMG – AMP variant classification criteria, *Genet. Med.* 19 (2017) 1105–1117. doi:10.1038/gim.2017.37.
- [18] M.J. Machiela, S.J. Chanock, LDlink: A web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants, *Bioinformatics.* 31 (2015) 3555–3557. doi:10.1093/bioinformatics/btv402.
- [19] A. Auton, G.R. Abecasis, D.M. Altshuler, R.M. Durbin, D.R. Bentley, A. Chakravarti, A.G. Clark, P. Donnelly, E.E. Eichler, P. Flicek, S.B. Gabriel, R.A. Gibbs, E.D. Green, M.E. Hurles, B.M. Knoppers, J.O. Korbel, E.S. Lander, C. Lee, H. Lehrach, E.R. Mardis, G.T. Marth, G.A. McVean, D.A. Nickerson, J.P. Schmidt, S.T. Sherry, J. Wang, R.K. Wilson, E. Boerwinkle, H. Doddapaneni, Y. Han, V. Korchina, C. Kovar, S. Lee, D. Muzny, J.G. Reid, Y. Zhu, Y. Chang, Q. Feng, X. Fang, X. Guo, M. Jian, H. Jiang, X. Jin, T. Lan, G. Li, J. Li, Y. Li, S. Liu, X. Liu, Y. Lu, X. Ma, M. Tang, B. Wang, G. Wang, H. Wu, R. Wu, X. Xu, Y. Yin, D. Zhang, W. Zhang, J. Zhao, M. Zhao, X. Zheng,

N. Gupta, N. Gharani, L.H. Toji, N.P. Gerry, A.M. Resch, J. Barker, L. Clarke, L. Gil, S.E. Hunt, G. Kelman, E. Kulesha, R. Leinonen, W.M. McLaren, R. Radhakrishnan, A. Roa, D. Smirnov, R.E. Smith, I. Streeter, A. Thormann, I. Toneva, B. Vaughan, X. Zheng-Bradley, R. Grocock, S. Humphray, T. James, Z. Kingsbury, R. Sudbrak, M.W. Albrecht, V.S. Amstislavskiy, T.A. Borodina, M. Lienhard, F. Mertes, M. Sultan, B. Timmermann, M.L. Yaspo, L. Fulton, V. Ananiev, Z. Belaia, D. Beloslyudtsev, N. Bouk, C. Chen, D. Church, R. Cohen, C. Cook, J. Garner, T. Hefferon, M. Kimelman, C. Liu, J. Lopez, P. Meric, C. O'Sullivan, Y. Ostapchuk, L. Phan, S. Ponomarov, V. Schneider, E. Shekhtman, K. Sirotkin, D. Slotta, H. Zhang, S. Balasubramaniam, J. Burton, P. Danecek, T.M. Keane, A. Kolb-Kokocinski, S. McCarthy, J. Stalker, M. Quail, C.J. Davies, J. Gollub, T. Webster, B. Wong, Y. Zhan, C.L. Campbell, Y. Kong, A. Marcketta, F. Yu, L. Antunes, M. Bainbridge, A. Sabo, Z. Huang, L.J.M. Coin, L. Fang, Q. Li, Z. Li, H. Lin, B. Liu, R. Luo, H. Shao, Y. Xie, C. Ye, C. Yu, F. Zhang, H. Zheng, H. Zhu, C. Alkan, E. Dal, F. Kahveci, E.P. Garrison, D. Kural, W.P. Lee, W.F. Leong, M. Stromberg, A.N. Ward, J. Wu, M. Zhang, M.J. Daly, M.A. DePristo, R.E. Handsaker, E. Banks, G. Bhatia, G. Del Angel, G. Genovese, H. Li, S. Kashin, S.A. McCarroll, J.C. Nemes, R.E. Poplin, S.C. Yoon, J. Lihm, V. Makarov, S. Gottipati, A. Keinan, J.L. Rodriguez-Flores, T. Rausch, M.H. Fritz, A.M. Stütz, K. Beal, A. Datta, J. Herrero, G.R.S. Ritchie, D. Zerbino, P.C. Sabeti, I. Shlyakhter, S.F. Schaffner, J. Vitti, D.N. Cooper, E. V. Ball, P.D. Stenson, B. Barnes, M. Bauer, R.K. Cheetham, A. Cox, M. Eberle, S. Kahn, L. Murray, J. Peden, R. Shaw, E.E. Kenny, M.A. Batzer, M.K. Konkel, J.A. Walker, D.G. MacArthur, M. Lek, R. Herwig, L. Ding, D.C. Koboldt, D. Larson, K. Ye, S. Gravel, A. Swaroop, E. Chew, T. Lappalainen, Y. Erlich, M. Gymrek, T.F. Willems, J.T. Simpson, M.D. Shriver, J.A. Rosenfeld, C.D. Bustamante, S.B. Montgomery, F.M. De La Vega, J.K. Byrnes, A.W. Carroll, M.K. DeGorter, P. Lacroute, B.K. Maples, A.R. Martin, A. Moreno-Estrada, S.S. Shringarpure, F. Zakharia, E. Halperin, Y. Baran, E. Cerveira, J. Hwang, A. Malhotra, D. Plewczynski, K. Radew, M. Romanovitch, C. Zhang, F.C.L. Hyland, D.W. Craig, A. Christoforides, N. Homer, T. Izatt, A.A. Kurdoglu, S.A. Sinari, K. Squire, C. Xiao, J. Sebat, D. Antaki, M. Gujral, A. Noor, K. Ye, E.G. Burchard, R.D. Hernandez, C.R. Gignoux, D. Haussler, S.J. Katzman, W.J. Kent, B. Howie, A. Ruiz-Linares, E.T. Dermitzakis, S.E. Devine, H.M. Kang, J.M. Kidd, T. Blackwell, S. Caron, W. Chen, S. Emery, L. Fritsche, C. Fuchsberger, G. Jun, B. Li, R. Lyons, C. Scheller, C. Sidore, S. Song, E. Sliwerska, D. Taliun, A. Tan,

R. Welch, M.K. Wing, X. Zhan, P. Awadalla, A. Hodgkinson, Y. Li, X. Shi, A. Quitadamo, G. Lunter, J.L. Marchini, S. Myers, C. Churchhouse, O. Delaneau, A. Gupta-Hinch, W. Kretzschmar, Z. Iqbal, I. Mathieson, A. Menelaou, A. Rimmer, D.K. Xifara, T.K. Oleksyk, Y. Fu, X. Liu, M. Xiong, L. Jorde, D. Witherspoon, J. Xing, B.L. Browning, S.R. Browning, F. Hormozdiari, P.H. Sudmant, E. Khurana, C. Tyler-Smith, C.A. Albers, Q. Ayub, Y. Chen, V. Colonna, L. Jostins, K. Walter, Y. Xue, M.B. Gerstein, A. Abyzov, S. Balasubramanian, J. Chen, D. Clarke, Y. Fu, A.O. Harmanci, M. Jin, D. Lee, J. Liu, X.J. Mu, J. Zhang, Y. Zhang, C. Hartl, K. Shakir, J. Degenhardt, S. Meiers, B. Raeder, F.P. Casale, O. Stegle, E.W. Lameijer, I. Hall, V. Bafna, J. Michaelson, E.J. Gardner, R.E. Mills, G. Dayama, K. Chen, X. Fan, Z. Chong, T. Chen, M.J. Chaisson, J. Huddleston, M. Malig, B.J. Nelson, N.F. Parrish, B. Blackburne, S.J. Lindsay, Z. Ning, Y. Zhang, H. Lam, C. Sisu, D. Challis, U.S. Evani, J. Lu, U. Nagaswamy, J. Yu, W. Li, L. Habegger, H. Yu, F. Cunningham, I. Dunham, K. Lage, J.B. Jespersen, H. Horn, D. Kim, R. Desalle, A. Narechania, M.A.W. Sayres, F.L. Mendez, G.D. Poznik, P.A. Underhill, D. Mittelman, R. Banerjee, M. Cerezo, T.W. Fitzgerald, S. Louzada, A. Massaia, F. Yang, D. Kalra, W. Hale, X. Dan, K.C. Barnes, C. Beiswanger, H. Cai, H. Cao, B. Henn, D. Jones, J.S. Kaye, A. Kent, A. Kerasidou, R. Mathias, P.N. Ossorio, M. Parker, C.N. Rotimi, C.D. Royal, K. Sandoval, Y. Su, Z. Tian, S. Tishkoff, M. Via, Y. Wang, H. Yang, L. Yang, J. Zhu, W. Bodmer, G. Bedoya, Z. Cai, Y. Gao, J. Chu, L. Peltonen, A. Garcia-Montero, A. Orfao, J. Dutil, J.C. Martinez-Cruzado, R.A. Mathias, A. Hennis, H. Watson, C. McKenzie, F. Qadri, R. LaRocque, X. Deng, D. Asogun, O. Folarin, C. Happi, O. Omoniwa, M. Stremlau, R. Tariyal, M. Jallow, F.S. Joof, T. Corrah, K. Rockett, D. Kwiatkowski, J. Kooner, T.T. Hien, S.J. Dunstan, N. ThuyHang, R. Fonnier, R. Garry, L. Kanneh, L. Moses, J. Schieffelin, D.S. Grant, C. Gallo, G. Poletti, D. Saleheen, A. Rasheed, L.D. Brooks, A.L. Felsenfeld, J.E. McEwen, Y. Vaydylevich, A. Duncanson, M. Dunn, J.A. Schloss, A global reference for human genetic variation, *Nature*. 526 (2015) 68–74.
doi:10.1038/nature15393.

[20] A.R.R. Cain, B.E. Ryman, High liver glycogen in hereditary fructose intolerance, *Gut*. 12 (1971) 929–932. doi:10.1136/gut.12.11.929.

[21] J. Jaeken, M. Pirard, M. Adamowicz, E. Pronicka, E. Van Schaftingen, Inhibition of Phosphomannose Isomerase by Fructose 1-Phosphate: An Explanation for Defective N-Glycosylation in Hereditary Fructose Intolerance, *Pediatr. Res.* 40 (1996) 764–766.

doi:10.1203/00006450-199611000-00017.

[22] F. Sperb-ludwig, F.C. Pinheiro, M.B. Soares, T. Nalin, E.M. Ribeiro, C.E. Steiner, G. Valadares, Eugênia RibeiroPorta, C.F.M. De Souza, I.V.D. Schwartz, Glycogen storage diseases : Twenty - seven new variants in a cohort of 125 patients, *Mol. Genet. Genomic Med.* (2019) 1–10. doi:10.1002/mgg3.877.

[23] K. Ebert, H. Witt, Fructose malabsorption, *Mol. Cell. Pediatr.* 3 (2016) 3–7. doi:10.1186/s40348-016-0035-9.

[24] F. Di Dato, S. Spadarella, M.G. Puoti, M.G. Caprio, S. Pagliardini, C. Zuppaldi, G. Vallone, S. Fecarotta, Daily Fructose Traces Intake and Liver Injury in Children with Hereditary Fructose Intolerance, *Nutrients.* 11 (2019) 1–12. doi:10.3390/nu11102397.

[25] C.C. Brooks, D.R. Tolan, A partially active mutant aldolase B from a patient with hereditary fructose intolerance, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 8 (1994) 107–113. doi:10.1096/fasebj.8.1.8299883.

[26] N.C.P. Cross, D.R. Tolan, T.M. Cox, Catalytic deficiency of human aldolase B in hereditary fructose intolerance caused by a common missense mutation, *Cell.* 53 (1988) 881–885. doi:10.1016/S0092-8674(88)90349-2.

[27] D.R. Tolan, Molecular Basis of Hereditary Fructose Intolerance : Mutations and Polymorphisms in the Human Aldolase B Gene, *Hum. Mutat.* 6 (1995) 210–218.

[28] E.M. Coffe, D.R. Tolan, Mutations in the promoter region of the Aldolase B gene that cause Hereditary Fructose Intolerance, *J. Inhe.* 33 (2010) 715–725. doi:10.1007/s10545-010-9192-5.

[29] A. Davit-spraul, C. Costa, M. Zater, D. Habes, J. Berthelot, P. Broué, F.F. Feillet, O. Bernard, P. Labrune, C. Baussan, P. Brou??, F.F. Feillet, O. Bernard, P. Labrune, C. Baussan, Hereditary fructose intolerance : Frequency and spectrum mutations of the aldolase B gene in a large patients cohort from France — Identification of eight new mutations, *Mol. Genet. Metab.* 94 (2008) 443–447. doi:10.1016/j.ymgme.2008.05.003.

[30] C. Dazzo, D.R. Tolan, Molecular evidence for compound heterozygosity in hereditary fructose intolerance, *Am. J. Hum. Genet.* 46 (1990) 1194–1199. <https://drive.google.com/file/d/0B2iI4350sGvddHRORlhasaDI4b2M/view%255Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2339710>.

[31] M. Ali, C.L. James, M. Cox, A Newly Identified Adolase B Splicing Mutation (G-->C, 5 ' intron 5) in Hereditary Fructose Intolerance From New Zealand, *Hum. Mutat.* 7

- (1996) 155–157. doi:10.1002/(SICI)1098-1004(1996)7:2<155::AID-HUMU11>3.0.CO;2-1.
- [32] D.R. Tolan, C.C. Brooks, Molecular analysis of common aldolase B alleles for hereditary fructose intolerance in North Americans, *Biochem. Med. Metab. Biol.* 48 (1992) 19–25. doi:10.1016/0885-4505(92)90043-X.
- [33] R. Santer, J. Rischewski, M. von Weihe, M. Niederhaus, S. Schneppenheim, K. Baerlocher, A. Kohlschütter, A. Muntau, H.-G. Posselt, B. Steinmann, R. Schneppenheim, The spectrum of aldolase B (ALDOB) mutations and the prevalence of hereditary fructose intolerance in Central Europe., *Hum. Mutat.* 25 (2005) 594. doi:10.1002/humu.9343.
- [34] J.C. Sánchez-Gutiérrez, T. Benlloch, M.A. Leal, B. Samper, I. García-Ripoll, J.E. Felú, Molecular analysis of the aldolase B gene in patients with hereditary fructose intolerance from Spain., *J. Med. Genet.* 39 (2002) e56. doi:10.1136/jmg.39.9.e56.
- [35] G. Esposito, L. Vitagliano, R. Santamaria, A. Viola, A. Zagari, F. Salvatore, Structural and functional analysis of aldolase B mutants related to hereditary fructose intolerance, *FEBS Lett.* 531 (2002) 152–156. doi:10.1016/S0014-5793(02)03451-8.
- [36] A.D. Malay, K.N. Allen, D.R. Tolan, Structure of the Thermolabile Mutant Aldolase B , A149P : Molecular Basis of Hereditary Fructose Intolerance, *J. Mol. Biol.* 347 (2005) 135–144. doi:10.1016/j.jmb.2005.01.008.
- [37] T.M. Cox, Aldolase B and fructose intolerance, *FASEB J.* 8 (1994) 62–71.
- [38] A.M. De Souza, S.S. Resende, T.N. De Sousa, C.F.A. De, A systematic scoping review of the genetic ancestry of the Brazilian population, *Genet. Mol. Biol.* 42 (2019) 495–508. doi:http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2018-0076.
- [39] J.A. Pezza, K.H. Choi, T.Z. Berardini, P.T. Beernink, K.N. Allen, D.R. Tolan, Spatial clustering of isozyme-specific residues reveals unlikely determinants of isozyme specificity in fructose-1,6-bisphosphate aldolase, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 17307–17313. doi:10.1074/jbc.M209185200.
- [40] P. Rellos, J. Sygusch, T.M. Cox, Expression , Purification , and Characterization of Natural Mutants of Human Aldolase B, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 1145–1151.
- [41] F.S.G. Kehdy, M.H. Gouveia, M. Machado, W.C.S. Magalhães, A.R. Horimoto, Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations, *PNAS.* 112 (2015) 8696–8701. doi:10.1073/pnas.1504447112.

Tabela 1: Manifestações clínicas de pacientes brasileiros com intolerância hereditária à frutose.

ID	Gênero	Origem	Manifestações clínicas	IFT	Idade (anos) ^c
1 ^a	M	S	Hepatomegalia, aversão à doces, crise hipoglicêmica após ingestão de frutas.	Alterado	15
2 ^a	F	S	Hepatomegalia, aversão a frutas e doces, crise hipoglicêmica após ingestão de frutas.	Alterado	12
3	F	S	Hepatomegalia, aversão à doces.	Alterado	3
4	M	S	Hepatomegalia, aversão a frutas e doces.	Alterado	2
5	M	S	Hepatomegalia, sintomas gastrointestinais, aversão a legumes.	Normal	1
6	M	S	Náusea e vômitos após ingerir doces, aversão à doces.	NR	42
7 ^a	F	SE	Vômitos, diarreia e aversão à doces.	NR	23
8	F	SE	Hipoglicemia acompanhada de crise convulsiva, vômitos e diarreia, aversão à doces.	NR	5
9 ^b	F	SE	Hepatomegalia com esteatose, vômitos.	NR	ND
10 ^b	M	SE	Hepatomegalia, vômitos, letargia.	NR	ND
11 ^a	M	NE	Hepatomegalia, esteatose, hipoglicemia, vômitos e diarreia, convulsões após ingestão de frutose.	NR	15
12	F	S	Hipoglicemia cetótica, aversão a frutas e doces.	NR	6
13	M	S	Hipoglicemia, aversão a frutas, vômitos após ingestão de frutas.	Normal	15
14	F	S	Crises de vômitos e diarreia após a ingestão de doces e frutas, colesterolemia, microalbuminúria e crises hipoglicêmicas.	NR	10
15	F	S	Crise de hipoglicemia associada com episódios de infecção.	NR	7
16	M	S	Cirrose idiopática.	NR	7
17	M	S	Insuficiência hepática aguda idiopática.	NR	10
18	F	S	Crises de vômito após a ingestão de frutas.	NR	2
19	F	CO	Aversão a frutas e doces, crise hipoglicêmica após ingestão de frutas, inchaço abdominal.	NR	28
20	F	CO	Crise hipoglicêmica após ingestão de frutas, náusea e vômitos.	NR	37
21	F	CO	Dores abdominais, crises de vômito após ingestão de doces, acidose metabólica, crise hipoglicêmica após ingestão de frutas.	NR	48
22	M	NE	Crises de náusea e vômitos após a ingestão de frutas, acidose metabólica.	NR	5

Nota: F=feminino; M=masculino; S=Sul; SE=Sudeste; NE=Nordeste; CO=Cento-Oeste; NR=não realizado; ND=não disponível; IFT=isoeletrofocalização para transferrina; ^a pacientes com diagnóstico genético prévio; ^b pacientes previamente descritos (Valadares, 2015); ^c idade na inclusão do estudo. Em negrito, os pacientes em que o diagnóstico genético foi confirmado.

Tabela 2: Genótipo e haplótipo de pacientes brasileiros com intolerância hereditária à frutose.

ID	Genótipo		rs1929480 (c.540+84A>C)	rs506571 (c.800-76T>C)	rs681 (c.999+84T>C)	rs682 (c.999+105G>A)
	cDNA	Proteína				
1 ^a	c.360_363delCAAA(;);448G>C	p.Asn120Lysfs*32(;);Ala150Pro	A/C		T/C	G/A
2 ^a	c.[178C>T];[448G>C]	p.[Arg60*];[Ala150Pro]	A/C		T/C	G/A
M2	c.[448G>C];[448=]	p.[Ala150Pro];[Ala150=]	A/C	T/C	T/C	G/A
P2	c.[178C>T];[178=]	p.[Arg60*];[Arg60=]	A/A	T/C	T/C	G/A
3	c.[360_363delCAAA];[448G>C]	p.[Asn120Lysfs*32];[Ala150Pro]	A/C		T/C	G/A
M3	c.[448G>C];[448=]	p.[Ala150Pro];[Ala150=]	A/C	T/T	T/T	G/G
P3	c.[360_363delCAAA];[360_363=]	p.[Asn120Lysfs*32];[Asn120=]	A/A	C/C	C/C	A/A
I3	c.[360_363delCAAA];[448G>C]	p.[Asn120Lysfs*32];[Ala150Pro]				
4	c.[360_363delCAAA];[448G>C]	p.[Asn120Lysfs*32];[Ala150Pro]	A/C	T/C	T/C	G/A
M4	c.[360_363delCAAA];[360_363=]	p.[Asn120Lysfs*32];[Asn120=]	A/A	T/C	C/C	A/A
P4	c.[448G>C];[448=]	p.[Ala150Pro];[Ala150=]	C/C	T/T	T/T	G/G
5	c.360_363delCAAA(;);524C>A	p.Asn120Lysfs*32(;);Ala175Asp	A/A	C/C	C/C	A/A
6	c.448G>C (;)(448G>C)	p.Ala150Pro(;)(Ala150Pro)	C/C		T/T	G/G
7 ^{ab}	c.178C>T ;(178C>T)	p.Arg60*(;)(Arg60*)	A/A	C/C	C/C	A/A
P7	c.[178C>T];[178=]	p.[Arg60*];[Arg60=]	A/A	T/C	C/C	A/A
8	c.[178C>T];[360_363delCAAA]	p.[Arg60*];[Asn120Lysfs*32]	A/C	T/T	T/T	G/G
M8	c.[360_363delCAAA];[360_363=]	p.[Asn120Lysfs*32];[Asn120=]	A/A	T/C	T/C	G/A
P8	c.[178C>T];[178=]	p.[Arg60*];[Arg60=]	A/C	T/T	T/T	G/G
9 ^c	c.[178C>T];[360_363delCAAA]	p.[Arg60*];[Asn120Lysfs*32]	A/A	C/C	C/C	A/A
M9	c.[178C>T];[178=]	p.[Arg60*];[Arg60=]	A/A	T/C	C/C	A/A
P9	c.[360_363delCAAA];[360_363=]	p.[Asn120Lysfs*32];[Asn120=]	A/A	C/C	C/C	A/A
10 ^c	c.178C>T(;);360_363delCAAA	p.Arg60*(;);Asn120Lysfs*32	A/A	T/C	T/C	G/A
11 ^a	c.[178C>T];[360_363delCAAA]	p.[Arg60*];[Asn120Lysfs*32]	C/C	T/T	T/T	G/G
M11	c.[178C>T];[178=]	p.[Arg60*];[Arg60=]	A/C	T/T	T/T	G/G
P11	c.[360_363delCAAA];[360_363=]	p.[Asn120Lysfs*32];[Asn120=]	A/C	T/T	T/T	G/G

Nota: Em negrito, os pacientes; ^a pacientes com diagnóstico genético prévio; ^b pais consanguíneos; ^c pacientes previamente descritos [18]; M=mãe; P=pai; I=irmão.

Tabela 3: Frequência de variantes patogênicas em *ALDOB* comuns na população brasileira.

Variante		Frequência em	Frequência em	Total
CDS	Proteína	17 alelos ^a	8 alelos ^b	
c.178C>T	c.Arg60*	24% (4/17)	25% (2/8)	24% (6/25)
c.360_363delCAAA	p.Asn120Lysfs*32	35% (6/17)	25% (2/8)	32% (8/25)
c.448G>C	p.Ala150Pro	35% (6/17)	12.5% (1/8)	28% (7/25)
c.524C>A	p.Ala175Asp	6% (1/17)	37.5% (3/8)	16% (4/25)

Nota: ^aEste estudo, pacientes 9 e 10 foram excluídos das análises porque estavam presentes na amostra do estudo de Valadares (2015); ^bValadares et al (2015). O número de alelos considerou a consanguinidade entre pais.

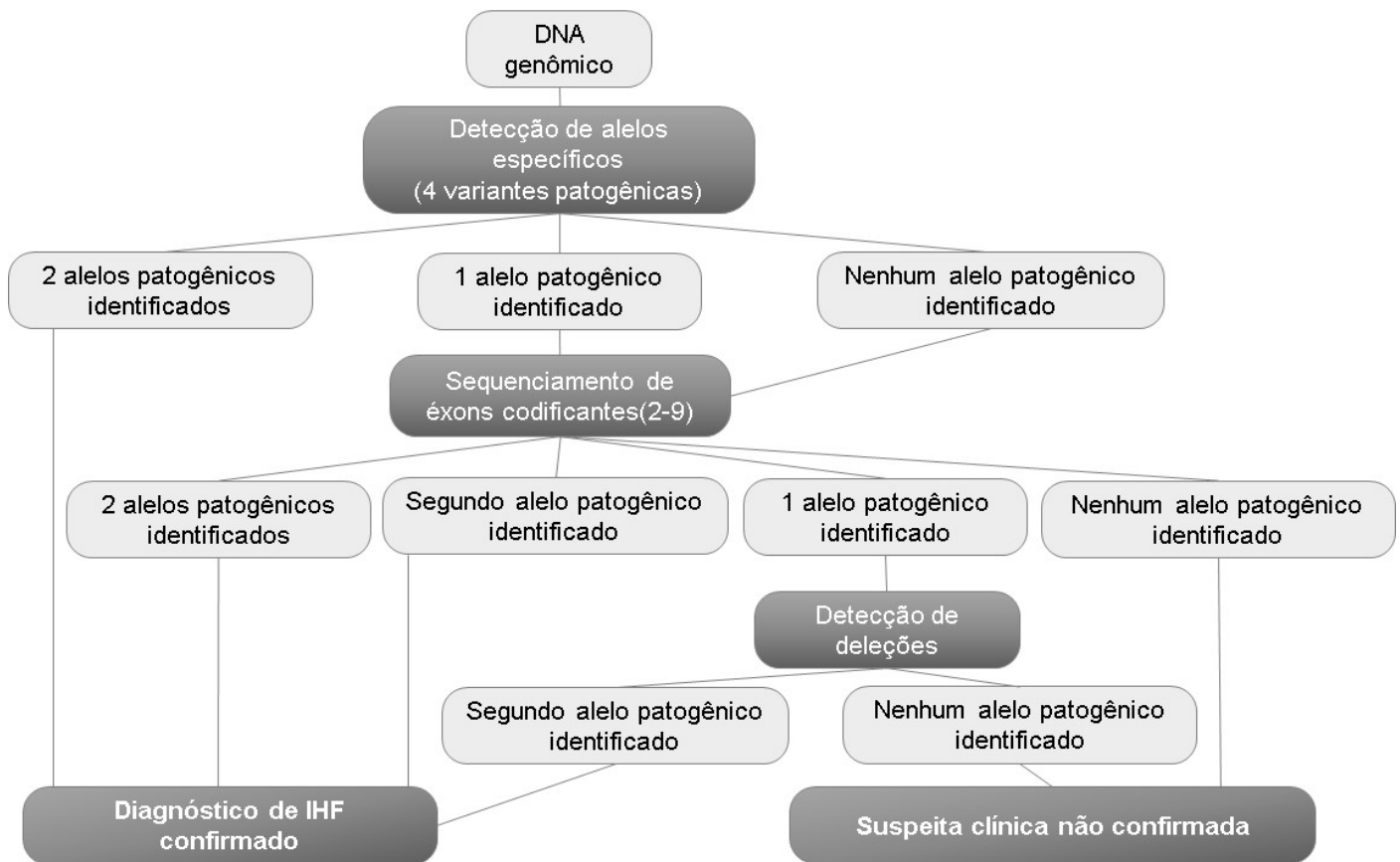


Figura 1: Algoritmo para o diagnóstico genético de IHF em pacientes brasileiros. A análise inicia pela busca das variantes mais frequentes na população brasileira: c.178C>T, c.360_363delCAAA, c.448G>C e c.524C>A. Para pacientes com apenas um alelo detectado, os outros éxons codificantes devem ser analisados. Em paciente com um alelo detectado após a segunda rodada de análises, buscar por deleções pode melhorar a análise molecular.

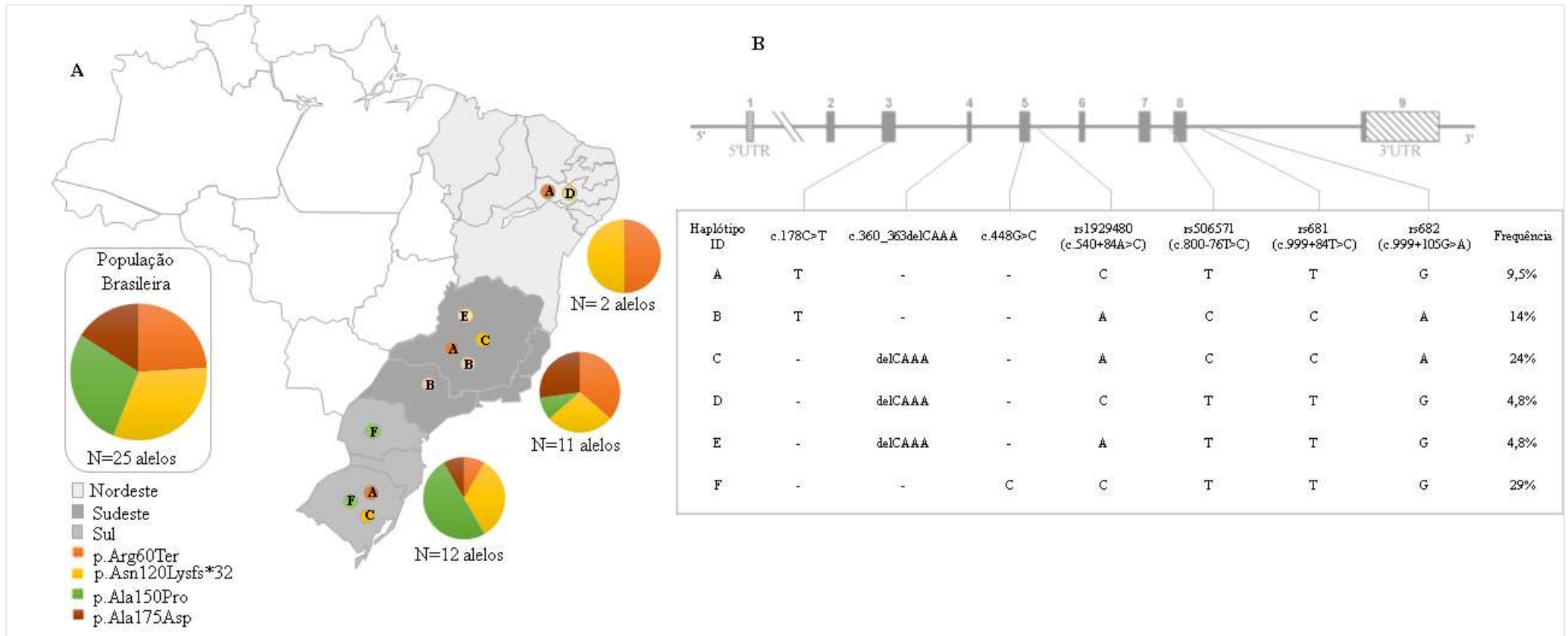


Figura 2: Perfil alélico de pacientes brasileiros com IHF. A) Mapa do território brasileiro com gráficos da frequência alélica por região geográfica (baseado no presente estudo e em Valadares (2015)). B) Representação do gene *ALDOB*, com éxons e regiões 5'UTR e 3'UTR representadas. No quadro são indicados os alelos que formam cada haplótipo.

7.3. Capítulo 3: The variant p.(Lys204Argfs*72) in fructose-1,6-biphosphatase mutant lacks substrate binding sites.

O terceiro capítulo consiste no relato de caso de uma paciente com DFB do Nordeste brasileiro que apresenta uma variante patogênica diferente das que foram detectadas em pacientes do Sul do Brasil. Essa variante foi previamente descrita na literatura em pacientes do Paquistão e da Índia. Foi aplicada uma abordagem *in silico* para descrever as prováveis consequências da variante na enzima FBPase. Esse capítulo responde pelos objetivos específicos V e VI.

Esse capítulo será apresentado na forma de artigo que será submetido à revista “Molecular Genetics and Metabolism Reports”, cujo fator de impacto é 1.845 e o Qualis Capes da área Genética (Ciências Biológicas I) é B4. O formato obedece às normas da revista.

Situação do artigo: em preparação.

CASE REPORT

The variant p.(Lys204Argfs*72) in the fructose-1,6-biphosphatase mutant lacks substrate binding sites

Authors and affiliations:

Franciele Cabral Pinheiro

Post Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil; BRAIN Laboratory, Center for Experimental Research (CPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil; Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Itaqui, RS, Brazil.

Rodrigo Ligabue-Braun

Post Graduate Program in Cell and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil;

Carolina Fischinger Moura de Souza

Medical Genetics Service, HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil.

Ana Cecília Menezes

CETREIM-Recife, PB, Brazil

Camila Matuella

BRAIN Laboratory, Center for Experimental Research (CPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Fernanda Sperb Ludwig

Post Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil; BRAIN Laboratory, Center for Experimental Research (CPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Post Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil; BRAIN Laboratory, Center for Experimental Research (CPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil; Medical Genetics Service, HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author:

For all processes of publication: Franciele Cabral Pinheiro (fcpbio@gmail.com)

Present/permanent address:

Medical Genetic Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos,
350, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract

Background: Fructose-1,6-biphosphatase (FBPase) deficiency is a rare inborn error of fructose (IEM) metabolism caused by pathogenic variants in the *FBPI* gene. As gluconeogenesis is affected, catabolic episodes can induce ketotic hypoglycemia in patients. *FBPI* analysis is the most commonly used approach for the diagnosis of this disorder. **Case report:** The proband, a 1.5-year-old Brazilian girl born to a consanguineous couple, presented with a severe hypoglycemia crisis, metabolic acidosis with respiratory infection. Genetic analysis was performed by next-generation sequencing (NGS), identifying the c.611_614delAAAA allele in homozygosis in the *FBPI* gene. *In silico* analyses and 3D modeling were performed, suggesting that this allele is associated with a loss of sites for substrate and Mg²⁺ binding and for posttranslational modifications of FBPase. **Conclusions:** The c.611_614delAAAA variant is located in a repetitive region of the *FBPI* gene that appears to be a hotspot for mutational events. This allele results in an intrinsically disordered protein with loss of substrate recognition and post-translational modification sites.

Key words: inborn error of fructose metabolism, NGS, FBPase deficiency, computational analysis, *in silico* analysis.

1. Introduction:

Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) deficiency (OMIM #229700) is a rare inborn error of fructose metabolism that presents recessive autosomal inheritance caused by pathogenic variants in the *FBPI* gene. Patients with this disorder fail to convert fructose-1,6-bisphosphate into fructose-6-phosphate and inorganic phosphorus, a key reaction of gluconeogenesis that occurs in the liver and kidneys. The first symptom presented is hypoglycemia associated with catabolic episodes such as prolonged fasting or high fever. In addition, other biochemical manifestations include elevated blood lactate, ketonuria and metabolic acidosis [1].

Currently, the diagnosis is usually provided by genetic analysis of the *FBPI* gene, which is located on chromosome 9q22.2-22.3. The gene spans approximately 31 Kb and includes eight exons, seven of which are translated in an enzyme comprising 362 amino acids and are expressed in the liver and kidneys [2]. The Human Gene Mutation Database (HGMD®) [3] describes 54 different variants involved in the pathogenesis of this disorder, including three variants detected in Brazilian patients [4]. The treatment consists of decreasing fructose intake and avoiding long-term fasting. Early diagnosis and treatment result in a good prognosis in patients with FBPase deficiency [5].

Herein, we described a case of a Brazilian patient with FBPase deficiency who presented a homozygous deletion of four base pairs in the *FBPI* gene.

2. Methodology:

This study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (project no. 17-0450), and the patient provided written informed consent for participation.

2.1. Case Report

The proband is a 2.8-year-old girl born to consanguineous healthy Brazilian parents at the 40th week after an uneventful pregnancy and natural delivery. The birth weight was 2.8 kg. In the first 24 hours, she presented symptomatic hypoglycemia and was admitted to an intensive care unit (ICU) for three days. The child's development was normal until 1 year and 5 months of life, when she presented a new hypoglycemic crisis associated with a febrile episode and dyspnea. She was admitted to a hospital presenting metabolic acidosis and seizures; bronchopneumonia was diagnosed, and the patient remained hospitalized for 10 days.

Three months later, the child was referred to a Reference Center for Inborn Errors of Metabolism, and a next-generation sequencing (NGS) panel for 116 treatable IEMs was requested (Agilent Mendelics Custom Panel V3). This panel includes genes for the most frequent causes of monogenic recurrent hypoglycemia/metabolic acidosis, such as organic acidurias, hepatic glycogenosis, beta oxidation defects and IEM of fructose metabolism. NGS revealed that the patient was homozygous for the NM_001127628.1:c.611_614delAAAA allele in the *FBPI* gene, and a specific diet for FBPase was started. Despite the difficulties in maintaining the diet, the patient remains well, with normal cognitive development and no other episodes of decompensation (Table 1).

2.2. Genetic analysis:

To validate the NGS findings, genomic DNA samples were obtained from the saliva of the patient and her mother using prepIT[®]·L2P (Origene) according to the manufacturer's guidelines. Sanger sequencing of the *FBPI* gene was performed on the ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequence analyses were performed in Chromas 2.6.1 software (Technelysium) and in BLAST (NCBI). The reference sequence was NM_001127628.1. American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) recommendations were used to predict the pathogenicity of the variant [6].

2.3. *In silico* analysis:

The characterization of the variant included database frequency (gnomAD v2.1.1), pathogenicity predictors (SIFT Indel and Mutation Taster), and a nonsense mRNA decay predictor NMDEscPredictor [7]. The Translate tool ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>) was used to translate the sequence of the mutant cDNA into the predicted amino acid sequence. The structural modeling of the wild-type (WT) and mutated FBPase structures was performed using the I-TASSER package [8,9]. The visualization of the structures was performed in PyMOL software (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC). Functional sites were identified based on UniProt entry P09467 (The UniProt Consortium, 2019). Molecular properties were calculated with ProtParam [10] for molecular weight, theoretical pI, and number of charged residues; ProteinVolume 1.3 [11] for molecular volume estimation; and GETAREA [12] for molecular area estimation. Protein motif detection was performed with ScanProsite [13]; protein disorder propensity was assessed with PrDOS [14]; and structural description was carried out with PROCHECK [15].

3. Results:

Sanger sequencing confirmed the genotype of the patient and showed the mother as a carrier of the allele c.611_614delAAAA (p.(Lys204Argfs*72)) (Figure 1A). According to the ACMG criteria PVS1, PP3 and PM, the variant was classified as pathogenic.

This variant is present in gnomAD (v2.1.1) in two alleles from South Asian controls with a frequency of 7.954e-6 and predicted to result in a transcript with a premature termination codon (PTC) located 72 codons after the first bp deletion (Figure 2). The SIFT Indel and Mutation Taster software programs predict this allele as damaging (score 0.858) and disease causing, respectively. NMDEscPredictor showed that the mutant transcript escapes nonsense-mediated decay (NMD).

The *in silico* analysis showed that the variant resulted in a protein with altered molecular properties, including an increased surface area (Table 2 and Figures 1B and C) and a greater propensity for the disorder than wild-type FBPase (Figure 1D, 2 and 3). The results indicated the possible loss of post-translational modification sites: two N-myristoylation sites (293-298, 294-299), two serine phosphorylation sites (211, 321), and one threonine phosphorylation site (298). However, a new threonine phosphorylation site has been proposed (226).

4. Discussion:

We report herein a case of a Brazilian patient with a pathogenic variant (c.611_614delAAAA) in homozygosity previously found in one Pakistani [16] and in two heterozygous Indian [17,18] patients with FBPase deficiency. This is the first time this genotype has been described in a Brazilian patient, showing the genetic heterogeneity of FBPase deficiency in the country.

The c.611_614delAAAA allele is located in a repetitive region of exon 6 of the *FBPI* gene (5'-GAAGATAAAAAAGAAATAAAAT-3'). This sequence favors DNA polymerase slipping during replication and the appearance of deletions/insertions in the nucleotide sequence. Therefore, this could be considered a hot spot region; most likely, this allele emerged independently in the three families previously reported [16–18]. In addition, c.611_614delAAAA is present in the gnomAD database only in South Asian controls. The distribution of this allele reinforces the hypothesis that this may be a pan-ethnic allele, such as the most common pathogenic variant in *FBPI*, the c.959dupG allele [19].

FBPase is mainly expressed in the liver and intestine, so the analysis of enzyme activity for the diagnosis of FBPase deficiency requires a liver biopsy, an invasive procedure that should be avoided. According to the NMDEscPredictor software, the c.611_614delAAA allele escapes from NMD, so it is possible that the mutant mRNA is translated into a protein with residual activity. However, FBPase activity was not measured in our patient or in the Pakistani and Indian patients [16–18], since it would require liver biopsy samples. It is important to point out that NMD exhibits variability in its efficiency across transcripts, cells, tissues, and individuals in both physiological and pathological contexts, and nonsense variants can escape NMD via many routes [20].

FBPase is a 37 kDa homotetramer whose activity is modulated by inhibitors and inducers. The concentration of the ligands in the active and allosteric sites determines the conformational structure of the enzyme. Thus, the presence of AMP and fructose-2,6-bisphosphate induces an inactive state of FBPase. On the other hand, the fructose-1,6-bisphosphate substrate favors the active state of the enzyme. In addition, the ideal catalytic activity of FBPase depends on cofactors such as Mg^{2+} [21,22].

The computational analysis showed that the mutant lacks substrate binding sites, in addition to other important regions as a site of linkage with Mg^{2+} (Figure 2), according previously predicted by Ijaz et al. [16]. The refinement of the analysis showed that the mutant enzyme had a larger surface area because of the increase in coiled regions (Figure 1). This characteristic is implicated in the interactions of the mutant enzyme because the variant region is exposed to the cellular medium. Thus, the interaction of the mutant with other monomers to form the functional tetramer [23] would be less affected than interactions with other molecules (Figure 3). In addition, the increase in coiled regions (Figure 1C) induces the formation of a structurally disordered protein, influencing its stability. Disordered regions are able to bind more partners and bestow new functions to otherwise ordered proteins [24]. This is especially relevant in neurodegenerative disorders and various types of cancer [25].

FBPase deficiency is a severe disorder that can be fatal, mainly in newborns. Early diagnosis helps to increase the survival rate and patient quality of life. The definitive diagnosis is provided by identification of the two pathogenic alleles in the *FBP1* gene. However, the classification of variants is a challenge in the clinical routine, and the *in silico* tools assist in this process. Thus, the computational approach has been used to predict the pathogenicity and molecular mechanisms involved in variants causing different human diseases [26]. In this sense, based on *in silico* analyses, we described the

molecular alterations implicated in the pathogenesis of the c.611_614delAAAA variant, a pan-ethnic allele involved in FBPase deficiency.

5. Acknowledgments

The authors acknowledge FIPE-HCPA, CAPES, CNPq, and the Post Graduate Program of Genetics and Molecular Biology-UFRGS for financial support.

6. References:

- [1] B. Steinmann, R. Santer, G. van der Berghe, Disorders of Fructose Metabolism, in: *Inborn Metab. Dis. Diagnosis Treat.*, 2012: pp. 1–657. doi:10.1007/978-3-642-15720-2.
- [2] M. El-Maghrabi, A.J. Lange, W. Jiang, K. Yamagata, M. Stoffel, J. Takeda, A.A. Fernald, M.M. Le Beau, G.I. Bell, L. Baker, S.J. Pilkis, Human Fructose-1,6-Bisphosphatase Gene (FBP1): Exon-Intron Organization, Localization to Chromosome Bands 9q22.2-q22.3, and Mutation Screening in Subjects with Fructose-1,6-Bisphosphatase Deficiency, *Genomics*. 27 (1995) 520–525. doi:10.1006/geno.1995.1085.
- [3] P.D. Stenson, M. Mort, · Edward V Ball, K. Evans, M. Hayden, S. Heywood, M. Hussain, A.D. Phillips, D.N. Cooper, The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies, *Hum. Genet.* 136 (2017) 665–677. doi:10.1007/s00439-017-1779-6.
- [4] F.C. Pinheiro, F. Sperb-Ludwig, R. Ligabue-Braun, L. Schüler-Faccini, C.F.M. de Souza, F. Vairo, I.V.D. Schwartz, Genetic analysis of patients with fructose-1,6-bisphosphatase deficiency, *Gene*. 699 (2019) 102–109. doi:10.1016/j.gene.2019.03.007.
- [5] A. Pinto, M. Alfadhel, R. Akroyd, Y.A. Alt, S.M. Bernabei, L. Bernstein, G. Bruni, G. Caine, E. Cameron, R. Carruthers, B. Cochrane, A. Daly, F. de Boer, S. Delaunay, A. Dianin, M. Dixon, E. Drogari, S. Dubois, S. Evans, J. Gribben, G. Gugelmo, C. Heindenborg, I. Hunjan, I.L. Kok, B. Kumru, A. Liguori, D. Mayr, E. Megdad, U. Meyer, R.B. Oliveira, A. Pal, A. Possoli, R. Pretese, J.C. Rocha, S. Rosenbaum-Fabian, J. Serrano Nieto, E. Sjoqvist, C. Timmer, L. White, T. van der Hurk, M. van Rijn, H. Sweers, M. Ziadlou, A. MacDonald, International practices in the dietary management of fructose 1-6 biphosphatase deficiency, *Orphanet J.*

- Rare Dis. 13 (2018) 1–6. doi:10.1186/s13023-018-0760-3.
- [6] S. Richards, N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, W.W. Grody, M. Hedge, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding, H.L. Rehm, Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology, *Genet. Med.* 17 (2015) 405–424. doi:10.1038/gim.2015.30.
- [7] Z. Coban-akdemir, J.J. White, X. Song, S.N. Jhangiani, J.M. Fatih, T. Gambin, Y. Bayram, I.K. Chinn, E. Karaca, J. Punetha, C. Poli, M. Genomics, E. Boerwinkle, C.A. Shaw, J.S. Orange, R.A. Gibbs, T. Lappalainen, J.R. Lupski, C.M.B. Carvalho, Identifying Genes Whose Mutant Transcripts Cause Dominant Disease Traits by Potential Gain-of-Function Alleles, *Am. J. Hum. Genet.* 103 (2018) 171–187. doi:10.1016/j.ajhg.2018.06.009.
- [8] J. Yang, R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson, Y. Zhang, The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction, *Nat. Methods.* 12 (2014) 7–8. doi:10.1038/nmeth.3213.
- [9] Y. Zhang, I-TASSER server for protein 3D structure prediction, *BMC Bioinformatics.* 9 (2008) 40. doi:10.1186/1471-2105-9-40.
- [10] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M.R. Wilkins, R.D. Appel, A. Bairoch, Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, in: *Proteomics Protoc. Handb.*, 2005: pp. 571–607.
- [11] Q. Chen, T.T. Wang, J. Li, S. Wang, F. Qiu, H. Yu, Y. Zhang, T.T. Wang, Effects of natural products on fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), *Nutrients.* 9 (2017). doi:10.3390/nu9020096.
- [12] R. Fraczekiewicz, W. Braun, Exact and Efficient Analytical Calculation of the Accessible Surface Areas and Their Gradients for Macromolecules, *J. Comput. Chem.* 19 (1998) 319–333.
- [13] E. De Castro, C.J.A. Sigrist, A. Gattiker, V. Bulliard, P.S. Langendijk-genevaux, E. Gasteiger, A. Bairoch, N. Hulo, ScanProsite : detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 362–365. doi:10.1093/nar/gkl124.
- [14] T. Ishida, K. Kinoshita, PrDOS : prediction of disordered protein regions from amino acid sequence, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 460–464. doi:10.1093/nar/gkm363.

- [15] R.A. LASKOWSKI, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 26 (1993) 283–291. doi:10.1107/S0021889892009944.
- [16] S. Ijaz, M.Y. Zahoor, M. Imran, K. Ramzan, M.A. Bhinder, H. Shakeel, M. Iqbal, A. Aslam, W. Shehzad, H.A. Cheema, H. Rehman, Genetic analysis of fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) deficiency in nine consanguineous Pakistani families, *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 30 (2017) 1203–1210. doi:10.1515/jpem-2017-0188.
- [17] P. Bhai, S. Bijarnia-Mahay, R.D. Puri, R. Saxena, D. Gupta, U. Kotecha, A. Sachdev, D. Gupta, V. Vyas, D. Agarwal, V. Jain, R.K. Bansal, T.G. Kumar, I.C. Verma, Clinical and molecular characterization of Indian patients with fructose-1,6-bisphosphatase deficiency: Identification of a frequent variant (E281K), *Ann. Hum. Genet.* 82 (2018) 309–317. doi:10.1111/ahg.12256.
- [18] A. Sharma, S. Kanwal, V. Chhapola, V. Kumar, Novel fructose bisphosphatase 1 gene mutation presenting as recurrent episodes of vomiting in an Indian child, *J. Postgrad. Med.* 64 (2018) 180–182. doi:10.4103/jpgm.JPGM_216_17.
- [19] Y. Kikawa, M. Inuzuka, B.Y. Jin, S. Kaji, J.-I. Koga, Y. Yamamoto, K. Fujisawa, I. Hata, A. Nakai, Y. Shigematsu, H. Mizunuma, A. Taketo, M. Mayumi, M. Sudo, Identification of genetic mutations in Japanese patients with fructose-1,6-bisphosphatase deficiency, *Am. J. Hum. Genet.* 61 (1997) 852–861. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-16944363755&partnerID=40&md5=e95282f95acfd9752b877672afe93528>.
- [20] M.C. Dyle, D. Kolakada, M.A. Cortazar, S. Jagannathan, How to get away with nonsense: Mechanisms and consequences of escape from nonsense-mediated RNA decay, *WIREs RNA.* 11 (2020) 1–16. doi:10.1002/wrna.1560.
- [21] H. Ke, Y. Zhang, W.N. Lipscomb, Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with fructose 6-phosphate, AMP, and magnesium, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87 (1990) 5243–5247.
- [22] R. Shi, Z. Chen, D. Zhu, C. Li, Y. Shan, G. Xu, S. Lin, Crystal Structures of Human Muscle Fructose-1,6-Bisphosphatase: Novel Quaternary States, Enhanced AMP Affinity, and Allosteric Signal Transmission Pathway, *PLoS One.* 8 (2013) e71242. doi:10.1371/journal.pone.0071242.
- [23] T.W. Von Geldern, C. Lai, R.J. Gum, M. Daly, C. Sun, H. Fry, C. Abad-zapatero, Benzoxazole benzenesulfonamides are novel allosteric inhibitors of fructose-1,6-

- bisphosphatase with a distinct binding mode, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 1811–1815. doi:10.1016/j.bmcl.2006.01.015.
- [24] V.N. Uversky, C.J. Oldfield, A.K. Dunker, Intrinsically Disordered Proteins in Human Diseases : Introducing the D 2 Concept, *Annu. Rev. Biophys.* 2 (2008). doi:10.1146/annurev.biophys.37.032807.125924.
- [25] A.H.S. Martinelli, F.C. Lopes, E.B.O. John, C.R. Carlini, R. Ligabue-braun, Modulation of Disordered Proteins with a Focus on Neurodegenerative Diseases and Other Pathologies, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019). doi:10.3390/ijms20061322.
- [26] A. Teckan, In Silico Analysis of FMR1 Gene Missense SNPs, *Cell Biochem. Biophys.* 74 (2016) 109–127. doi:10.1007/s12013-016-0722-0.
- [27] C. Lai, R.J. Gum, M. Daly, E.H. Fry, C. Hutchins, C. Abad-zapatero, T.W. Von Geldern, Benzoxazole benzenesulfonamides as allosteric inhibitors of fructose-1 , 6-bisphosphatase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 1807–1810. doi:10.1016/j.bmcl.2006.01.014.

Table 1 – Biochemical findings in the follow-up of a treated Brazilian patient with FBPase deficiency.

	1 y 9 m	2 y 3 m	2 y 8 m	Reference Value
Weight (kg)	15.2	15.7	12.8	-
Stature (cm)	82	88	94	-
ALT (U/L)	20	16	31	0–35
AST (U/L)	46	35	43	0–35
Glucose (micromol/L)	78	65	80	70–105
Lactate (mmol/L)		1.9		0.63–2.44
pH		7.38	7.34	7.38–7.44
Total Cholesterol	182	188	165	150–199
Low Density Lipoprotein (mmol/L)	114	118	113	≤ 130
High Density Lipoprotein (mmol/L)	52	48	51	≥ 40
Serum Triglycerides (mg/dL)	178	292	132	< 250
Uric Acid (mg/dL)	≤6.0	3.9	4.0	2,5–8

Table 2: Comparison of physical chemical properties of wild-type and p.(Lys204Argfs*72) mutant fructose-1,6-bisphosphatase.

Properties	Wild-Type	Mutant
Number of amino acids	338	274
Molecular weight (kDa)	36.8	29.7
Theoretical pI	6.54	7.53
Negatively charged residues	41	28
Positively charged residues	40	29
Volume (Å ³)	43,909	34,705
Area (Å ²)	16,164	16,352

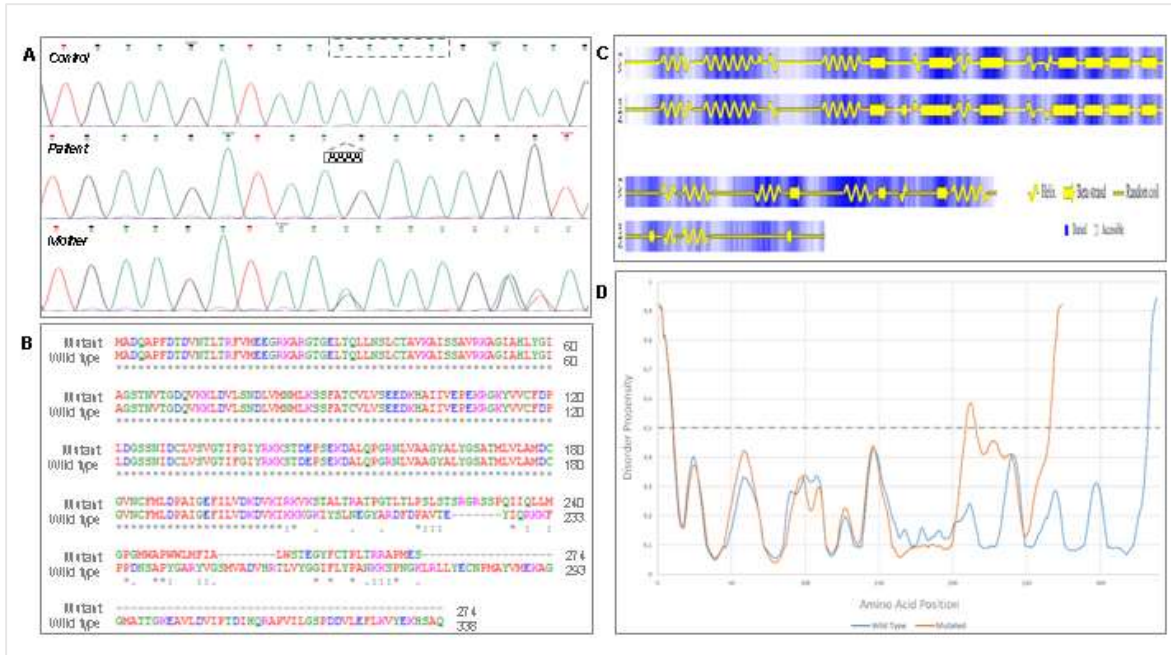


Figure 1: Genetic and *in silico* analyses of the p.(Lys204Argfs*72) variant in *FBPI*. A) Electropherogram of part of exon 6 of the genetic analyses of a normal control, the proband and her mother. The region affected in the patient is highlighted. B) Amino acid sequence of the FBPIase resulting from the pathogenic variant in comparison with the wild type. C) Secondary structure comparison between wild type (WT) and mutated (Mut.) FBPIases showing the shorter length and increase in coil content for the mutated enzyme. D) Disorder prediction for wild-type (blue line) and mutated (orange line) FBPIases.

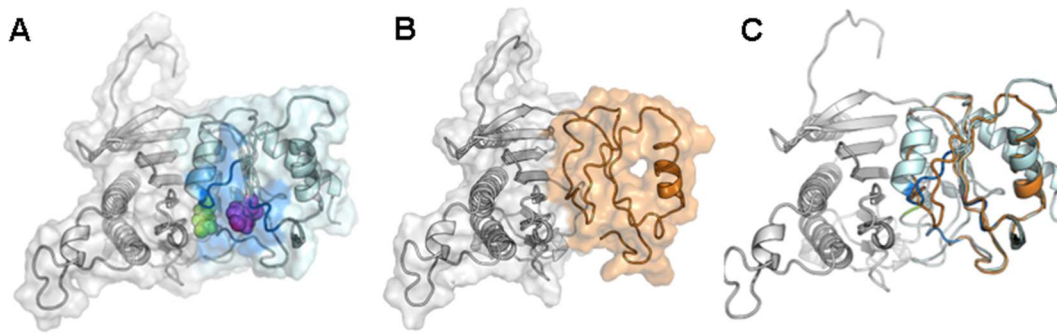


Figure 2: 3D modeling of fructose-1,6-bisphosphatase. A) Wild-type FBPase. The region affected in the mutant protein is shown in light blue, the altered substrate binding regions are shown in dark blue, the altered substrate recognition site is shown in magenta, and the altered Mg binding site is shown in green. B) Mutant FBPase. The region affected by the frameshift mutation is shown in orange. All sites highlighted in WT are absent in the mutant protein. C) The superposition of WT and mutant FBPase, colored according to A and B.

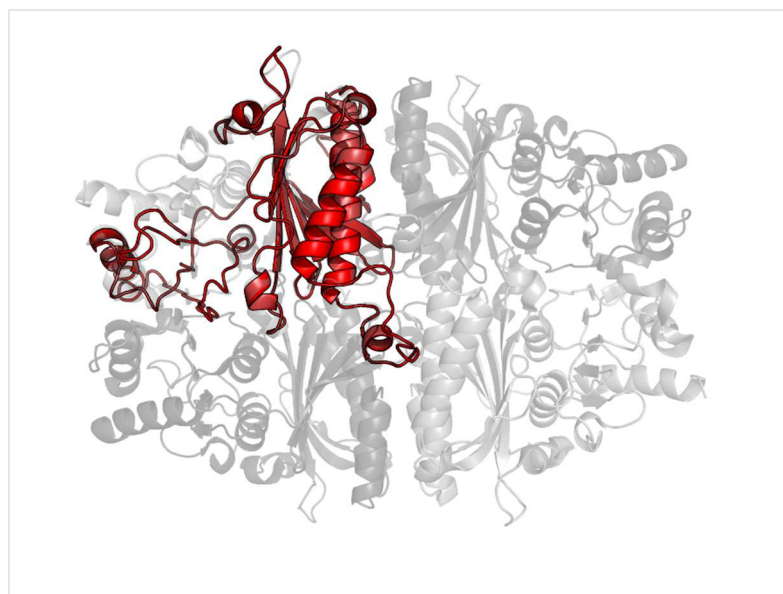


Figure 3: Structure of fructose-1,6-bisphosphatase tetramer. Superposition of mutant FBPase monomer (red) onto the functional FBPase tetramer (in different shades of gray). Note the absence of structured elements in the exposed region of the monomer. Tetramer information from PDB ID 2FIE [27].

7.4. Capítulo 4: Genetic analysis of patients with fructose-1,6-biphosphatase deficiency.

O quarto capítulo consiste na caracterização de seis pacientes com DFB do Sul do Brasil. Foi realizada a análise genética com abordagem baseada no uso de plataforma NGS. Foram descritas duas novas variantes patogênicas no gene *FBPI*, as quais foram caracterizadas por ferramentas *in silico* e incluíram a modelagem 3D das proteínas mutantes, além de análises com algoritmos preditores de patogenicidade. Esse capítulo será apresentado na forma de artigo científico que foi publicado na revista “Gene”, cujo fator de impacto é 2.319 e o Qualis Capes da área Genética (Ciências Biológicas I) é B1. Esse capítulo responde aos objetivos específicos V e VI.

Situação do artigo: publicado.

Referência do artigo: Pinheiro FC, Sperb-Ludwig F, Ligabue-Braun R, Schüller-Faccini L, De Sousa CFM, Vairo F, Schwartz IVD (2019) Genetic analysis of patients with fructose-1,6-biphosphatase deficiency. *Gene* 699:102-109.



Research paper

Genetic analysis of patients with fructose-1,6-bisphosphatase deficiency

Franciele Cabral Pinheiro^{a,b,c}, Fernanda Sperb-Ludwig^{a,b,*}, Rodrigo Ligabue-Braun^{d,e},
Lavinia Schüler-Faccini^{f,g,h}, Carolina Fischinger Moura de Souza^h, Filippo Vairo^{i,j},
Ida Vanessa Doederlein Schwartz^{a,b,g,h}

^a Post Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b BRAIN Laboratory, Center for Experimental Research (CPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil

^c Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Itaquí, RS, Brazil

^d Post Graduate Program in Cell and Molecular Biology, Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^e Department of Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

^f INAGEMP—Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Porto Alegre, RS, Brazil

^g Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^h Medical Genetics Service, HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil

ⁱ Center for Individualized Medicine, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

^j Department of Clinical Genomics, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA



ARTICLE INFO

Keywords:

FBP1

IonTorrent platform

Inborn errors of fructose metabolism

FBPase deficiency

Molecular diagnosis

ABSTRACT

Introduction: Fructose-1,6-bisphosphatase deficiency (FBPase deficiency) is a rare inborn error of metabolism that affects gluconeogenesis. Ketotic hypoglycemia is the main symptom and can occur at any age, usually after long periods of fasting or during illness. The diagnosis may be achieved by measurement of the enzyme activity in a liver sample, but *FBP1* analysis has become the most common approach.

Aim: To characterize the genotype of Southern Brazilian FBPase-deficient patients.

Methodology: The *FBP1* gene of six unrelated patients (one had consanguineous parents) with previous diagnoses of FBPase deficiency (enzymatic, pts A, B, D, E; genetic through Next-Generation Sequencing-NGS, pt F; enzymatic and Sanger sequencing, pt C) was first analyzed through NGS. Pathogenic variants found in NGS were confirmed by Sanger sequencing. The pathogenicity of novel missense variants was evaluated through *in silico* analysis.

Results: Five patients (pt A, B, D, E, F) had their genotype identified by NGS, all of them being homozygous. In Pt C, NGS detected only one pathogenic variant. Among the 11 alleles analyzed, only three variants were found, two being novel: c.958G > A and c.986T > C. *In silico* analysis indicated the pathogenicity of both variants. Interestingly, the three variants seem to be linked to specific haplotypes, indicating that an endogamy effect may be acting on these alleles in the population of Southern Brazil.

Conclusions: Our data suggest that NGS is a good tool for the diagnosis of FBPase deficiency. Variants c.958G > A and c.986T > C are the most prevalent variants in the country.

1. Introduction

A key reaction in the gluconeogenesis pathway is the cleavage of fructose-1,6-bisphosphate into fructose-6-phosphate and inorganic phosphate catalyzed by fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase, E.C.3.1.3.11). In humans, two genes located on chromosome 9q22.32 encode this enzyme: *FBP1* (611570) and *FBP2* (603027). The *FBP1* has eight exons, of which seven (exons 2–8) result in a transcript of

approximately 1.5 kb that is translated into a protein with 338 amino acids that is expressed in the liver and kidney (El-Maghrabi et al., 1995). *FBP2* is expressed in the muscles and presents a product of 1.3 kb in size that results in a protein of 339 amino acids (Tillmann et al., 2000). These isozymes catalyze the same reaction in different tissues, but their activities do not overlap; that is, when one is inactive, the other does not act as a substitute (Pagliara et al., 1972). To date, no study has shown a causal relationship between alterations in *FBP2* gene

Abbreviations: FBD, fructose-1,6-bisphosphatase deficiency; FBPase, fructose-1,6-bisphosphatase; IGV, Integrative Genomic Viewer; LD, linkage disequilibrium; NGS, Next-Generation Sequencing; SNV, Single nucleotide variant; WT, wild-type

* Corresponding author at: Medical Genetic Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 350, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: fsperb@hcpa.edu.br (F. Sperb-Ludwig).

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.03.007>

Received 22 August 2018; Received in revised form 1 March 2019; Accepted 6 March 2019

Available online 09 March 2019

0378-1119/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

and a specific disease. There is only one study of the association with gastric cancer and decreased *FBP2* transcription (Li et al., 2013). However, only variants in *FBP1* gene cause fructose-1,6-bisphosphatase deficiency (FBPase deficiency; FBP1D; OMIM#229700).

FBPase deficiency is a very rare inborn error of fructose metabolism of autosomal recessive inheritance. This disorder usually occurs in the first year of life through ketotic hypoglycemia and lactic acidosis triggered by catabolic episodes such as prolonged fasting or febrile infections (Steinmann et al., 2012). The biochemical manifestations of FBPase deficiency include lactate accumulation accompanied by a decreased pH and an increased lactate/pyruvate ratio, hyperalaninemia, hyperketonemia, glyceroluria, increased levels of acids uric and free fatty acids and pseudo-hypertriglyceridemia (Afroze et al., 2013; Morris et al., 1995; Steinmann et al., 2012). The diagnosis of FBPase deficiency is based on clinical manifestations and laboratory findings. However, this can be complicated by nonspecific presentation. In addition, the more reliable enzymatic test is the measure of FBPase activity in hepatic tissue, an invasive test. Thus, pathogenic variants analysis of the *FBP1* gene has been employed for the definitive diagnosis with clinical presentation (Asberg et al., 2010). To date, 48 pathogenic variants have been described in *FBP1* in patients with FBPase deficiency, the majority being private variants (Human Gene Mutation Database - HGMD®).

In this report, we present the genetic analysis of 6 southern Brazil patients with FBPase deficiency.

2. Methodology

This is an observational and transversal study with a convenience sampling strategy that was approved by the Local Research Ethics Committee. All patients and/or their legal guardians provided written informed consent.

2.1. Subjects

Six patients (A to F) seen at the metabolic clinics of the Medical Genetics Service-Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA), Brazil were included in the study. The inclusion criteria were decreased FBPase activity in liver (pts A, B, D and E) and/or a previous genetic diagnosis of FBPase deficiency performed by Sanger sequencing (pt C) or NGS (pt F). The clinical data of patients were collected retrospectively by review of the clinical files. The FBPase assay was performed in hepatic tissue by the kinetic enzymatic method (Pontremoli et al., 1968).

2.2. Genetic analysis

DNA from patients was isolated from whole blood using the Easy-DNA gDNA Purification Kit (Thermo Fisher®) according to the manufacturer's instructions. NGS was performed using the IonTorrent PGM platform (Life Technologies) according to the manufacturer's protocols. All the exonic regions and the intron-exon boundaries of the *FBP1* were included, with a minimal coverage of 100×. The *FBP1* is composed of 8 exons, is located at chromosome 9q22.32, and encodes the FBPase protein that has 338 amino acids (NM_00112768.1).

Base calling and sequence read quality assessments were performed using Torrent Suite 5.0.5 software of the Ion PGM system. Alignment of the sequence reads to a reference human genome (hg19-Genome Reference Consortium GRCh37) was performed using IonStates alignment. All single nucleotide variants (SNVs) and indels were saved in VCF and .bam format files and uploaded in Enlis software (<https://www.enlis.com/index.html>) and Ion Reporter (<https://ionreporter.thermofisher.com/ir/>) for interpretation. The analyses were performed including all variants in the *FBP1*. To determine the variants causing disease, we considered: allele frequency under 1% in the gnomAD and ABraOM (Naslavsky et al., 2017); location in exon or borderlines; impact on the protein (missense, nonsense or splicing sites)

and pathogenicity by different predictors. IGV software (Thorvaldsdóttir et al., 2013) was used to analyze the presence of large deletions and depth of sequencing.

The probably pathogenic variants found by NGS and the regions with inadequate depth of sequencing (exons 2 and 5) were confirmed by automated Sanger sequencing in an ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequence analyses were performed in Chromas 2.6.1 software (www.technelysium.com.au), and NM_001127628.1 was used as the reference sequence.

2.3. In silico analysis

Pathogenicity of novel missense variants was predicted *in silico* by 10 softwares: Mutation Taster (Schwarz et al., 2010), MutPred (Li et al., 2009), PANTHER (Thomas et al., 2003), PhD-SNP (Capriotti et al., 2006), Pmut2017 (Ferrer-Costa et al., 2004), POLYPHEN-2 (Adzhubei et al., 2010), PROVEAN (Choi et al., 2012), SIFT (Kumar et al., 2009), SNAP2 (Hecht et al., 2015), and SNPs&GO (Calabrese et al., 2009). The reference sequence used was NP_001121100.

The mutant sequence was compared with twelve other mammals (*Mus musculus*, *Macaca mullata*, *Pan troglodytes*, *Nomascus leucogenys*, *Carlito syrichta*, *Castor canadensis*, *Camelus ferus*, *Sus scrofa*, *Felis catus*, *Bos Taurus*, *Canis lupus familiaris* and *Homo neanderthalensis*). The evolutionary conservation of the amino acids in the variants sites was verified by the molecular evolutionary analysis performed using Mega version 7 (Kumar et al., 2016).

The structure of the FBPase was determined by crystallography and is available in the protein data bank (<https://www.rcsb.org/>). The structural modeling of the wild-type (WT) and mutated FBPase1 was performed using the I-TASSER package (Yang et al., 2014; Zhang, 2008) with five structures as the model (PDB ID: *IBK4*, *1FRP*, *1FSA*, *1RDZ* and *2FHY*), reaching high-quality models for the protein (C-factor 1.89). The visualization of the structures was performed with the software PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC). Hydrophobicity profiles were calculated with the Kyte-Doolittle scale (Kyte and Doolittle, 1982), and the electrostatic surfaces were generated with APBS tools (Sarkar et al., n.d.) under UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004).

Linkage disequilibrium (LD) was analyzed using the LDlink suite and data from 1000 Genomes Project populations (Machiela and Chanock, 2015). To perform the haplotype analysis, the following polymorphisms were analyzed: rs8192689 (c.426+7C > T, intron 4–5), rs3739747 (c.567+31G > A, intron 5–6), rs3824484 (c.567+141G > A, intron 5–6), rs1042144 (c.651C > T, exon 6), rs1769259 (c.653G > A, exon 6), rs2297084 (c.705+14C > T, intron 6–7), rs1769257 (c.960A > G, exon 8), and rs9695 (c.*21C > T, exon 8).

3. Results

The main clinical information of the included patients is summarized in Table 1.

3.1. Genetic analyses

Both variants were found in five patients (A, B, D, E, F), but only one in patient C (Table 2). Three missense variants were found: c.472C > T (p.Arg158Trp), c.958G > A (p.Gly320Arg) and c.986T > C (p.Leu329Pro), the last two being novel variants. All variants were confirmed by Sanger sequencing (Supplementary Table 1).

The NGS quality analyses showed amplification faults in part of exons 2 and 5 of *FBP1* that resulted in an inappropriate depth of these regions during sequencing (Supplementary Table 2). Therefore, the reduced read number of the amplicons in the positions Chr9: 97, 401, 474–97, 401, 660 in exon 2 and Chr9: 97, 372, 161–97, 372, 332 in exon 5 precluded the correct detection of both alleles in patient C.

Table 1
Summary of clinical findings of Southern Brazilian patients with fructose-1,6-bisphosphatase deficiency.

Patient ^a	Gender	Consanguinity confirmation	Age at diagnosis (yo)	Enzyme activity in liver (NRV = 25.70nmol/min/mg of protein)	Clinical findings at diagnosis	Previous genetic diagnosis
A	M	Yes	3	2.4	Hypoglycemia, abdominal pains, hypotonia, and hepatosplenomegaly	NP
B	M	No	2	3.1	Hypoglycemia, severe acidosis metabolic, mental confusion, nausea and spew, hepatomegaly	NP
C	M	No	4	4	Hypoglycemia followed by acidosis metabolic and spew hepatosplenomegaly	c.[472C > T;986T > C] ^b p.[Arg158Trp;Leu329Pro]
D	M	No	9	3.9	Hypoglycemia followed by seizure, fever and spew, hepatomegaly	NP
E	M	No	3	6	Hypoglycemia, metabolic acidosis, and seizure.	NP
F	F	No	30	NP	Hypoglycemia, metabolic acidosis	c.[472C > T;c.472C > T] ^c p.[Arg158Trp;Arg158Trp]

Note: yo: years old; NP: not performed; NRV: normal range value.

^a The origin state of patients is Rio Grande do Sul (RS).

^b Sanger sequencing.

^c Next-generation sequencing.

Therefore, Sanger sequencing of exons 2 and 5 with primers external to the NGS site was performed in all patients and confirmed the previous genotype found in patient C.

3.2. In silico analyses

The analysis by predicting algorithms indicated that the two novel variants are pathogenic (Supplementary Table 3). Both novel variants are located in exon 8, close to the C-terminus region of the protein. The c.958G > A (p.Gly320Arg) variant is located at a β -sheet in the protein (Fig. 1A). The c.986T > C variant led to a substitution of a Leucine in position 329 to a Proline in an α -helix (Fig. 1A). The alignment analysis has demonstrated that this region is variable among different species, but there are conserved sites, such as the amino acids Glycine and Leucine at positions 320 and 329 (Fig. 1B), respectively. Moreover, the novel variants are absent in gnomAD and ABraOm databases.

According to 3D modeling, the three variants found in patients in Southern Brazil are not located in a functional region of FBPase (UniProtKB number: P09467). Furthermore, these variants do not promote any structural alterations in the protein (Fig. 1A). The hydrophobicity analysis (Supplementary Fig. 1B and D) showed that the p.Arg158Trp variant turns a hydrophilic region of FBPase into a more neutral region. The p.Leu329Pro variant results in a more negative protein, with an increase of neutral surface. In addition, the electrostatic charge (Supplementary Fig. 1A and C) seen from another angle is less concentrated. For p.Gly320Arg, no electrostatic surface could be measured.

3.3. Haplotype and linkage disequilibrium analysis

Analysis of patient sequences demonstrated polymorphisms rs8192689, rs3739747, rs3824484, rs1042144, rs1769259, rs2297084, rs1769257, and rs9695, in apparent linkage disequilibrium (LD). Analyses with the LDlink software shown that these polymorphisms form different haplotypes detected in our patients. The analyses indicate that there is strong evidence of LD among these polymorphisms and the pathogenic variants detected, resulting in three different haplotypes (Table 2). The haplotype linked to c.472C > T and c.958G > A mutations presents a frequency of the 0.2693, while the frequency of haplotype linked with c.986C > T is 0.5279 in 1000G database.

4. Discussion

FBPase deficiency is a rare inborn error of metabolism involving the gluconeogenesis pathway, which is reported in patients with different ethnic backgrounds. The estimated incidence of FBPase deficiency is variable among 1:350,000–1:900,000 in European countries (Visser et al., 2004). However, studies evaluating patients of the American continent are scarce; only one study included patients of North American origin (Herzog et al., 2001). Therefore, the present study is the first one to describe FBPase-deficient patients from Latin America. The patients analyzed come from the Rio Grande do Sul (RS), Southern Brazil, a region that presents a predominantly European genetic background, as well as the other geographic regions of the country but to a higher proportion (Rodrigues de Moura et al., 2015). The state population is 10,693,929 (Census 2010 IBGE – Brazilian Institute of Geography and Statistics), considering the number of samples it can be inferred a prevalence of FBPase deficiency of 1:1,782,321, approximately. Probably not all patients in the state were sampled, but the reduced sample size may indicate the rarity of the disorder in the Brazilian population.

The genetic analysis of the *FBP1* has been performed as a non-invasive method to diagnosis FBPase deficiency. Since 1995, when the first pathogenic variant in *FBP1* was detected in a Japanese patient (Kikawa et al., 1995), 48 pathogenic variants (Fig. 2) were described in FBPase deficiency patients around the world (Human Gene Mutation Database - HGMD®). In most published cases, *FBP1* has been evaluated

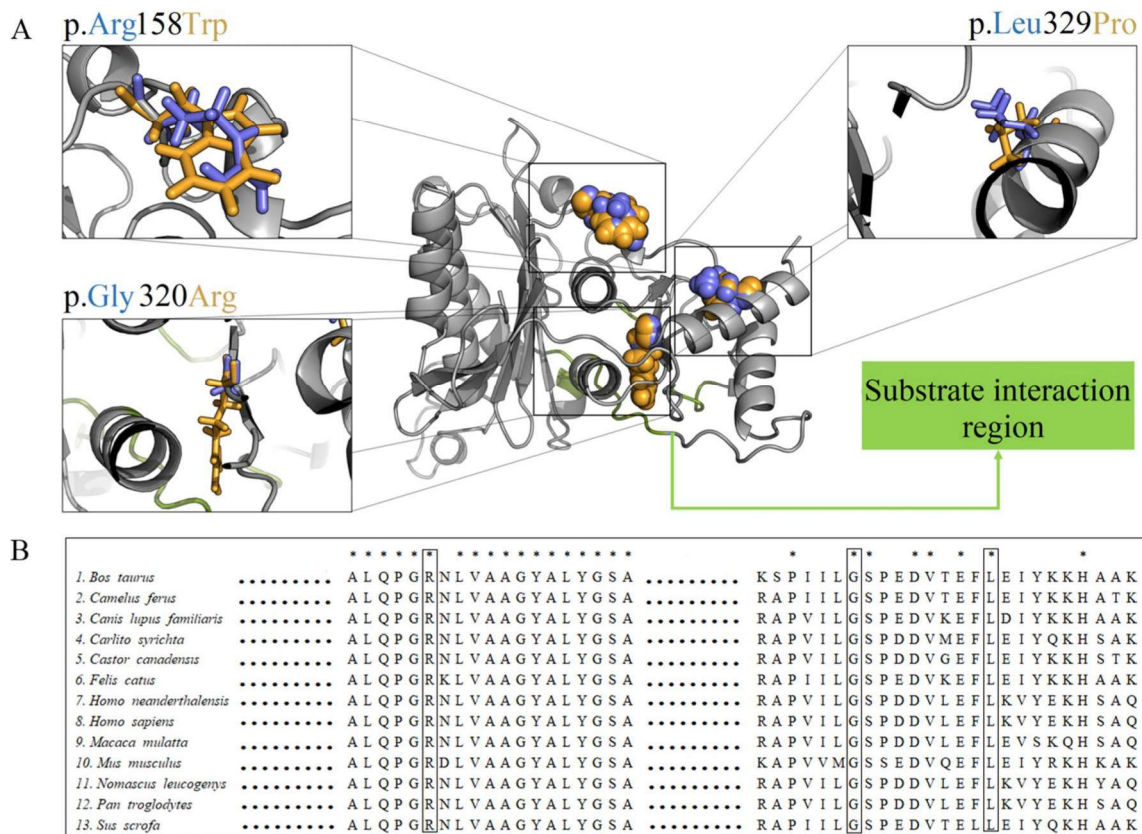


Fig. 1. Structural features of wild-type and fructose-1,6-bisphosphatase variants. A) Residue differences are indicated in boxes, along with the substrate binding region. The protein is depicted as a cartoon, while the specific residues are depicted as spheres and sticks (in the detail boxes). WT residues are colored blue, mutated residues are colored orange, the rest is colored in gray. B) The evolutionary conservation among different species of the amino acids of FBPase. The asterisks indicate conserved sites and the rectangle indicate the amino acids involved in the variants p.Arg158Trp, p.Gly320Arg, p.Leu329Pro; respectively; found in the patients with FBPase deficiency from southern Brazil. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

by automated Sanger sequencing (Asberg et al., 2010; Ijaz et al., 2017; Moey et al., 2018). This study applied NGS to perform the genetic diagnosis of patients with FBPase deficiency. The analyses failed to detect one allele in patient C (Table 2). Failures in the amplification process of exons 2 and 5 resulted in a low sequencing depth of these regions (Supplementary Table 1), which led to the nondetection of the variant c.472C > T in exon 5 in this patient. Analyses carried out excluded the presence of a polymorphism in the NGS primer annealing site and secondary structures of PCR product interfering in the amplification of exon 5. The analysis of the NGS reverse primer sequence revealed that it has three tandem repeats of the “GAT” sequence. On exon 2, the NGS forward primer was designed with three tandem repeats of the dinucleotide “CT”. These repeats in the primers may cause slipping along the primed segment of DNA or secondary structures, such as hairpin loops (Lorenz, 2012), that affect its appropriate annealing. Therefore, we performed automated Sanger sequencing of exons 2 and 5 in all patients, confirming the NGS findings and the genotype of patient C. Cases such as this one reinforce the American College of Medical Genetics and Genomics recommendation for the use of a second test to confirm the variants reported by NGS when the sequencing depth of the region is not appropriate (Baudhuin et al., 2015). Despite this, NGS has been shown to be a suitable tool for the molecular diagnosis of metabolic disorders, including FBPase deficiency (Li et al., 2017). In the meantime, particular attention to the quality of sequencing is necessary.

The NGS of six Southern Brazil patients revealed three different variants: c.472C > T (p.Arg158Trp); c.958G > A (p.Gly320Arg) and c.986T > C (p.Leu329Pro) (Table 2). The amino acids involved in these substitutions were evolutionarily conserved in different species

(Fig. 1B). The amino acid involved in the p.Arg158Trp substitution is a conserved amino acid located in an α -helix. It was suggested that this amino acid change could affect the secondary structure, altering the protein stability (Ijaz et al., 2017; Lebigot et al., 2015). However, our 3D modeling data do not indicate alterations in the secondary structure of the protein caused by this variant. Thus, other factors could affect the activity of the mutant enzyme. Small changes in the hydrophobicity of structure were evidenced, since the variant p.Arg158Trp changes a positively charged residue to a hydrophobic amino acid. This may be related to the pathogenicity of this variant, but additional data will be necessary to clarify this issue.

The novel variants, c.958G > A and c.986T > C, are located in exon 8 (Fig. 2). According to the guidelines issued by the American College of Medical Genetics and Genomics (Richards et al., 2015), the c.986T > C variant is likely pathogenic, and the c.958G > A is pathogenic. In addition to that, the two novel variants were absent in two different databases: gnomAD and ABraOM (Naslavsky et al., 2017).

The c.958G > A and c.986T > C variants cause alterations of a Glycine to an Arginine and a Leucine to a Proline at positions 320 and 329, respectively. Both occur in the C-terminal region, which is a nonconserved region, although some sites are evolutionarily conserved at these two positions. Expression analyses of c.966delC and c.960_961insG pathogenic variants, located in the same region of the novel alleles, demonstrated that the changes result in an inactive protein (Herzog et al., 1999). This reinforces the importance of this region for FBPase activity. The 3D model demonstrated that these variants do not cause alterations in the protein structure but can be drastic for their physical and chemical properties. The p.Gly320Arg and p.Leu329Pro variants involve the particular cases of the amino acids Glycine and

Table 2
Genotypes of six southern Brazil patients with fructose-1,6-bisphosphatase deficiency and related.

Patient	Genotype			Haplotype [#]									
	cDNA ^a	Protein ^b	Exon	rs8192689 c.426+7C > T	rs3739747 c.567+31G > A	rs3824484 c.567+141G > A	rs1042144 c.651C > T	rs1769259 c.653G > A	rs2297084 c.705+14C > T	rs1769257 c.960A > G	rs9695 c.*21C > T		
A	c. [986T > C]; [986T > C]	p. [Leu329Pro]; [Leu329Pro]	8	C/C	A/A	A/A	C/C	A/A	T/T	G/G	T/T		
Mother A	c. [986T > C]; [WT] ^d	c. [Leu329Pro]; [WT]	8	C/T	A/G	G/A	C/T	A/A	T/C	G/G	T/C		
B ^c	c. [958G > A]; [958G > A]	p. [Gly320Arg]; [Gly320Arg]	8	T/T	G/G	G/G	T/T	A/A	C/C	G/G	C/C		
C	c. [472C > T]; [986T > C] ^e	p. [Arg158Trp]; [Leu329Pro]	5/8	C/T	G/A	G/A	C/T	A/A	C/T	G/G	C/T		
Mother C	c. [472C > T]; [WT] ^d	p. [Arg158Trp]; [WT]	5	C/T	G/A	G/A	C/T	A/A	C/T	G/G	C/T		
D	c. [958G > A]; [958G > A]	p. [Gly320Arg]; [Gly320Arg]	8	T/T	G/G	G/G	T/T	A/A	C/C	G/G	C/C		
E	c. [958G > A]; [958G > A]	p. [Gly320Arg]; [Gly320Arg]	8	T/T	G/G	G/G	T/T	A/A	C/C	G/G	C/C		
F	c. [472C > T]; [472C > T]	p. [Arg158Trp]; [Arg158Trp]	5	T/T	G/G	G/G	T/T	A/A	C/C	G/G	C/C		

WT: Wild-type; In bold, novel variants.

^a Reference sequence - NM_001127628.1.

^b Reference sequence - NP_001121100.

^c Consanguineous parents.

^d Genetic analysis of *FBP1* was performed by Sanger sequencing.

^e NGS failed in the c.472C > T allele detection, the genotype was confirmed by Sanger sequencing.

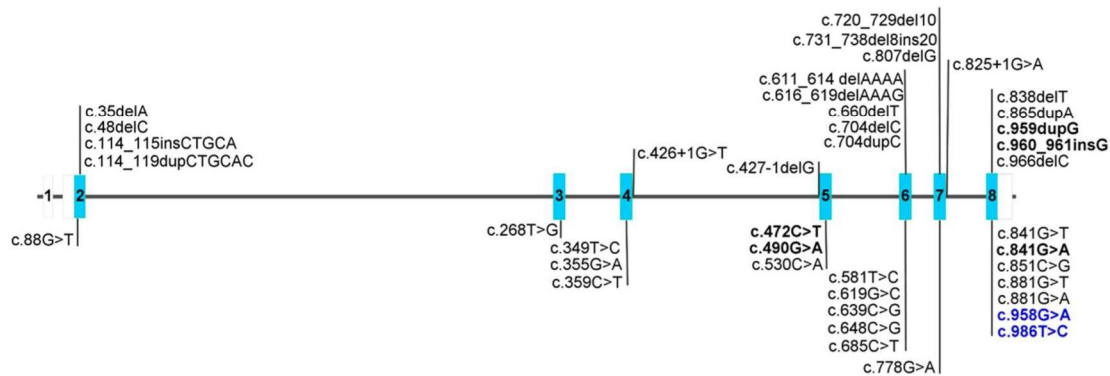


Fig. 2. The position of the mutations identified in *FBPI* gene of fructose-1,6-bisphosphatase deficient patients (HGMD database). The *FBPI* gene is shown as a line diagram with the exons marked as boxes 1–8. Blue boxes represent coding regions, white boxes the 5'UTR and 3'UTR regions of the *FBPI* transcript. In bold the mutations detected in patients from different countries. Blue indicate the novel mutations described herein. The large deletions were not represented. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Proline. Thus, the hydrogen of Glycine is replaced by a large, positively charged sidechain, while in the p.Leu329Pro variant, a hydrophobic sidechain is replaced by the structurally restricted Proline. These changes may have indirect effects on protein conformation by transmission of local changes along the protein backbone. However, the hydrophobicity analyses showed no significant alterations in this property in the mutant proteins. Therefore, more in-depth investigations of mutant protein conformational behavior are necessary.

The mechanism involved in the novel alterations is not clear, but FBPase activity in *in vivo* and *in silico* analyses indicate their pathogenicity. Beyond the level of the enzyme activity, it was not possible to associate the alterations with other symptoms of patients. Patients with the same genotype present different forms of the disease, such as age onset, mental and muscular symptoms, or hepatomegaly. As in other studies, the genotype cannot predict the symptom sets of patients with FBPase deficiency (Li et al., 2017). The genotype-phenotype correlation is complicated by FBPase deficiency because most of the variants are private, and the symptoms are very heterogeneous.

In this study, the majority of patients were homozygous, and only one of them had consanguineous parents. Although it was not possible to obtain DNA samples from every parent, and, so, to perform segregation analyses, manual review of the raw data indicates the absence of large deletions in the patients. Other studies described homozygous patients who apparently had non-consanguineous parents who were born in small villages (Herzog et al., 1999; Lu et al., 2017; Moey et al., 2018). The RS was populated from the eighteenth century predominantly by Portuguese and Azorean immigrations and with non-Iberian Europeans influx only in the nineteenth century. These founding groups remained isolated mainly because of their religious and cultural characteristics. Studies show that even geographically close population groups have maintained preferential marriages according to the country of origin and religion (De Oliveira et al., 2013). In this sense, it is not unexpected the presence of rare and private mutations with common ancestry in couples who do not declare themselves consanguineous. Add to this the fact that the three cities where these cases occurred have Portuguese ancestry.

In 3/11 analyzed alleles in this study, the c.472C > T missense variant was detected. This variant was previously reported in Malaysian, French, Indian and Pakistani patients (Bhai et al., 2018; Ijaz et al., 2017; Lebigot et al., 2015; Moey et al., 2018; Ngu et al., 2014) who were homozygous and compound heterozygous. In the Punjab Province, Pakistan, there appears to be a founder effect acting on this variant (Ijaz et al., 2017). In addition, the c.472C > T variant has been observed in a database in 6 South Asian, 2 Finnish European and 1 Ashkenazi Jewish individuals in heterozygosis, with a frequency of 0.00003668 (gnomAD database). The c.472C > T variant was detected in two patients, one homozygous and one compound heterozygous.

Both patients appear to have this allele in linkage disequilibrium with the same haplotype (#1). Thus, this may indicate that a founder effect is acting in this population. Nevertheless, it is not established whether the variant c.472C > T has a single origin and has spread between different populations or has several different origins. We believe that the first alternative is more reasonable because exon 5 is lowly polymorphic (Fig. 2) and highly conserved in related species.

The variants c.958G > A and c.986T > C were present in 5/11 and 3/11 of the alleles detected. Three homozygotes presented the c.958G > A allele, and one of them had consanguineous parents, whereas the variant c.986T > C was detected in one homozygous patient and another compound heterozygous patient. The c.958G > A variant occurs in a hot spot variant site in exon 8. This region presents the c.966delC pathogenic variant (Herzog et al., 1999) and the most frequent pathogenic variant in FBPase deficiency patients, c.959dupG, which was found in Japanese, European and Chinese patients (Herzog et al., 2001; Kikawa et al., 1997; Lebigot et al., 2015; Lu et al., 2017; Xu et al., 2014). The sequence analysis demonstrated that it is a C/G rich quasi-palindrome that favors the occurrence of indel variants (Kikawa et al., 1997). For this reason, it is suggested that variants in this site have had many origins and there is not only a founder effect acting about on these alleles. However, the c.958G > A variant is in linkage disequilibrium with haplotype #2, while c.986T > C presents one different haplotype (#3). These polymorphisms were present in a haplotype associated with the deletion c.-24-26_170+5192del in Armenian and Turkish populations (Santer et al., 2016). Excluding the pathogenic variants, the frequency of these haplotypes (#2, #3) in the world's population is approximately 0.3426 and 0.3405, respectively. These results indicate that the variants c.958G > A and c.986T > C arose in the RS and remains in a population with low outbreeding favoring the emergence of homozygous to the same allele.

In Brazil, the diagnosis of FBPase deficiency is mainly based on clinical manifestations and on liver FBPase activity. Therefore, it is necessary to establish the conditions of genetic diagnosis based on NGS. In this way, for all patients, the exons 2 and 5 and the pathogenic variations were confirmed by Sanger sequencing to validate the method. This sort of procedure can directly improve the quality of the method and consolidate the NGS platforms for inborn errors of metabolism diagnosis.

This study presents a summary of clinical and genetic data of 6 patients from Southern Brazil, confirming the FBPase deficiency diagnosis in all of them. The genetic analyses were performed by NGS with the IonTorrent platform, and two novel variants were found in *FBPI*. The data suggest that the novel variants appeared once and spread throughout the Southern Brazilian population by an endogamy effect.

5. Conclusion

In summary, this study presents the first genetic analysis of Brazilian patients with FBPPase deficiency. Surprisingly, a small number of different variants was found despite the apparently low consanguinity rate, which suggests that c.958G > A and c.986T > C are the most frequent pathogenic variants of *FBP1* in the region of Southern Brazil.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.03.007>.

Acknowledgments

The authors acknowledge the professionals from Inborn Errors Metabolism Laboratory of SGM-HCPA-Brazil and from the Centro de Saúde Pública Doutor Gonçalves Ferreira - Portugal for helping in the diagnosis of the patients. Also to FIPE-HCPA, CAPES, CNPq, and Post Graduation Program of Genetics and Molecular Biology-UFRGS for the financial support.

References

- Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., Sunyaev, S.R., 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* 7, 248–249. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>.
- Afroze, B., Yunus, Z., Steinmann, B., Santer, R., 2013. Transient pseudo-hypertriglyceridemia: a useful biochemical marker of fructose-1, 6-bisphosphatase deficiency. *Eur. J. Pediatr.* 172, 1249–1253. <https://doi.org/10.1007/s00431-013-2084-6>.
- Asberg, C., Hjalmarson, O., Alm, J., Martinsson, T., Waldenström, J., Hellerud, C., 2010. Fructose 1,6-bisphosphatase deficiency: enzyme and mutation analysis performed on calcitriol-stimulated monocytes with a note on long-term prognosis. *J. Inher. Metab. Dis.* 33, 113–121. <https://doi.org/10.1007/s10545-009-9034-5>.
- Baudhuin, L.M., Lagerstedt, S.A., Klee, E.W., Fadra, N., Oglesbee, D., Ferber, M.J., 2015. Confirming variants in next-generation sequencing panel testing by sanger sequencing. *J. Mol. Diagnostics* 17, 456–461. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.03.004>.
- Bhai, P., Bijarnia-Mahay, S., Puri, R.D., Saxena, R., Gupta, D., Kotecha, U., Sachdev, A., Gupta, D., Vyas, V., Agarwal, D., Jain, V., Bansal, R.K., Kumar, T.G., Verma, I.C., 2018. Clinical and molecular characterization of Indian patients with fructose-1, 6-bisphosphatase deficiency: identification of a frequent variant (E281K). *Ann. Hum. Genet.* 82, 309–317. <https://doi.org/10.1111/ahg.12256>.
- Calabrese, R., Capriotti, E., Fariselli, P., Martelli, P.L., À, R.C., 2009. Functional Annotations Improve the Predictive Score of Human Disease-Related Mutations in Proteins. <https://doi.org/10.1002/humu.21047>.
- Capriotti, E., Calabrese, R., Casadio, R., 2006. Sequence Analysis Predicting the Insurgency of Human Genetic Diseases Associated to Single Point Protein Mutations with Support Vector Machines and Evolutionary Information 22. pp. 2729–2734. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl423>.
- Choi, Y., Sims, G.E., Murphy, S., Miller, J.R., Chan, A.P., 2012. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One* 7, e46688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046688>.
- De Oliveira, M.Z., Schüler-Faccini, L., Demarchi, D.A., Alfaro, E.L., Dipierri, J.E., Veronez, M.R., Colling Cassel, M., Tagliani-Ribeiro, A., Silveira Matte, U., Ramallo, V., 2013. So close, so far away: analysis of surnames in a town of twins (Cândido Godói, Brazil). *Ann. Hum. Genet.* 77, 125–136. <https://doi.org/10.1111/ahg.12001>.
- El-Maghrabi, M., Lange, A.J., Jiang, W., Yamagata, K., Stoffel, M., Takeda, J., Fernald, A.A., Le Beau, M.M., Bell, G.I., Baker, L., Pilks, S.J., 1995. Human fructose-1,6-bisphosphatase gene (FBP1): exon-intron organization, localization to chromosome bands 9q22.2-q22.3, and mutation screening in subjects with Fructose-1,6-Bisphosphatase deficiency. *Genomics* 27, 520–525. <https://doi.org/10.1006/geno.1995.1085>.
- Ferrer-Costa, C., Orozco, M., de Cruz, X., 2004. Sequence-based prediction of pathological mutations. *PROTEINS Struct. Funct. Bioinforma.* 819, 811–819. <https://doi.org/10.1002/prot.20252>.
- Hecht, M., Bromberg, Y., Rost, B., 2015. Better prediction of functional effects for sequence variants. *BMC Genomics* 16, S1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-16-S8-S1>.
- Herzog, B., Wendel, U., Morris, A.A., Eschrich, K., 1999. Novel mutations in patients with fructose-1,6-bisphosphatase deficiency. *J. Inher. Metab. Dis.* 22, 132–138.
- Herzog, B., Morris, A.A.M., Saunders, C., Eschrich, K., 2001. Mutation spectrum in patients with fructose-1,6-bisphosphatase deficiency. *J. Inher. Metab. Dis.* 24, 87–88. <https://doi.org/10.1023/A:1005691730058>.
- Ijaz, S., Zahoor, M.Y., Inrnan, K., Ranzan, K., Bhinder, M.A., Shakeel, H., Iqbal, M., Aslam, A., Shehzad, W., Cheema, H.A., Rehman, H., 2017. Genetic analysis of fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) deficiency in nine consanguineous Pakistani families. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 30, 1203–1210. <https://doi.org/10.1515/jpem-2017-0188>.
- Kikawa, Y., Inuzuka, M., Jin, B.Y., Kaji, S., Yamamoto, Y., Shigematsu, Y., Nakai, A., Taketo, A., Ohura, T., Mikami, H., Mizunuma, H., Suzuli, Y., Narisawa, K., Sudo, M., 1995. Identification of a genetic mutation in a family with fructose-1,6-bisphosphatase deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210, 797–804.
- Kikawa, Y., Inuzuka, M., Jin, B.Y., Kaji, S., Koga, J.-I., Yamamoto, Y., Fujisawa, K., Hata, I., Nakai, A., Shigematsu, Y., Mizunuma, H., Taketo, A., Mayumi, M., Sudo, M., 1997. Identification of genetic mutations in Japanese patients with fructose-1,6-bisphosphatase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 61, 852–861.
- Kumar, P., Henikoff, S., Ng, P.C., 2009. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm 4, 1073–1082. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.86>.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- Kyte, J., Doolittle, R.F., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105–132.
- Lebigot, E., Brassier, A., Zater, M., Imanci, D., Feillet, F., Théron, P., de Lonlay, P., Boutron, A., 2015. Fructose 1,6-bisphosphatase deficiency: clinical, biochemical and genetic features in French patients. *J. Inher. Metab. Dis.* 38, 881–887. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9804-6>.
- Li, B., Krishnan, V.G., Mort, M.E., Xin, F., Kamati, K.K., Cooper, D.N., Mooney, S.D., Radivojac, P., 2009. Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics* 25, 2744–2750. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp528>.
- Li, H., Wang, J., Xu, H., Xing, R., Pan, Y., Li, W., Cui, J., Zhang, H., Lu, Y., 2013. Decreased fructose-1,6-bisphosphatase-2 expression promotes glycolysis and growth in gastric cancer cells. *Mol. Cancer* 12, 110. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-110>.
- Li, N., Chang, G., Xu, Y., Ding, Y., Li, G., Yu, T., Qing, Y., Li, J., Shen, Y., Wang, J., Wang, X., 2017. Clinical and molecular characterization of patients with fructose 1,6-bisphosphatase deficiency. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms18040857>.
- Lorenz, T.C., 2012. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J. Vis. Exp.* (63), 3998. <https://doi.org/10.3791/3998>.
- Lu, J.-R., Wang, C., Shao, L.-P., 2017. A Chinese adult patient with fructose 1,6-bisphosphatase deficiency. *Chin. Med. J.* 130, 2009. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.211890>.
- Machiela, M.J., Chanock, S.J., 2015. LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. *Bioinformatics* 31, 3555–3557. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv402>.
- Moey, L.H., Abdul Azize, N.A., Yakob, Y., Leong, H.Y., Keng, W.T., Chen, B.C., Ngu, L.H., 2018. Fructose-1,6-bisphosphatase deficiency as a cause of recurrent hypoglycemia and metabolic acidosis: clinical and molecular findings in Malaysian patients. *Pediatr. Neonatol.* 59, 397–403. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2017.11.006>.
- Morris, A.A.M., Deshpande, S.I., Ward-platt, M.R., Whitfield, A.E., Aynsley-Green, A., Leonard, J.V., Pourfarzam, M., Bartlett, K., 1995. Impaired ketogenesis in fructose-1,6-bisphosphatase deficiency: a pitfall in the investigation of hypoglycaemia. *J. Inher. Metab. Dis.* 18, 28–32.
- Naslavsky, M.S., Yamamoto, G.L., de Almeida, T.F., Ezquina, S.A.M., Sunaga, D.Y., Pho, N., Bozoklian, D., Sandberg, T.O.M., Brito, L.A., Lazar, M., Bernardo, D.V., Amaro, E., Duarte, Y.A.O., Lebrão, M.L., Passos-Bueno, M.R., Zatz, M., 2017. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum. Mutat.* 38, 751–763. <https://doi.org/10.1002/humu.23220>.
- Ngu, L.H., Nor Azimah, A.A., Leong, H.Y., Chen, B.C., Muzhirzh, H., Zabadah, M.Y., Anasufiza, H., Chor, Y.K., Yusnita, Y., 2014. Identification of Genetic Mutations in Malaysian Patients with Fructose-1,6-Bisphosphatase Deficiency, in: 64th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics. San Diego, pp. 541.
- Pagliara, A.S., Karl, I.E., Keating, J.P., Brown, B.I., Kipnis, D.M., 1972. Hepatic fructose-1,6-diphosphatase deficiency: a cause of lactic acidosis and hypoglycemia in infancy. *J. Clin. Invest.* 51, 2115–2123. <https://doi.org/10.1172/JCI107018>.
- Petersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF chimera — a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- Pontremoli, S., Grazi, E., Accorsi, A., 1968. Fructose diphosphatase from rabbit liver. IX. Isolation and kinetic properties of the enzyme-substrate complex. *Biochemistry* 7, 1655–1661.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W., Hedge, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H.L., 2015. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* 17, 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>.
- Rodrigues de Moura, R., Coelho, A.V.C., de Queiroz Balbino, V., Crovella, S., Brandão, L.A.C., 2015. Meta-analysis of Brazilian genetic admixture and comparison with other Latin American countries. *Am. J. Hum. Biol.* 27, 674–680. <https://doi.org/10.1002/ajhb.22714>.
- Santer, R., du Moulin, M., Shahinyan, T., Vater, I., Maier, E., Muntau, A.C., Steinmann, B., 2016. A summary of molecular genetic findings in fructose-1,6-bisphosphatase deficiency with a focus on a common long-range deletion and the role of MLPA analysis. *Orphanet J. Rare Dis.* 11 (44). <https://doi.org/10.1186/s13023-016-0415-1>.
- Sarkar, S., Witham, S., Zhang, J., Zhenirovskyy, M., Rocchia, W., Alexov, E., 2019. DelPhi Web Server: A Comprehensive Online Suite for Electrostatic Calculations of Biological Macromolecules and Their Complexes. (n.d.).
- Schwarz, J.M., Rödelberger, C., Schuelke, M., Seelow, D., 2010. correspondEncE MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations mrsFAST: a cache-oblivious algorithm for short-read mapping. *Nat. Publ. Gr.* 7, 575–576. <https://doi.org/10.1038/nmeth0810-575>.

- Steinmann, B., Santer, R., van der Berghe, G., 2012. Disorders of Fructose Metabolism, in: *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*. pp. 1–657. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-15720-2>.
- Thomas, P.D., Campbell, M.J., Kejariwal, A., Mi, H., Karlak, B., Daverman, R., Diemer, K., Muruganujan, A., Narechania, A., 2003. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res.* 13, 2129–2141. <https://doi.org/10.1101/gr.772403>.
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J.T., Mesirov, J.P., 2013. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief. Bioinform.* 14, 178–192. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>.
- Tillmann, H., Stein, S., Liehr, T., Eschrich, K., 2000. Structure and chromosomal localization of the human and mouse muscle fructose-1,6-bisphosphatase genes. *Gene* 247, 241–253.
- Visser, G., Bakker, H.D., Deklerk, J.B.C., 2004. Natural history and treatment of fructose-1,6-diphosphatase deficiency in the Netherlands [Abstract]. *J. Inherit. Metab. Dis.* 27 (Suppl 1), 207.
- Xu, K., Liu, X., Zhang, C., Wang, Y., Li, X., Wu, Y., Yang, Y., Xiao, H., 2014. Genetic diagnosis of fructose-1, 6-bisphosphatase deficiency: a case report. In: *Beijing Da Xue Xue Bao.* vol. 46. pp. 681–685. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-167X.2014.05.003>.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y., 2014. The I-TASSER suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* 12, 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>.
- Zhang, Y., 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9 (40). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>.

7.5. Capítulo 5: Variantes na região C-terminal da frutose-1,6-bifosfatase aumentam a afinidade da enzima pelo inibidor frutose-2,6-bifosfato.

O quinto capítulo consiste na análise funcional *in vitro* das variantes c.472C>T, c.958G>A e c.986T>C presentes no gene *FBP1*, as quais foram detectadas em pacientes brasileiros com DFB. As duas últimas são variantes novas, descritas na publicação contemplada no capítulo 4, e a primeira foi descrita em pacientes de outras etnias, mas que não havia sido funcionalmente analisada até então. Foi realizada a análise *in silico* com uma abordagem de *docking* para discutir quais aspectos da enzima estão alterados nas proteínas mutantes. O presente capítulo responde pelo objetivo específico VII.

Esse capítulo será apresentado na forma de artigo que será submetido à revista “Human Mutation”, cujo fator de impacto é 4.453 e o Qualis Capes da área Genética (Ciências Biológicas I) é A1. O formato obedece às normas da revista.

Situação do artigo: em preparação.

Brief Communication

Variantes na região C-terminal da frutose-1,6-bifosfatase aumentam a afinidade da enzima pelo inibidor frutose-2,6-bifosfato

Franciele Cabral Pinheiro^{1,2,3}; Rodrigo Ligabue-Braun⁴; Fernanda Sperb-Ludwig^{1,2}; Ida Vanessa Doederlein Schwartz^{1,2,5}.

¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular – UFRGS, Brasil.

²Laboratório BRAIN, Centro de Pesquisa Experimental – HCPA, Brasil

³Universidade Federal do Pampa – Campus Itaqui, Brasil.

⁴Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brasil.

⁵Serviço de Genética Médica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

Correspondência:

Medical Genetic Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 350, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil

Suporte Financeiro:

Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), Brasil. Projetos número: 2017-0450 e 2018-0143. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM-UFRGS), Brasil.

RESUMO:

A frutose-1,6-bifosfatase (FBPase) é uma enzima-chave na gliconeogênese, pois catalisa a hidrólise da frutose-1,6-bifosfato (F1,6P2) em frutose-6-fosfato. Essa enzima é codificada pelo gene *FBPI* que alterado acarreta na deficiência de frutose-1,6-bifosfatase, um erro inato do metabolismo da frutose que acarreta em crises hipoglicêmicas acompanhadas de acidose láctica durante episódios catabólicos. A detecção bialélica de variantes patogênicas em *FBPI* é a forma de diagnóstico da doença. Porém, a maioria das variantes descritas em pacientes são privadas ou restritas, o que dificulta a confirmação da patogenicidade das variantes detectadas. Assim, o presente estudo teve por objetivo analisar a atividade de três variantes patogênicas descritas entre pacientes brasileiros e o mecanismo envolvido na patogênese desses alelos. Assim, foi realizada a mutagênese sítio-dirigida do gene *FBPI*, sua expressão *in vitro* e análise da atividade enzimática da FBPase para as variantes p.Arg158Trp, p.Gly320Arg e p.Leu329Pro. Análises de afinidade das proteínas mutantes foram executadas por abordagens *in silico*. Os resultados mostram que as três variantes acarretam em redução significativa da atividade catalítica de FBPase, de modo que a variante p.Arg158Trp apresenta 35% da atividade quando comparada ao controle (WT), enquanto as variantes p.Gly320Arg e p.Leu329Pro apresentam cerca de 11% e 9%, respectivamente. As análises de *docking* das proteínas evidenciaram que p.Arg158Trp apresenta uma maior afinidade ao substrato do que a observada no WT. Já as variantes p.Gly320Arg e p.Leu329Pro, localizadas na região C-terminal da FBPase, apresentam uma maior afinidade ao substrato frutose-2,6-bifosfato (F2,6P2) do que a F1,6P2, o qual atua como inibidor da enzima por competição pelo sítio ativo. Essa afinidade aumentada é induzida por AMP. Assim, o presente estudo mostrou que a região C-terminal da FBPase está relacionada à ligação ao substrato e ao inibidor que compete pelo sítio ativo, F2,6P2. Além disso, identificamos que o aumento da afinidade da variante p.Arg158Trp ao substrato F1,6P2 pode acarretar na sua retenção junto à proteína e conseqüentemente na redução da atividade catalítica dessa enzima.

Keywords: *FBPI*, deficiência de frutose-1,6-bifosfatase, frutose-1,6-bifosfatase, análises *in silico*, ensaio funcional.

Em humanos e outros vertebrados, há duas isozimas FBPsases, uma expressa no fígado (codificada pelo gene *FBP1*) e outra nos músculos (codificada pelo gene *FBP2*). As principais diferenças entre a isozima hepática e a muscular são a sensibilidade aos íons Cálcio e a inibição por AMP, sendo que a isozima muscular apresenta uma maior afinidade pelo inibidor AMP que a isozima hepática (Shi et al., 2013). Ambos os genes *FBPs* estão localizados no cromossomo 9q22.3. O gene *FBP1* apresenta oito éxons resultando em um transcrito de 1.487pb, o qual é traduzido em uma proteína de 362 aminoácidos. *FBP2* tem sete éxons que codificam um transcrito de 1.305pb, traduzidos em um produto de 339 aminoácidos. Há uma homologia de 77% entre os aminoácidos das isozimas codificadas pelos genes *FBPs* (El-Maghrabi et al., 1995; Kikawa et al., 1997; Tillmann, Stein, Liehr, & Eschrich, 2000).

A enzima frutose-1,6-bifosfatase (FBPase) (E.C. 3.1.3.11) é uma monoester fosfohidrolase (esterase) que realiza a reação inversa da fosfofrutoquinase na glicólise, isto é, a hidrólise de frutose-1,6-bifosfato (F1,6P2) em frutose-6-P (F6P) e fósforo inorgânico, uma reação chave na gliconeogênese e glicogênese. Análises cristalográficas demonstraram que a FBPase é um homotetrâmero cuja subunidade apresenta uma massa de 37KDa. Sua atividade é modulada por cofatores e inibidores, de modo que para a FBPase atingir sua atividade catalítica ótima é necessária a presença de cátions divalentes (Mg^{2+} , Mn^{2+} e/ou Zn^{2+}) e monovalentes (K^{+} , NH_4^{+} , and Tl^{+}). Já a inibição ocorre de forma sinérgica por adenosina 5' monofosfato (AMP) e frutose-2,6-bifosfato (F2,6P2). O primeiro se liga ao sítio alostérico, enquanto o segundo se liga ao sítio ativo da enzima competindo com o substrato F1,6P2. Cada subunidade apresenta um domínio alostérico AMP (resíduos 1-200) e um domínio catalítico (201-335). A concentração relativa de ligantes no sítio ativo e alostérico determina estados conformacionais distintos à enzima. Assim, AMP e F2,6P2 estabilizam a enzima em sua conformação T (forma inativa) enquanto F1,6P2 ao estado R (cineticamente ativo) (Ke et al., 1989; Ke, Zhang, & Lipscomb, 1990; Shi et al., 2013).

Até o presente momento, não há a associação de alterações genéticas no gene *FBP2* com o desenvolvimento de alguma doença. Porém, alterações no gene *FBP1* causam a deficiência de frutose-1,6-bifosfatase (FBD), um erro inato do metabolismo (EIM) da frutose de herança autossômica recessiva que afeta a gliconeogênese. A primeira manifestação de sintomas normalmente ocorre entre o 1º e 4º dias de vida e inclui crise hipoglicêmica acompanhada de acidose láctica em consequência de episódios catabólicos, tais como febre ou jejum prolongado. A doença é associada a altas taxas de

mortalidade sendo apontada como uma das causas da morte súbita de neonatos (Emery, Variend, Howat, & Vawter, 1988; Weinstein, Steuerwald, De Souza, & Derks, 2018). O diagnóstico da doença pode ser realizado a partir do ensaio da atividade de FBPase no tecido hepático através de biópsia, um processo invasivo que vem sendo descontinuado. O diagnóstico também pode ser obtido a partir da detecção bialélica de variantes patogênicas em *FBPI* (Steinmann, Santer, & van der Berghe, 2012; Weinstein et al., 2018). O tratamento consiste na prevenção das crises hipoglicêmicas a partir de uma intervenção dietética, a qual preconiza uma dieta restrita em frutose e o consumo de amido de milho cru antes de períodos de jejum prolongado (Pinto et al., 2018).

Recentemente, nosso grupo publicou o primeiro estudo envolvendo a análise genética de pacientes brasileiros com FBD, no qual foram relatadas duas novas variantes de sentido trocado em *FBPI*: p.Gly320Arg e p.Leu329Pro (Pinheiro et al., 2019). Além dessas, detectamos a variante p.Arg158Trp, a qual foi já descrita em pacientes da Malásia, França, Índia, Paquistão e Israel (Bhai et al., 2018; Ijaz et al., 2017; Lebigot et al., 2015; Moey et al., 2018; Ngu et al., 2014; Yoav et al., 2019). Assim, no presente estudo mostramos evidências funcionais e computacionais dos mecanismos envolvidos na patogênese dessas três variantes.

As características gerais das variantes foram evidenciadas em estudo prévio, em que se mostrou que o alelo c.472C>T (p.Arg158Trp) (figura 1A) está presente no banco de dados gnomAD (Karczewski et al., 2019) em uma frequência de 0,00003668. Além disso, foi visto que os alelos c.958G>A (p.Gly320Arg) e c.986T>C (p.Leu329Pro) (figura 1A) estão ausentes dos bancos de dados populacionais como gnomAD (Karczewski et al., 2019) e ABraOM (Naslavsky et al., 2017). As análises *in silico* com algoritmos preditores evidenciaram que as três variantes em estudo são patogênicas, o que foi reforçado pela análise de conservação dos aminoácidos envolvidos na alteração. Essa análise mostrou que a região C-terminal da FBPase é variável entre as diferentes espécies testadas, porém alguns sítios são altamente preservados, dentre eles estão a glicina e a leucina nas posições 320 e 329, respectivamente. Foi realizada a modelagem das proteínas mutantes e constatou-se que não ocorrem alterações estruturais ou em características físico-químicas como hidrofobicidade e eletrostática que justifiquem a atividade deficiente dessas enzimas (Pinheiro et al., 2019), o que instigou a realização de novas análises para elucidar as reais causas dos fenótipos observados nos pacientes incluídos no estudo.

Metodologia:

Para acessar o efeito das variantes p.Arg158Trp, p.Gly320Arg e p.Leu329Pro na atividade catalítica da FBPase, foi realizada a mutagênese sítio-dirigida no plasmídeo pcDNA3.1⁺/C-(K)-DYK (GenScript) contendo o cDNA de *FBPI* selvagem (WT). Os constructos (WT, c.472C>T, c.958G>A e c.986T>C) foram independentemente transfectados em células da linhagem COS-7 com Lipofectamine™ 3000, e cultivados em meio mínimo essencial de Eagle (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibiótico (100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (P/S)) à 37°C e 5% CO₂. Após 24 horas de cultivo, as células foram coletadas, homogeneizadas em solução de Cloreto de Potássio 0,16M e lisadas por sonicação. O sobrenadante coletado após centrifugação foi utilizado para o ensaio de cinética enzimática da FBPase conforme Pontremoli et al (1968).

Análises *in silico* foram executadas para estimar a afinidade de ligação do WT e das três enzimas mutantes ao substrato F1,6P2 através de ensaios de *docking* molecular. Os ensaios foram realizados na presença e ausência dos inibidores AMP (inibidor alostérico) e F2,6P2 (inibidor do sítio ativo). As estruturas tridimensionais (3D) do WT e das proteínas mutantes utilizadas nesses experimentos foram descritas em estudo prévio (Pinheiro et al., 2019). Os cálculos do *docking* foram executados com o algoritmo DockThor v.2 (Camila S. De Magalhães, Barbosa, & Dardenne, 2004; Camila Silva de Magalhães, Almeida, Barbosa, & Dardenne, 2014). As moléculas do receptor e ligante foram preparadas com ferramentas específicas do DockThor server. As caixas de análise foram definidas no sítio ativo da enzima com bordas de 10Å em todos os eixos e discretização de 0.25Å. Foram utilizadas as configurações-padrão do DockThor para as análises. Os conformes resultantes foram agrupados em 2Å de RMSD.

Resultados:

Os ensaios funcionais mostram que todas as enzimas mutantes apresentam redução da atividade (figura 1B). A variante p.Arg158Trp retém aproximadamente 36% da atividade quando comparada ao WT, enquanto que as variantes p.Gly320Arg e p.Leu329Pro apresentam cerca de 11% e 9% da atividade do WT, respectivamente (tabela 1).

As análises *in silico* foram realizadas com o controle WT e confirmou-se o AMP como inibidor alostérico, diminuindo a afinidade pelo substrato F1,6P2. Além disso, observou-se que a afinidade do WT pelo inibidor F2,6P2 é maior do que por F1,6P2.

Esses resultados são condizentes com achados da literatura e mostram que o modelo utilizado está adequado às análises. Assim, os resultados indicam que a variante p.Arg158Trp apresenta aumento na afinidade pelo substrato F1,6P e diminuição na afinidade por F2,6P2 quando comparada ao WT (tabela 2, figura 1C). Já a variante p.Gly320Arg na ausência de AMP apresenta afinidade muito menor a F1,6P2 do que o WT (tabela 2). Já quando AMP está presente, há a ativação do mutante acarretando em um aumento da afinidade por ambos os substratos, sendo a afinidade pelo inibidor F2,6P2 duas vezes maior do que pelo substrato F1,6P2. A variante p.Leu329Pro apresenta uma afinidade maior que o WT ao substrato F1,6P2 (tabela 2), entretanto na presença do inibidor AMP há uma redução considerável na afinidade da proteína mutante ao substrato F1,6P2, ao mesmo passo que aumenta a afinidade por F2,6P2 (tabela 2 e figura 1C).

Discussão:

Os ensaios *in vitro* confirmaram que a redução da atividade enzimática nos pacientes previamente analisados ocorre em consequência das variantes descritas, corroborando os ensaios *in vivo* apresentados em estudo prévio (Pinheiro et al., 2019). Assim, pacientes homozigotos para a variante p.Gly320Arg (n=3) retêm de 4-24% da atividade da FBPase, enquanto um paciente homozigoto para a variante p.Leu329Pro apresenta entre 4-9,6% da atividade. Não dispomos de dados enzimáticos de paciente homozigoto para o alelo p.Arg158Trp (tabela 1).

Contudo, permanece a questão sobre qual o mecanismo envolvido na patogenicidade desses alelos. Para buscar alternativas que auxiliem nessa resposta, foi estimada a afinidade de ligação do WT e das três enzimas mutantes ao substrato F1,6P2 através de ensaios de *docking* molecular na presença dos inibidores AMP e F2,6P2. Em conjunto, os dados indicam os possíveis mecanismos envolvidos na patogênese das variantes p.Arg158Trp, p.Gly320Arg e p.Leu329Pro do gene *FBP1*.

Ao analisar a variante p.Arg158Trp (R158W), detecta-se a atividade enzimática residual três vezes maior que a observada nas outras proteínas mutantes em análise, bem como maior afinidade pelo substrato F1,6P2. AMP atua como ativador nesse mutante, aumentando ainda mais a afinidade pelo substrato (tabela 2). Porém, se a enzima tem uma maior afinidade pelo substrato do que o próprio WT, qual o motivo da menor atividade dessa proteína mutante? É sabido que AMP aumenta a ligação à F6P, produto da reação catalisada pela FBPase. Além disso, essa molécula compete com metais divalentes essenciais à atividade catalítica de FBPase (Gao, Shen, & Honzatko, 2014; Scheffler & Fromm, 1986). Logo, se AMP atua como ativador e permanece ligado à enzima, é

possível que esteja ocorrendo uma retenção do produto, de forma que afeta a atividade desse mutante. Esse mecanismo, já foi observado em ensaios funcionais da Aldolase B, em que mutantes na região C-terminal retinham o produto da reação catalisada (Rellos, Ali, Vidailhet, Sygusch, & Cox, 1999). Alternativamente, pode ser que a proteína mutante se mantenha mais fortemente ligada ao substrato, entretanto a conformação estrutural da FBPase não é eficiente na catálise da reação, em razão da presença de AMP. Isso pode estar associado a atividade residual dessa enzima mutante. Ainda que não tenhamos observado alterações estruturais nos ensaios de modelagem 3D, a conformação estrutural da proteína na presença de AMP não é ativa. Estudos funcionais da variante p.Leu256Pro da aldolase B mostram que a enzima mutante retém uma atividade de 40% do WT, de modo que alterações estruturais acarretadas pela variante resultam em monômeros minimamente ativos (Rellos, Sygusch, & Cox, 2000). Pode ser que um mecanismo semelhante esteja resultando na patogenicidade da variante p.Arg158Trp na FBPase.

A proteína mutante p.Gly320Arg apresentou atividade enzimática de aproximadamente 11% da atividade do WT e as análises computacionais mostraram um aumento na afinidade pelo inibidor F2,6P2. A FBPase, quando ligada a seus inibidores, torna-se estável em uma conformação tridimensional cineticamente inativa (Ke et al., 1990). Assim, a ligação de F2,6P2 ao sítio ativo da enzima mutante faz com que não haja disponibilidade espacial na enzima para ligação ao substrato F1,6P2.

A variante p.Leu329Pro é a que apresenta maior redução na atividade enzimática dentre as variantes testadas, de modo que esse achado reforça o que havia sido observado em pacientes. Dentre os pacientes analisados, o com menor atividade enzimática no fígado era homozigoto para esse alelo. As análises computacionais evidenciaram que a ligação de AMP à proteína mutante faz com que aumente sua afinidade pelo outro inibidor da FBPase, a F2,6P2. Isso está em conformidade com estudos prévios que mostram uma relação sinérgica entre os inibidores de FBPase (Gao et al., 2014). Desse modo, o mecanismo que afeta a atividade dessa proteína mutante é semelhante àquele que parece estar atuando sobre a variante p.Gly320Arg.

As variantes p.Gly320Arg e p.Leu329Pro estão localizadas na região C-terminal da FBPase e ambas acarretam na redução da atividade catalítica da enzima por apresentarem maior afinidade ao inibidor F2,6P2. Assim, os resultados indicam que a região C-terminal da proteína está indiretamente relacionada com a ligação à F1,6P2 e ao inibidor que compete pelo sítio ativo com esse substrato. De modo conjunto, esses

indícios reforçam a relevância de uma extremidade C-terminal intacta para a atividade enzimática ideal.

Os ensaios com a variante p.Arg158Trp são especialmente importantes, pois essa é uma das poucas alterações em *FBPI* que apresenta distribuição entre diferentes populações, já que a grande maioria dos alelos patogênicos descritos em pacientes com FBD são privados ou restritos a um grupo étnico (Bijarnia-Mahay, Bhatia, & Arora, 2019). Chama a atenção o fato dessa variante resultar em uma proteína com atividade residual de 35% do WT, e ainda assim acarretar na manifestação clínica da FBD, da mesma forma que os pacientes homocigotos para mutações com maior redução na atividade residual. É consenso que uma atividade catalítica residual de 10% é suficiente para não incorrer na manifestação clínica na maior parte dos EIM. Contudo, nossos dados mostram que isso não é verdade para todas as doenças dessa classe, inclusive FBD.

Em conclusão, o presente estudo mostra que as variantes p.Gly320Arg e p.Leu329Pro no gene *FBPI* acarretam na redução da atividade enzimática da FBPase hepática por afetar a ligação da proteína ao seu substrato, já que ambas apresentam uma maior afinidade pelo inibidor F2,6P2, reforçada pela ação de AMP. Além disso, são apresentados indícios de que a retenção do substrato é um possível mecanismo envolvido na patogênese do alelo p.Arg158Trp, o qual é amplamente distribuído entre diferentes populações.

Agradecimentos:

Os autores agradecem a Dr^a Maira Graeff Burin e a MSc Fernanda Malheiros, pesquisadoras do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (LEIM) do SGM-HCPA, pela colaboração nos ensaios de atividade enzimática da FBPase.

Referências

- Bhai, P., Bijarnia-Mahay, S., Puri, R. D., Saxena, R., Gupta, D., Kotecha, U., ... Verma, I. C. (2018). Clinical and molecular characterization of Indian patients with fructose-1, 6-bisphosphatase deficiency: Identification of a frequent variant (E281K). *Annals of Human Genetics*, 82(5), 309–317. <https://doi.org/10.1111/ahg.12256>
- Bijarnia-Mahay, S., Bhatia, S., & Arora, V. (2019). Fructose-1, 6-Bisphosphatase Deficiency. In A. MP, A. HH, & P. RA (Eds.), *GeneReviews*(®) (pp. 1–16). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/%0AFructose-1,6-Bisphosphatase>

- De Magalhães, Camila S., Barbosa, H. J. C., & Dardenne, L. E. (2004). Selection-insertion schemes in genetic algorithms for the flexible ligand docking problem. *Lecture Notes in Computer Science*, 3102(ii), 368–379. https://doi.org/10.1007/978-3-540-24854-5_38
- de Magalhães, Camila Silva, Almeida, D. M., Barbosa, H. J. C., & Dardenne, L. E. (2014). A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands. *Information Sciences*, 289(1), 206–224. <https://doi.org/10.1016/j.ins.2014.08.002>
- El-Maghrabi, M., Lange, A. J., Jiang, W., Yamagata, K., Stoffel, M., Takeda, J., ... Pilkis, S. J. (1995). Human Fructose-1,6-Bisphosphatase Gene (FBP1): Exon-Intron Organization, Localization to Chromosome Bands 9q22.2-q22.3, and Mutation Screening in Subjects with Fructose-1,6-Bisphosphatase Deficiency. *Genomics*. <https://doi.org/10.1006/geno.1995.1085>
- Emery, J. L., Variend, S., Howat, A. J., & Vawter, G. F. (1988). Investigation of inborn errors of metabolism in unexpected infant deaths. *Lancet*, July, 29–31.
- Gao, Y., Shen, L., & Honzatko, R. B. (2014). Central cavity of fructose-1,6-bisphosphatase and the evolution of AMP/fructose 2,6-bisphosphate synergism in eukaryotic organisms. *Journal of Biological Chemistry*, 289(12), 8450–8461. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.548586>
- Ijaz, S., Zahoor, M. Y., Imran, M., Ramzan, K., Bhinder, M. A., Shakeel, H., ... Rehman, H. (2017). Genetic analysis of fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) deficiency in nine consanguineous Pakistani families. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 30(11), 1203–1210. <https://doi.org/10.1515/jpem-2017-0188>
- Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alföldi, J., Wang, Q., ... MacArthur, D. G. (2019). Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance across human protein-coding genes. *BioRxiv*, 531210. <https://doi.org/10.1101/531210>
- Ke, H., Thorpe, C. M., Seaton, B. A., Marcuso, F., Lipscomb, W. N., Marcus, F., & Lipscomb, W. N. (1989). Molecular structure of fructose-1,6-bisphosphatase at 2.8-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(March), 1475–1479.
- Ke, H., Zhang, Y., & Lipscomb, W. N. (1990). Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with fructose 6-phosphate, AMP, and magnesium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(July), 5243–5247.

- Kikawa, Y., Inuzuka, M., Jin, B. Y., Kaji, S., Koga, J.-I., Yamamoto, Y., ... Sudo, M. (1997). Identification of genetic mutations in Japanese patients with fructose- 1,6-bisphosphatase deficiency. *American Journal of Human Genetics*, *61*(4), 852–861. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-16944363755&partnerID=40&md5=e95282f95acfd9752b877672afe93528>
- Lebigot, E., Brassier, A., Zater, M., Imanci, D., Feillet, F., Théron, P., ... Boutron, A. (2015). Fructose 1,6-bisphosphatase deficiency: clinical, biochemical and genetic features in French patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *38*(5), 881–887. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9804-6>
- Moey, L. H., Abdul Azize, N. A., Yakob, Y., Leong, H. Y., Keng, W. T., Chen, B. C., & Ngu, L. H. (2018). Fructose-1,6-bisphosphatase deficiency as a cause of recurrent hypoglycemia and metabolic acidosis: Clinical and molecular findings in Malaysian patients. *Pediatrics and Neonatology*, *59*, 397–403. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2017.11.006>
- Naslavsky, M. S., Yamamoto, G. L., de Almeida, T. F., Ezquina, S. A. M., Sunaga, D. Y., Pho, N., ... Zatz, M. (2017). Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Human Mutation*, *38*(7), 751–763. <https://doi.org/10.1002/humu.23220>
- Ng, L. H., Nor Azimah, A. A., Leong, H. Y., Chen, B. C., Muzhirzh, H., Zabedah, M. Y., ... Yusnita, Y. (2014). Identification of genetic mutations in Malaysian patients with fructose-1,6-bisphosphatase deficiency. In *64th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics* (p. 541). San Diego. Retrieved from http://www.ashg.org/2014meeting/pdf/2014_ASHG_Meeting_Poster_Abstracts.pdf
- Pinheiro, F. C., Sperb-Ludwig, F., Ligabue-Braun, R., Schüler-Faccini, L., de Souza, C. F. M., Vairo, F., & Schwartz, I. V. D. (2019). Genetic analysis of patients with fructose-1,6-bisphosphatase deficiency. *Gene*, *699*, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.03.007>
- Pinto, A., Alfadhel, M., Akroyd, R., Alt, Y. A., Bernabei, S. M., Bernstein, L., ... MacDonald, A. (2018). International practices in the dietary management of fructose 1-6 biphosphatase deficiency. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *13*(21), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13023-018-0760-3>
- Rellos, P., Ali, M., Vidailhet, M., Sygusch, J., & Cox, T. M. (1999). Alteration of substrate specificity by a naturally-occurring aldolase B mutation (Ala337-->Val) in fructose intolerance. *The Biochemical Journal*, *327*, 321–327.

<https://doi.org/10.1042/0264-6021:3400321>

- Rellos, P., Sygusch, J., & Cox, T. M. (2000). Expression , Purification , and Characterization of Natural Mutants of Human Aldolase B. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(2), 1145–1151.
- Scheffler, J. E., & Fromm, H. J. (1986). Regulation of Rabbit Liver Fructose-1,6-bisphosphatase by Metals, Nucleotides, and Fructose 2,6-Bisphosphate As Determined from Fluorescence Studies. *Biochemistry*, 25(21), 6659–6665. <https://doi.org/10.1021/bi00369a050>
- Shi, R., Chen, Z., Zhu, D., Li, C., Shan, Y., Xu, G., & Lin, S. (2013). Crystal Structures of Human Muscle Fructose-1 , 6-Bisphosphatase: Novel Quaternary States , Enhanced AMP Affinity , and Allosteric Signal Transmission Pathway. *PLoS ONE*, 8(9), e71242. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071242>
- Steinmann, B., Santer, R., & van der Berghe, G. (2012). Disorders of Fructose Metabolism. In *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment* (pp. 1–657). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-15720-2>
- Tillmann, H., Stein, S., Liehr, T., & Eschrich, K. (2000). Structure and chromosomal localization of the human and mouse muscle fructose-1,6-bisphosphatase genes. *Gene*, 247(1–2), 241–253. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10773464>
- Weinstein, D. A., Steuerwald, U., De Souza, C. F. M., & Derks, T. G. J. (2018). Inborn Errors of Metabolism with Hypoglycemia: Glycogen Storage Diseases and Inherited Disorders of Gluconeogenesis. *Pediatric Clinics of North America*, 65(2), 247–265. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2017.11.005>
- Yoav, Z., Zeharia, A., Tal, G., Mandel, H., Pode-Shakked, B., & Spiegel, R. (2019). CLINICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF FRUCTOSE 1,6 BISPHTHATASE DEFICIENCY (FBP1D) PATIENTS IN ISRAEL. In *5th International GSD Conference* (p. 20). Porto Alegre: Journal of inborn errors of metabolism and screening.

Tabela 1: Atividade enzimática da frutose-1,6-bifosfatase nos ensaios *in vivo* e *in vitro*.

Variante	<i>In vivo</i> ^a		<i>In vitro</i>	
	Atividade da FBPase ^b	Percentual da atividade da referência (%) ^c	Atividade da FBPase ^b (média±desvio padrão)	Percentual da atividade referência (%) – WT ^d
p.Ala158Trp	ND	ND	0,23±0,09	35,73
p.Gly320Arg	4,3 ^e	4-24	0,07±0,03	10,73
p.Leu329Pro	2,4 ^f	4-9,6	0,06±0,03	9,33

Nota: ^aAtividade de FBPase medida em amostras de fígado de pacientes descritos em estudo prévio (Pinheiro et al., 2019); ^bresultados expressos em nmol/min/mg de proteína; ^cvalor de referência=25-70nmol/min/mg de proteína; ^dvalor de referência = 0,62 nmol/min/mg de prot.; ^evalor referente à média da atividade de FBPase de três pacientes homocigotos para o alelo p.Gly320Arg; ^fValor referente à atividade de FBPase de um paciente homocigoto para o alelo p.Leu329Pro; ND = Não disponível.

Tabela 2: Análise da afinidade da FBPase ao substrato frutose-1,6-bifosfato na presença dos inibidores AMP e frutose-2,6-bifosfato.

FBPase	D-frutose-1,6-bifosfato		D-frutose-2,6-bifosfato	
	Forma Apo	Com AMP	Forma Apo	Com AMP
WT	3.940	13.550	-1.836	12.344
p.Arg158Trp	-7.689	-9.538	14.259	15.278
p.Gly320Arg	134.133	24.604	15.509	9.940
p.Leu329Pro	-0.066	32.859	7.451	3.697

Nota: Os valores estão expressos em KJ/mol e quanto mais negativos maior é a afinidade entre as moléculas analisadas.

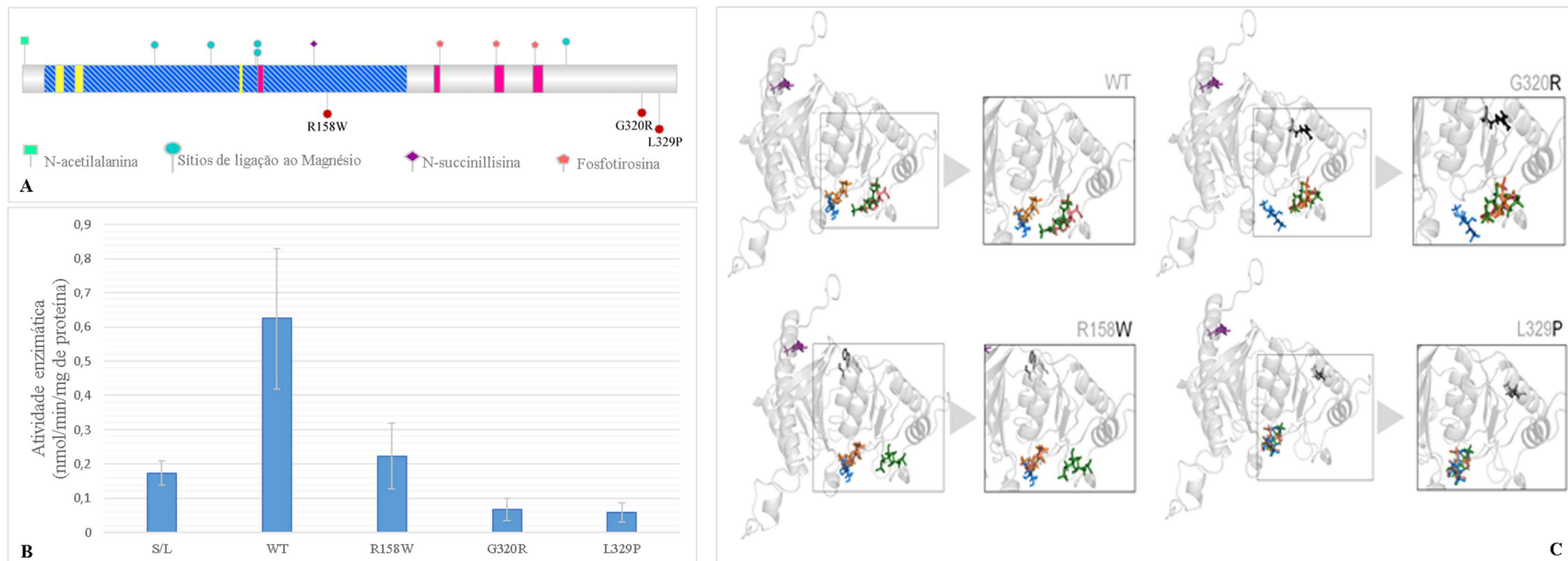


Figura 1: Análises in vitro e in silico das variantes p.Arg158Trp, p.Gly320Arg e p.Leu329Pro da frutose-1,6-bifosfatase. A) Esquema da enzima FBPase com localização das variantes em análise. Em amarelo os sítios de ligação à AMP; em azul com linhas o domínio FBPase; em rosa os sítios de ligação ao substrato; modificações pós-traducionais conforme legenda. B) Representação gráfica da atividade enzimática das proteínas mutantes estudadas. Células COS-7 foram transientemente transfectadas com vetor de expressão contendo o gene *FBP1* selvagem (WT) ou com um dos mutantes p.Arg158Trp (R158W), p.Gly320Arg (G320R) ou p.Leu329Pro (G329P). A esquerda do gráfico células não transfectadas como controle negativo (S/L). C) Representação dos resultados da análise de docking para o WT e mutantes (R158W, G320R e L329P). O melhor escore para cada docking está colorido da seguinte forma: azul=F1,6P2 sem AMP; verde=F1,6P2 com AMP; Rosa=F2,6P2 com AMP; laranja=F2,6P2 com AMP; roxo=sítio de ligação à AMP (para referência). Os resíduos mutados são representados em preto. A posição de AMP (roxo) é mostrada apenas para referência.

8. DISCUSSÃO

A IHF e a DFB são erros inatos do metabolismo da frutose que têm uma manifestação clínica inespecífica, podendo apresentar hepatomegalia, hipoglicemia, acidose metabólica, hipertrigliceridemia, dentre outras. Assim, essas doenças podem ser facilmente confundidas com outras, tais como doença congênita de glicosilação na IHF e glicogenoses hepáticas no caso da DFB. Isso é especialmente importante porque tanto a IHF quanto a DFB são dieteticamente tratáveis e, quando descobertas precocemente, a intervenção adequada resulta em um bom prognóstico (Demirbas et al., 2018; Weinstein et al., 2018). Dessa forma, nosso estudo buscou estabelecer as bases genéticas para o diagnóstico dessas doenças no país.

Essas doenças são raras, sendo que a incidência estimada é de 1:23.000-1:31.000 para a IHF (James et al., 1996; Santer et al., 2005) e de 1:350.000-1:900.000 para a DFB (Lebigot et al., 2015; Bijarnia-Mahay et al., 2019). Nesse contexto, ainda que não tenhamos feito uma análise para determinar a incidência dessas doenças no Brasil, chama a atenção o número reduzido de pacientes com IHF em nosso grupo amostral. É possível que a doença esteja sendo subdiagnosticada no país. Um fator que colabora para isso é a aversão à doces e frutas manifestada por pacientes, a qual é uma característica importante da doença. Pois, sem que haja o consumo de frutose os sintomas não se manifestam, de modo que muitos indivíduos chegam a idade adulta sem diagnóstico (Demirbas et al., 2018).

Adicionalmente, se uma crise aguda é desencadeada o tratamento convencional da hipoglicemia e da acidose metabólica normalizam as condições do paciente. Contudo, baixas doses do consumo de frutose à longo prazo podem acarretar em hepatomegalia e/ou esteatose por acúmulo de FIP em pacientes com IHF (Dato et al., 2019). Esse aspecto é bastante relevante, ao passo que a esteatose pode evoluir, acometendo de forma irreversível o fígado. Em razão disso, vem crescendo o interesse da comunidade científica à respeito da IHF, já que indivíduos com essa doença podem servir de modelo para estudos da patogênese da síndrome metabólica causada pelo consumo excessivo de frutose, a qual é associada a diabetes mellitus e obesidade (Buziau et al., 2019).

Normalmente, é em função do aumento do fígado que os pacientes podem buscar tratamento. Logo, o especialista que terá o primeiro contato com esse paciente é o hepatologista, e muitos desses médicos podem não suspeitar de IHF, justamente por ser uma

doença rara e pouco conhecida. Isso faz com que haja uma longa investigação das causas da hepatomegalia sem que se chegue a um diagnóstico definitivo. Além disso, é necessário considerar que os pacientes com IHF manifestam sintomas gastrointestinais, os quais podem ser confundidos com intolerância à frutose, um distúrbio na absorção desse açúcar que acarreta no seu acúmulo em regiões distais do intestino e por isso causa inchaços e dores abdominais, formação de gases e diarreia (Ebert and Witt, 2016). Descobertas recentes acerca do metabolismo da frutose mostram a importância de aumentarmos nosso conhecimento sobre a IHF e suas características na população brasileira.

Primeiramente, o diagnóstico da IHF e da DFB era alcançado a partir do ensaio da atividade enzimática em tecido hepático obtido a partir de uma biópsia (Steinmann et al., 2012). Com a evolução das técnicas moleculares, a análise das sequências de *ALDOB* e *FBPI* passou a ser empregada como método de escolha no diagnóstico dessas doenças, por ser menos invasivo. No Brasil, não há laboratórios que realizem a análise da atividade da aldolase B ou da FBPase e, além disso, os métodos de diagnóstico molecular não estão disponíveis na rede pública de saúde, sendo executados apenas por pesquisa ou por alguns laboratórios particulares. Desse modo, o trabalho que desenvolvemos fornece a base para a racionalização do diagnóstico molecular dessas doenças no Brasil de modo a reduzir custos e garantir um aumento na taxa diagnóstica. Em se tratando da IHF nossos resultados mostram que uma análise direcionada à detecção de quatro alelos frequentes na população brasileira pode resultar em uma taxa diagnóstica de 87%. Já em se tratando da DFB, o estudo evidenciou que uma abordagem por sequenciamento massivo paralelo com um painel de genes envolvidos com doenças que acarretam em hipoglicemia pode ser uma boa alternativa para o diagnóstico dessa doença no Brasil. Contudo, é importante ressaltar que o gene *FBPI* tem algumas regiões de difícil amplificação (principalmente o éxon 2) e que deve se ter cuidado na análise dessas regiões, principalmente quando o diagnóstico genético é o objetivo.

Outro aspecto acerca do diagnóstico molecular é a classificação de variantes, assunto que tem sido muito debatido na comunidade científica e que é de suma importância na prática clínica (Richards et al., 2015; Nykamp et al., 2017). No caso dos EIM da frutose, temos dois aspectos bastantes interessantes no que concerne esse tema. Em se tratando de IHF, há um grupo de cinco variantes patogênicas mundialmente distribuídas respondendo pela maior parte dos alelos detectados em diferentes etnias (Coffe et al., 2010). Nossos dados,

evidenciam que quatro dentre esses cinco alelos respondem pela maior parte das variantes patogênicas presentes em pacientes brasileiros. O que, de certo modo, facilita a interpretação dos achados moleculares, posto que se trata de variantes bem estabelecidas na patogênese da doença. Por outro lado, os alelos envolvidos na patogênese da DFB são, em sua maioria, privados ou restritos a um grupo étnico, com poucos exemplos de variantes detectadas em diferentes populações (Afroze et al., 2013b; Santer et al., 2016). Esses aspectos da doença evidenciam a necessidade de critérios bem estabelecidos para a classificação de variantes. Nesse contexto, a análise de sete pacientes brasileiros evidenciou a presença de quatro variantes no gene *FBPI* que foram classificadas como patogênicas, seguindo as recomendações da ACMG (Richards et al., 2015). Dentre esses alelos, detectamos duas variantes novas e duas descritas em outras populações. Aplicamos abordagens *in silico* associadas às análises *in vitro* para evidenciar os mecanismos envolvidos na patogênese das variantes de sentido trocado que detectamos em nossos pacientes. Nosso estudo é o primeiro a analisar pacientes brasileiros com DFB e o segundo a avaliar pacientes com IHF no país, de modo que nossas análises poderão auxiliar no direcionamento do diagnóstico genético de erros inatos do metabolismo da frutose no Brasil.

9. CONCLUSÕES

As conclusões do trabalho serão apresentadas por objetivos.

I. Analisar as frequências de variantes patogênicas no gene ALDOB descritas na literatura em pacientes com IHF relacionando suas distribuições entre as diferentes populações.

Até o momento, foram detectadas 68 variantes envolvidas com a patogênese da IHF. Dentre essas, três respondem por cerca de 70% dos alelos descritos em pacientes: p.Ala150Pro, p.Ala175Asp e p.Asn120Lysfs*32. A primeira é a variante mais frequente (~53%) estando mundialmente distribuída. No continente Europeu, esse alelo apresenta um gradiente de distribuição decrescente do Norte em direção ao Sul, o que pode indicar uma origem Escandinava. A variante p.Ala175Asp é a segunda mais frequente, apresentando um gradiente de distribuição na Europa oposto à p.Ala150Pro, sugerindo uma possível origem no Império Romano. Já, o alelo p.Asn120Lysfs*72 está situado em uma região gênica repetitiva, o que pode ser um *hot spot* para eventos mutacionais do tipo deleção e inserção. Contudo, a distribuição desse alelo pode ser indicativa de uma possível origem Ibérica. As duas hipóteses são plausíveis e precisam ser melhor estudadas para se saber qual é a mais provável. O continente asiático apresenta um perfil alélico distinto da Europa e América, sendo pouco amostrado na literatura disponível, assim como acontece com a África.

II. Analisar a frequência de variantes patogênicas ou preditas como tal no gene ALDOB, presentes no banco de dados genômicos populacionais gnomAD, e estimar a prevalência da IHF para todas as populações descritas nesse banco de dados a partir da frequência de heterozigotos para esses alelos.

Foram utilizadas duas abordagens para determinar quais variantes seriam analisadas. Uma abordagem analisou todas as variantes preditas como patogênicas no gene *ALDOB*, totalizando 123 alterações avaliadas. Assim, a frequência de heterozigotos calculada a partir disso foi de 1:103 resultando em uma prevalência global de IHF de 1:10.672. Na segunda abordagem, buscamos no gnomAD por variantes presentes no HGMD. Entre as 68 variantes patogênicas descritas em pacientes com IHF, apenas 16 foram detectadas em populações-controle. As frequências alélicas indicam uma frequência total de heterozigotos de 1:242, resultando em uma prevalência estimada de 1:58.370. A população de europeus não

finlandeses é a que apresenta a maior prevalência estimada, 1:26.817, o que corroborou estudos baseados em triagem neonatal de alelos específicos em populações europeias. O estudo mostrou que a abordagem utilizada é adequada, mas que tem alguns aspectos importantes que limitam sua aplicação a algumas populações. Assim, é possível usar bancos de dados genômicos para estimar a prevalência de doenças monogênicas de herança recessiva com alguma confiabilidade se a população alvo do estudo for bem representada em bancos de dados, bem como se os alelos envolvidos com a patogênese da doença na referida população são bem estabelecidos.

III. Analisar o perfil genético de pacientes brasileiros com IHF relacionando as variantes patogênicas detectadas com a região de origem desses pacientes.

O presente estudo foi o primeiro a utilizar uma abordagem de sequenciamento massivo paralelo na análise de pacientes com suspeita clínica de IHF. Os resultados mostraram que a população brasileira é menos heterogênea que outras populações americanas descritas na literatura. Foram detectadas quatro variantes previamente descritas envolvidas na patogênese de IHF, em 11 pacientes brasileiros (21 alelos): p.Arg60Ter, p.Asn120Lysfs*32, p.Ala150Pro e p.Ala175Asp. No Sul, a variante p.Ala150Pro é a mais frequente (50%, 6/12 alelos) enquanto que a região Sudeste tem o alelo p.Arg60Ter como o mais frequente (~57%, 4/7 alelos). Entretanto, devemos considerar o tamanho amostral reduzido desse estudo.

IV. Desenvolver um algoritmo para uma abordagem diagnóstica de IHF em pacientes brasileiros considerando as características genéticas dessa população.

Evidenciamos que a análise direcionada para a detecção dos alelos p.Arg60Ter, p.Asn120Lysfs*32, p.Ala150Pro e p.Ala175Asp pode resultar em diagnóstico confirmatório em pacientes com uma suspeita clínica bem estabelecida. O alto índice de pacientes com suspeita clínica em que não se confirmou o diagnóstico de IHF (50%) evidenciou alguns aspectos importantes. Primeiro, é necessário considerar que analisamos apenas a região codificante de *ALDOB* e que, desse modo não podemos descartar a possível suspeita clínica pois há outras regiões do gene, não avaliadas, que podem estar envolvidas na patogênese da doença. Segundo, é preciso caracterizar os aspectos clínicos da doença de forma que se evite

confusões com a intolerância causada pela má absorção da frutose, que é uma doença cuja causa ainda é desconhecida, e outros EIM.

V. Identificar as variantes envolvidas na patogênese da DFB em pacientes brasileiros.

O estudo de seis pacientes do RS evidenciou a presença de três alelos patogênicos envolvidos na patogênese da DFB no Brasil. O alelo c.472C>T foi previamente descrito na literatura em pacientes da França, Malásia, Índia e Paquistão. Esse é um dos poucos alelos em *FBPI* que não é restrito a um grupo familiar, mas não foi possível identificar se esse apresenta uma única origem ou se surgiu de forma independente nessas famílias. Outros dois alelos, não descritos previamente, foram detectados em 5 pacientes não relacionados, são eles: c.958G>A e c.986T>C. As análises mostraram que essas variantes apresentavam uma única origem cada uma, e que um provável efeito endogâmico atua na distribuição dos mesmos. Além desses, foi avaliada uma paciente de Alagoas e detectou-se uma mutação de mudança de fase de leitura resultante da deleção de quatro adeninas em uma região exônica altamente repetitiva de *FBPI*, c.611_614delAAAA. Esse alelo foi previamente descrito em pacientes paquistaneses e indianos. A análise da região em torno do evento mutacional indica que essa variante tenha surgido de forma independente nessas famílias.

VI. Caracterizar por abordagens in silico variantes detectadas no gene FBPI.

As quatro variantes identificadas em *FBPI* foram analisadas por diferentes softwares preditores de patogenicidade, os quais as indicaram como patogênicas. Além disso, foi realizada a modelagem 3D de todos esses alelos. Essa análise mostrou que a variante c.611_614delAAAA resulta em alteração na estrutura primária da proteína gerando um códon de parada prematuro. Esse mutante resulta na perda de sítios importantes à atividade enzimática e formação de uma proteína truncada, que foi predita que escapa ao processo de decaimento de mRNA mediado por códon de parada prematuro, provavelmente não apresentando nenhuma atividade residual. As variantes de sentido trocado c.472C>T (p.Arg158Trp), c.958G>A (p.Gly320Arg) e c.986T>C (p.Leu329Pro) não mostraram nenhuma alteração estrutural significativa na proteína. Análises de hidrofobicidade e carga eletrostática também não indicaram nenhuma mudança que justificasse a patogenicidade desses alelos. Entretanto, destacamos que essas análises constituem ferramentas importantes para a descrição de um novo alelo, de modo que a abordagem *in silico* pode ser usada para

investigar mecanismos envolvidos na patogênese de variantes. Porém, as alterações em uma proteína mutante nem sempre são detectadas por essas abordagens.

VII. Realizar a análise funcional in vitro de variantes novas no gene FBPI detectadas em pacientes brasileiros.

As variantes c.472C>T (p.Arg158Trp), c.958G>A (p.Gly320Arg) e c.986T>C (p.Leu329Pro), detectadas no gene *FBPI* em pacientes brasileiros com DFB, foram analisadas por ensaios funcionais. Os resultados indicaram que as variantes p.Gly320Arg e p.Leu329Pro apresentam uma atividade enzimática de ~10% do tipo-selvagem. A análise de *docking* evidenciou que o inibidor AMP induz um aumento na afinidade dessas proteínas mutantes pelo substrato F2,6P2, que atua como inibidor da FBPase por competir com o substrato F1,6P2 pelo sítio ativo. A presença desse inibidor na enzima, mantém-na em sua conformação T que é cineticamente inativa. Já a variante p.Arg158Trp retém ~35% da atividade apresentada pelo tipo selvagem, sendo que as análises *in silico* indicaram que essa proteína mutante apresenta maior afinidade pelo substrato. Logo, é possível que essa maior afinidade mantenha o substrato ligado na enzima e por isso a atividade enzimática seja reduzida.

10. PERSPECTIVAS

A linha de pesquisa iniciada na presente tese permanecerá sendo desenvolvida pelo grupo de pesquisa, de modo que já estão em andamento estudos para avaliar a presença de alterações nos genes envolvidos com a absorção da frutose pelo enterócito. Essas análises poderão auxiliar na compreensão dos mecanismos que acarretam na má absorção da frutose, posto que esse é um nicho com muitas lacunas a serem preenchidas. Adicionalmente, poderá vir a ser realizada a análise do microbioma de pacientes com IHF para avaliar se os achados com modelos animais, que indicaram alterações significativas e com consequências importantes nesse aspecto se translacionam aos seres humanos. Além disso, a análise de regiões do gene *ALDOB* que não foram avaliadas no presente estudo pode auxiliar na conclusão dos genótipos que não foram completamente identificados.

11. REFERÊNCIAS

Afroze B, Yunus Z, Steinmann B and Santer R (2013a) Transient pseudo-hypertriglyceridemia: A useful biochemical marker of fructose-1,6-bisphosphatase deficiency. *Eur J Pediatr* 172:1249–1253. doi: 10.1007/s00431-013-2084-6

Afroze B, Yunus Z, Steinmann B and Santer R (2013b) Transient pseudo-hypertriglyceridemia: a useful biochemical marker of fructose-1,6-bisphosphatase deficiency. *Eur J Pediatr* 172:1249–1253. doi: 10.1007/s00431-013-2084-6

Ali BR, Hertecant JL, Al-Jasmi FA, Hamdan MA, Khuri SF, Akawi NA and Al-Gazali LI (2011) New and known mutations associated with inborn errors of metabolism in a heterogeneous Middle Eastern population. *Saudi Med J* 32:353–359.

Ali M and Cox TM (1995) Diverse mutations in the aldolase B gene that underlie the prevalence of hereditary fructose intolerance. *Am J Hum Genet* 56:1002–5.

Ali M, James CL and Cox M (1996) A Newly Identified Adolase B Splicing Mutation (G-->C, 5' intron 5) in Hereditary Fructose Intolerance From New Zealand. *Hum Mutat* 7:155–157. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1996)7:2<155::AID-HUMU11>3.0.CO;2-1

Ali M, Rellos P and Cox TM (1998) Hereditary fructose intolerance. *J Med Genet* 35:353–365.

Ali M, Rosien U and Cox TM (1993) DNA diagnosis of fatal fructose intolerance from archival tissue. *Q J Med* 86:25–30. doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.qjmed.a068733>

Ali M, Tunçman G, Cross NCP, Vidailhet M, Bokesoy I, Gitzelmann R and Cox TM (1994) Null alleles of the aldolase B gene in patients with hereditary fructose intolerance. *J Med Genet* 31:499–503. doi: 10.1136/jmg.31.6.499

Allen RJ and Musante CJ (2018) A mathematical analysis of adaptations to the metabolic fate of fructose in essential fructosuria subjects. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 315:E394–E403. doi: 10.1152/ajpendo.00317.2017

Asberg C, Hjalmarson O, Alm J, Martinsson T, Waldenström J and Hellerud C (2010) Fructose 1,6-bisphosphatase deficiency: Enzyme and mutation analysis performed on calcitriol-stimulated monocytes with a note on long-term prognosis. *J Inherit Metab Dis* 33:113–121. doi: 10.1007/s10545-009-9034-5

Asipu A, Hayward BE, Reilly JO and Bonthron DT (2003) Properties of Normal and

Mutant Recombinant Human Ketohexokinases and Implications for the Pathogenesis of Essential Fructosuria. *Diabetes* 52:2426–2432.

Baker L and Winegrad AI (1970) FASTING HYPOGLYCÆMIA AND METABOLIC ACIDOSIS ASSOCIATED WITH DEFICIENCY OF HEPATIC FRUCTOSE-1,6-DIPHOSPHATASE ACTIVITY. *Lancet* 296:13–16. doi: 10.1016/S0140-6736(70)92474-8

Bijarnia-Mahay S, Bhatia S and Arora V (2019) Fructose-1, 6-Bisphosphatase Deficiency. In: MP A, HH A and RA P (eds) *GeneReviews*(®). pp 1–16

Bijarnia-mahay S, Movva S, Gupta N, Sharma D, Puri RD, Kotecha U, Saxena R, Kabra M, Mohan N and Verma IC (2015) Molecular Diagnosis of Hereditary Fructose Intolerance: Founder Mutation in a Community from India. *JIMD Rep* 85–93. doi: 10.1007/8904_2014_374

Boesiger P, Buchli R, Meier D, Steinmann B and Gitzelmann R (1994) Changes of liver metabolite concentrations in adults with disorders of fructose metabolism after intravenous fructose by³¹p magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res* 36:436–440. doi: 10.1203/00006450-199410000-00004

Bonthron DT, Brady N, Donaldson A and Steinmannz B (1994) Molecular basis of essential fructosuria : molecular cloning and mutational analysis of human ketohexokinase (fructokinase). *Hum Mol Genet* 3:1627–1632.

Bouteldja N and Timson DJ (2010) The biochemical basis of hereditary fructose intolerance. *J Inherit Metab Dis* 33:105–112. doi: 10.1007/s10545-010-9053-2

Brooks CC, Buist N, Tuerck J and Tolan DR (1991) Identification of a splice-site mutation in the aldolase B gene from an individual with hereditary fructose intolerance. *Am J Hum Genet* 49:1075–1081.

Brooks CC and Tolan DR (1994) A partially active mutant aldolase B from a patient with hereditary fructose intolerance. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 8:107–113.

Brunt EM, Wong VWS, Nobili V, Day CP, Sookoian S, Maher JJ, Bugianesi E, Sirlin CB, Neuschwander-Tetri BA and Rinella ME (2015) Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Prim* 1:1–22. doi: 10.1038/nrdp.2015.80

Burlina AB, Poletto M, Shin YS and Zacchello F (1990) Clinical and biochemical observations on three cases of fructose-1,6-diphosphatase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 13:263–266. doi: 10.1007/BF01799368

Buziau AM, Schalkwijk CG, Stehouwer CDA, Tolan DR and Brouwers MCGJ (2019) Recent advances in the pathogenesis of hereditary fructose intolerance : implications for its treatment and the understanding of fructose - induced non - alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci.* doi: 10.1007/s00018-019-03348-2

Chambers RA and Pratt RTC (1956) Idiosyncrasy to fructose. *Lancet* August 18:340. doi: 10.1016/s0140-6736(56)92196-1

Chen Q, Wang TT, Li J, Wang S, Qiu F, Yu H, Zhang Y and Wang TT (2017) Effects of natural products on fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutrients.* doi: 10.3390/nu9020096

Choi HW, Lee YJ, Oh SH, Kim KM, Ryu JM, Lee BH, Kim GH and Yoo HW (2012) A novel frameshift mutation of the ALDOB gene in a Korean girl presenting with recurrent hepatitis diagnosed as hereditary fructose intolerance. *Gut Liver* 6:126–128. doi: 10.5009/gnl.2012.6.1.126

Choi Y (2003) Fructose intolerance: an under-recognized problem. *Am J Gastroenterol* 98:1348–1353. doi: 10.1016/s0002-9270(03)00251-x

Coffe EM, Coffee EM, Yerkes L, Ewen EP, Zee T and Tolan DR (2010) Increased prevalence of mutant null alleles that cause hereditary fructose intolerance in the American population. *J Inherit Metab Dis* 33:33–42. doi: 10.1007/s10545-009-9008-7

Cross NC and Cox TM (1990) Partial aldolase B gene deletions in hereditary fructose intolerance. *Am J Hum Genet* 47:101–106.

Cross NCP, Cox TM, de Franchis R, Sebastio G, Dazzo C, Tolan DR, Grégori C, Odievre M, Vidailhet M, Romano V et al. (1990a) Molecular analysis of aldolase B genes in hereditary fructose intolerance. *Lancet* 335:306–309. doi: 10.1016/0140-6736(90)90603-3

Cross NCP, Stojanov LM and Cox TM (1990b) A new aldolase B variant, N334K, is a common cause of hereditary fructose intolerance in Yugoslavia. *Nucleic Acids Res* 18:1925. doi: 10.1093/nar/18.7.1925

Cross NCP, Tolan DR and Cox TM (1988) Catalytic deficiency of human aldolase B in hereditary fructose intolerance caused by a common missense mutation. *Cell* 53:881–885. doi: 10.1016/S0092-8674(88)90349-2

Dato F Di, Spadarella S, Puoti MG, Caprio MG, Pagliardini S, Zuppaldi C, Vallone G and Fecarotta S (2019) Daily Fructose Traces Intake and Liver Injury in Children with

Hereditary Fructose Intolerance. *Nutrients* 11:1–12. doi: 10.3390/nu11102397

Davit-spraul A, Costa C, Zater M, Habes D, Berthelot J, Broué P, Feillet FF, Bernard O, Labrune P, Baussan C et al. (2008) Hereditary fructose intolerance : Frequency and spectrum mutations of the aldolase B gene in a large patients cohort from France — Identification of eight new mutations. *Mol Genet Metab* 94:443–447. doi: 10.1016/j.ymgme.2008.05.003

Dazzo C and Tolan DR (1990) Molecular evidence for compound heterozygosity in hereditary fructose intolerance. *Am J Hum Genet* 46:1194–1199.

Debray FG, Damjanovic K, Rosset R, Mittaz-Crettol L, Roux C, Braissant O, Barbey F, Bonafé L, De Bandt JP, Tappy L et al. (2018) Are heterozygous carriers for hereditary fructose intolerance predisposed to metabolic disturbances when exposed to fructose? *Am J Clin Nutr* 108:292–299. doi: 10.1093/ajcn/nqy092

Demirbas D, Brucker WJ and Berry GT (2018) Inborn Errors of Metabolism with Hepatopathy. *Pediatr Clin North Am* 65:337–352. doi: 10.1016/j.pcl.2017.11.008

Diggle CP, Shires M, Leitch D, Brooke D, Carr IM, Markham AF, Hayward BE, Asipu A and Bonthron DT (2009) Ketohexokinase : Expression and Localization of the Principal Fructose-metabolizing Enzyme. *J Histochem Cytochem* 57:763–774. doi: 10.1369/jhc.2009.953190

Distefano JK (2019) Fructose-mediated effects on gene expression and epigenetic mechanisms associated with NAFLD pathogenesis. *Cell Mol Life Sci* 1:3. doi: 10.1007/s00018-019-03390-0

Ebert K and Witt H (2016) Fructose malabsorption. *Mol Cell Pediatr* 3:3–7. doi: 10.1186/s40348-016-0035-9

El-Maghrabi M, Lange AJ, Jiang W, Yamagata K, Stoffel M, Takeda J, Fernald AA, Le Beau MM, Bell GI, Baker L et al. (1995) Human Fructose-1,6-Bisphosphatase Gene (FBP1): Exon-Intron Organization, Localization to Chromosome Bands 9q22.2-q22.3, and Mutation Screening in Subjects with Fructose-1,6-Bisphosphatase Deficiency. *Genomics* 27:520–525. doi: 10.1006/geno.1995.1085

Emery JL, Variend S, Howat AJ and Vawter GF (1988) Investigation of inborn errors of metabolism in unexpected infant deaths. *Lancet* July:29–31.

Eren E, Edgunlu T, Abuhandan M and Yetkin I (2013) Novel fructose-1,6-bisphosphatase gene mutation in two siblings. *DNA Cell Biol* 32:635–639. doi:

10.1089/dna.2013.2119

Esposito G, Imperato MR, Ieno L, Sorvillo R, Benigno V, Parenti G, Parini R, Vitagliano L, Zagari A, Salvatore F et al. (2010) Hereditary Fructose Intolerance : Functional Study of Two Novel ALDOB Natural Variants and Characterization of a Partial Gene Deletion. *Hum Mutat* 31:1294–1303. doi: 10.1002/humu.21359

Esposito G, Santamaria R, Vitagliano L, Ieno L, Viola A, Fiori L, Parenti G, Zancan L, Zagari A and Salvatore F (2004) Six Novel Alleles Identified in Italian Hereditary Fructose Intolerance Patients Enlarge the Mutation Spectrum of the Aldolase B Gene. *Hum Mutat* 761:1–8. doi: 10.1002/humu.9290

Esposito G, Vitagliano L, Santamaria R, Viola A, Zagari A and Salvatore F (2002) Structural and functional analysis of aldolase B mutants related to hereditary fructose intolerance. *FEBS Lett* 531:152–156. doi: 10.1016/S0014-5793(02)03451-8

Faiyaz-Ul-Haque M, Al-Owain M, Al-Dayel F, Al-Hassnan Z, Al-Zaidan H, Rahbeeni Z, Al-Sayed M, Balobaid A, Cluntun A, Toulimat M et al. (2009) Novel FBP1 gene mutations in Arab patients with fructose-1,6-bisphosphatase deficiency. *Eur J Pediatr* 168:1467–1471. doi: 10.1007/s00431-009-0953-9

Ferri L, Caciotti A, Cavicchi C, Rigoldi M, Parini R, Caserta M, Chibbaro G, Gasperini S, Procopio E, Donati MA et al. (2012) Integration of PCR-Sequencing Analysis with Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification for Diagnosis of Hereditary Fructose Intolerance. *JIMD Rep* 4:31–37. doi: 10.1007/8904_2012_125

Froesch ER, Wolf HP and Baitsch H (1963) Hereditary Fructose Intolerance. An Inborn Defect of Hepatic Fructose-1-Phosphate Splitting Aldolase. *Am J Med* 34:151–167. doi: 10.1016/0002-9343(63)90050-0

Gruchota J, Pronicka E, Korniszewski L, Stolarski B and Pollak A (2006) Aldolase B mutations and prevalence of hereditary fructose intolerance in a Polish population. *Mol Genet Metab Reports* 87:376–378. doi: 10.1016/j.ymgme.2005.11.010

Hannou SA, Haslam DE, McKeown NM and Herman MA (2018) Fructose metabolism and metabolic disease. *J Clin Invest* 128:545–555. doi: 10.1172/JCI96702

Herzog B, Morris AAM, Saunders C and Eschrich K (2001) Mutation spectrum in patients with fructose-1,6-bisphosphatase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 24:87–88. doi: 10.1023/A:1005691730058

Herzog B, Wendel U, Morris AA and Eschrich K (1999) Novel mutations in patients

with fructose-1,6-bisphosphatase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 22:132–8.

Ijaz S, Zahoor MY, Imran M, Ramzan K, Bhinder MA, Shakeel H, Iqbal M, Aslam A, Shehzad W, Cheema HA et al. (2017) Genetic analysis of fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) deficiency in nine consanguineous Pakistani families. *J Pediatr Endocrinol Metab* 30:1203–1210. doi: 10.1515/jpem-2017-0188

Ishimoto T, Lanasa MA, Le MT, Garcia GE, Diggle CP, MacLean PS, Jackman MR, Asipu A, Roncal-Jimenez CA, Kosugi T et al. (2012) Opposing effects of fructokinase C and A isoforms on fructose-induced metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci* 109:4320–4325. doi: 10.1073/pnas.1119908109

James CL, Rellos P, Ali M, Heeley AF and Cox TM (1996) Neonatal screening for hereditary fructose intolerance: frequency of the most common mutant aldolase B allele (A149P) in the British population. *J Med Genet* 33:837–41.

Jang C, Hui S, Lu W, Cowan AJ, Morscher RJ, Lee G, Liu W, Tesz GJ, Birnbaum MJ and Rabinowitz JD (2018) The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids. *Cell Metab* 27:351-361.e3. doi: 10.1016/j.cmet.2017.12.016

Jegatheesan P and De Bandt JP (2017) Fructose and NAFLD: The multifaceted aspects of fructose metabolism. *Nutrients* 9:1–13. doi: 10.3390/nu9030230

Jones HF, Butler RN and Brooks DA (2011) Intestinal fructose transport and malabsorption in humans. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 300:G202–G206. doi: 10.1152/ajpgi.00457.2010

Kajihara S, Mukai T, Arai Y, Owada M, Kitagawa T and Hori K (1990) Hereditary fructose intolerance caused by a nonsense mutation of the aldolase B gene. *Am J Hum Genet* 47:562–567.

Ke H, Thorpe CM, Seaton BA, Marcuso F, Lipscomb WN, Marcus F and Lipscomb WN (1989) Molecular structure of fructose-1,6-bisphosphatase at 2.8-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:1475–1479.

Ke H, Zhang Y and Lipscomb WN (1990) Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphatase complexed with fructose 6-phosphate, AMP, and magnesium. *Proc Natl Acad Sci* 87:5243–5247.

Kelly EE, Horgan CP and McCaffrey MW (2012) Rab11 proteins in health and disease. *Biochem Soc Trans* 40:1360–1367. doi: 10.1042/BST20120157

Kikawa Y, Inuzuka M, Jin BY, Kaji S, Koga J-I, Yamamoto Y, Fujisawa K, Hata I,

Nakai A, Shigematsu Y et al. (1997) Identification of genetic mutations in Japanese patients with fructose- 1,6-bisphosphatase deficiency. *Am J Hum Genet* 61:852–861.

Kikawa Y, Inuzuka M, Jin BY, Kaji S, Yamamoto Y, Shigematsu Y, Nakai A, Taketo A, Ohura T, Mikami H et al. (1995) IDENTIFICATION OF A GENETIC MUTATION IN A FAMILY WITH FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE DEFICIENCY. *Biochem Biophys Res Commun* 210:797–804.

Lanaspa MA, Johnson RJ, Tolan DR, Lanaspa MA, Andres-hernando A, Orlicky DJ, Cicerchi C, Jang C, Li N, Milagres T et al. (2018) Ketohekinase C blockade ameliorates fructose-induced metabolic dysfunction in fructose-sensitive mice Find the latest version : Ketohekinase C blockade ameliorates fructose- induced metabolic dysfunction in fructose-sensitive mice. *J Clin Invest* 128:2226–2238.

Laron Z (1961) Essential benign fructosuria. *Arch Dis Child* 36:273–277. doi: 10.1136/adc.36.187.273

Lazarin GA, Haque IS, Nazareth S, Iori K, Patterson AS, Jacobson JL, Marshall JR, Seltzer WK, Patrizio P, Evans EA et al. (2013) An empirical estimate of carrier frequencies for 400 + causal Mendelian variants : results from an ethnically diverse clinical sample of 23 , 453 individuals. *Genet Med* 15:178–186. doi: 10.1038/gim.2012.114

Lebigot E, Brassier A, Zater M, Imanci D, Feillet F, Thérond P, de Lonlay P and Boutron A (2015) Fructose 1,6-bisphosphatase deficiency: clinical, biochemical and genetic features in French patients. *J Inherit Metab Dis* 38:881–887. doi: 10.1007/s10545-014-9804-6

Lee HJ and Cha JY (2018) Recent insights into the role of ChREBP in intestinal fructose absorption and metabolism. *BMB Rep* 51:429–436. doi: 10.5483/BMBRep.2018.51.9.197

Li N, Chang G, Xu Y, Ding Y, Li G, Yu T, Qing Y, Li J, Shen Y, Wang J et al. (2017) Clinical and molecular characterization of patients with fructose 1,6-bisphosphatase deficiency. *Int J Mol Sci* 18:1–13. doi: 10.3390/ijms18040857

Matsuura T, Chinen Y, Arashiro R, Katsuren K, Tamura T, Hyakuna N and Ohta T (2002) Two newly identified genomic mutations in a Japanese female patient with fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) deficiency. *Mol Genet Metab* 76:207–210. doi: 10.1016/S1096-7192(02)00038-0

Miller CO, Yang X, Lu K, Cao J, Herath K, Rosahl TW, Askew R, Pavlovic G, Zhou

G, Li C et al. (2018) Ketohexokinase knockout mice, a model for essential fructosuria, exhibit altered fructose metabolism and are protected from diet-induced metabolic defects. *Am J Physiol Metab* 315:E386–E393. doi: 10.1152/ajpendo.00027.2018

Moey LH, Abdul Azize NA, Yakob Y, Leong HY, Keng WT, Chen BC and Ngu LH (2018) Fructose-1,6-bisphosphatase deficiency as a cause of recurrent hypoglycemia and metabolic acidosis: Clinical and molecular findings in Malaysian patients. *Pediatr Neonatol* 59:397–403. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2017.11.006>

Moon S, Kim J-H, Han J-H, Ko S-H, Ahn Y-B, Kim J-H, Yang S-H and Song K-H (2011) Novel compound heterozygous mutations in the fructose-1,6-bisphosphatase gene cause hypoglycemia and lactic acidosis. *Metabolism* 60:107–13. doi: 10.1016/j.metabol.2009.12.021

NCBI (2004) Gene [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>. Accessed 5 Dec 2019

Ngu LH, Nor Azimah AA, Leong HY, Chen BC, Muzhirzh H, Zabedah MY, Anasufiza H, Chor YK and Yusnita Y (2014) Identification of genetic mutations in Malaysian patients with fructose-1,6-bisphosphatase deficiency. 64th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics. San Diego, p 541

Nykamp K, Anderson M, Powers M, Garcia J, Herrera B, Ho Y, Kobayashi Y, Patil N, Thusberg J, Westbrook M et al. (2017) Sherlock: a comprehensive refinement of the ACMG – AMP variant classification criteria. *Genet Med* 19:1105–1117. doi: 10.1038/gim.2017.37

Oh AR, Sohn S, Lee J, Park JM, Nam KT, Hahm KB, Kim YB, Lee HJ and Cha JY (2018) ChREBP deficiency leads to diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Metabolism* 85:286–297. doi: 10.1016/j.metabol.2018.04.006

Pagliara AS, Karl IE, Keating JP, Brown BI and Kipnis DM (1972) Hepatic fructose-1,6-diphosphatase deficiency: A cause of lactic acidosis and hypoglycemia in infancy. *J Clin Invest* 51:2115–2123. doi: 10.1172/JCI107018

Patel C, Douard V, Yu S, Gao N and Ferraris RP (2015a) Transport, metabolism, and endosomal trafficking-dependent regulation of intestinal fructose absorption. *FASEB J* 29:4046–4058. doi: 10.1096/fj.15-272195

Patel C, Douard V, Yu S, Tharabenjasin P, Gao N and Ferraris RP (2015b) Fructose-

induced increases in expression of intestinal fructolytic and gluconeogenic genes are regulated by GLUT5 and KHK. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 309:R499–R509. doi: 10.1152/ajpregu.00128.2015

Petersen A, Steinmann B and Gitzelmann R (1992) Essential fructosuria: Increased levels of fructose 3-phosphate in erythrocytes. *Enzyme* 46:319–323. doi: 10.1159/000468811

Pinheiro FC, Sperb-Ludwig F, Ligabue-Braun R, Schüler-Faccini L, de Souza CFM, Vairo F and Schwartz IVD (2019) Genetic analysis of patients with fructose-1,6-bisphosphatase deficiency. *Gene* 699:102–109. doi: 10.1016/j.gene.2019.03.007

Pinto A, Alfadhel M, Akroyd R, Alt YA, Bernabei SM, Bernstein L, Bruni G, Caine G, Cameron E, Carruthers R et al. (2018) International practices in the dietary management of fructose 1-6 biphosphatase deficiency. *Orphanet J Rare Dis* 13:1–6. doi: 10.1186/s13023-018-0760-3

Rellos P, Ali M, Vidailhet M, Sygusch J and Cox TM (1999) Alteration of substrate specificity by a naturally-occurring aldolase B mutation (Ala337-->Val) in fructose intolerance. *Biochem J* 340:321–327. doi: 10.1042/0264-6021:3400321

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hedge M, Lyon E, Spector E et al. (2015) Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17:405–424. doi: 10.1038/gim.2015.30.

Rumessen JJ and Gudmand-Hoyer E (1986) Absorption capacity of fructose in healthy adults. Comparison with sucrose and its constituent monosaccharides. *Gut* 27:1161–1168. doi: 10.1136/gut.27.10.1161

Sánchez-Gutiérrez JC, Benlloch T, Leal MA, Samper B, García-Ripoll I and Feliú JE (2002) Molecular analysis of the aldolase B gene in patients with hereditary fructose intolerance from Spain. *J Med Genet* 39:e56. doi: 10.1136/jmg.39.9.e56

Santamaria R, Esposito G, Vitagliano L, Race V, Paglionico I, Zancan L, Zagari a and Salvatore F (2000) Functional and molecular modelling studies of two hereditary fructose intolerance-causing mutations at arginine 303 in human liver aldolase. *Biochem J* 350 Pt 3:823–828. doi: 10.1042/0264-6021:3500823

Santamaria R, Tamasi S, Piano G Del, Sebastio G, Andria G, Borrone C, Faldella G,

Izzo P and Salvatore F (1996) Molecular basis of hereditary fructose intolerance in Italy: identification of two novel mutations in the aldolase B gene. *J Med Genet* 33:786–788. doi: 10.1136/jmg.33.9.786

Santamaria R, Vitagliano L, Tamasi S, Izzo P, Zancan L, Zagari A and Salvatore F (1999) Novel six-nucleotide deletion in the hepatic fructose-1, 6-bisphosphate aldolase gene in a patient with hereditary fructose intolerance and enzyme structure-function implications. *Eur J Hum Genet* 7:409–414. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200299

Santer R, du Moulin M, Shahinyan T, Vater I, Maier E, Muntau AC and Steinmann B (2016) A summary of molecular genetic findings in fructose-1,6-bisphosphatase deficiency with a focus on a common long-range deletion and the role of MLPA analysis. *Orphanet J Rare Dis* 11:44. doi: 10.1186/s13023-016-0415-1

Santer R, Rischewski J, von Weihe M, Niederhaus M, Schneppenheim S, Baerlocher K, Kohlschütter A, Muntau A, Posselt H-G, Steinmann B et al. (2005) The spectrum of aldolase B (ALDOB) mutations and the prevalence of hereditary fructose intolerance in Central Europe. *Hum Mutat* 25:594. doi: 10.1002/humu.9343

Saudubray JM and Garcia-Cazorla À (2018) Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management. *Pediatr Clin North Am* 65:179–208. doi: 10.1016/j.pcl.2017.11.002

Saudubray JM, Van Den Berghe G, Walter JH, Steinmann B, Santer R and van der Berghe G (2012) Inborn metabolic diseases diagnosis and treatment. *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*. Springer Berlin Heidelberg, pp 1–657

Shi R, Chen Z, Zhu D, Li C, Shan Y, Xu G and Lin S (2013) Crystal Structures of Human Muscle Fructose-1, 6-Bisphosphatase: Novel Quaternary States, Enhanced AMP Affinity, and Allosteric Signal Transmission Pathway. *PLoS One* 8:e71242. doi: 10.1371/journal.pone.0071242

Softic S, Cohen DE and Kahn CR (2016) Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci* 61:1282–1293. doi: 10.1007/s10620-016-4054-0

Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, Hatcher B, Cox CL, Dyachenko A, Zhang W et al. (2009) Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest* 119:1322–1334. doi:

10.1172/JCI37385

Steinmann B, Santer R and van der Berghe G (2012) Disorders of Fructose Metabolism. *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*. pp 1–657

Ter Horst KW and Serlie MJ (2017) Fructose consumption, lipogenesis, and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients* 9:1–20. doi: 10.3390/nu9090981

Tillmann H, Stein S, Liehr T and Eschrich K (2000) Structure and chromosomal localization of the human and mouse muscle fructose-1,6-bisphosphatase genes. *Gene* 247:241–53.

Tolan DR (1995) Molecular Basis of Hereditary Fructose Intolerance : Mutations and Polymorphisms in the Human Aldolase B Gene. *Hum Mutat* 6:210–218.

Tran C (2017) Inborn Errors of Fructose Metabolism. What Can We Learn from Them? *Nutrients* 9:356. doi: 10.3390/nu9040356

Valadares ER, Cruz AF Da, Adelino TER, Kanufre VDC, Ribeiro MDC, Penido MGMG, Peret Filho LA and Valadares LMSVE (2015) Hereditary fructose intolerance in Brazilian patients. *Mol Genet Metab Reports* 4:35–38. doi: 10.1016/j.ymgmr.2015.05.007

Wang J, Zhan H, Li F, Pursley AN, Schmitt ES and Wong L (2012) Targeted array CGH as a valuable molecular diagnostic approach: Experience in the diagnosis of mitochondrial and metabolic disorders. *Mol Genet Metab* 106:221–230. doi: 10.1016/j.ymgme.2012.03.005

Waters D, Adeloye D, Woolham D, Wastnedge E, Patel S and Rudan I (2018) Global birth prevalence and mortality from inborn errors of metabolism: A systematic analysis of the evidence. *J Glob Health*. doi: 10.7189/jogh.08.021102

Weinstein DA, Steuerwald U, De Souza CFM and Derks TGJ (2018) Inborn Errors of Metabolism with Hypoglycemia: Glycogen Storage Diseases and Inherited Disorders of Gluconeogenesis. *Pediatr Clin North Am* 65:247–265. doi: 10.1016/j.pcl.2017.11.005

Xu K, Liu X, Zhang C, Wang Y, Li X, Wu Y, Yang Y and Xiao H (2014) [Genetic diagnosis of fructose-1, 6-bisphosphatase deficiency: a case report]. *Beijing Da Xue Xue Bao* 46:681–5. doi: 10.3969/j. issn. 1671-167X.2014.05.003

Yoav Z, Zeharia A, Tal G, Mandel H, Pode-Shakked B and Spiegel R (2019) CLINICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF FRUCTOSE 1,6 BISPHOSPHATASE DEFICIENCY (FBP1D) PATIENTS IN ISRAEL. 5th International GSD Conference. *Journal of inborn errors of metabolism and screening*, POorto Alegre, p 20

Zhang X, Grosfeld A, Williams E, Vasiliauskas D, Barretto S, Smith L, Mariadassou M, Philippe C, Devime F, Melchior C et al. (2019) Fructose malabsorption induces cholecystokinin expression in the ileum and cecum by changing microbiota composition and metabolism. *FASEB J* 33:fj.201801526RR. doi: 10.1096/fj.201801526RR

Zhang X, Zhang JH, Chen XY, Hu QH, Wang MX, Jin R, Zhang QY, Wang W, Wang R, Kang LL et al. (2015) Reactive Oxygen Species-Induced TXNIP Drives Fructose-Mediated Hepatic Inflammation and Lipid Accumulation Through NLRP3 Inflammasome Activation. *Antioxidants Redox Signal* 22:848–870. doi: 10.1089/ars.2014.5868

12. ANEXOS

12.1. Anexo 1 – Carta de Aprovação do Projeto no Comitê de Ética em pesquisa, projeto 2017-0450.



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 170450

Data da Versão do Projeto: 30/11/2017

Pesquisadores:

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

FRANCIELE CABRAL FINHEIRO

TATIELE NALIN

CAROLINA HESCHINGHER MOURA DE SOUZA

FERNANDA SPERRELLI LIMA

Título: Perfil genético de pacientes brasileiros com Intolerância Hereditária à Frutose e Deficiência de frutose-1,6-bisofalase determinado por Sequenciamento de Nova Geração

Este projeto foi **APRÓVADO** em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participarão de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GP/PG)

Porto Alegre, 23 de fevereiro de 2018.

Prof. José Roberto Goldim
Coordenador CEP/HCPA

12.2. Anexo 2 – Carta de Aprovação do Projeto no Comitê de Ética em pesquisa, projeto 2018-0142.



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

Carta de Aprovação

Projeto

2C18/0142

Pesquisadores:

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

FERNANDA SPERB LUDWIG; TATIELE NALIN; FRANCIELE CABRAL PINHEIRO;

Número de Participantes: 0

Título: Análise funcional de mutações encontradas em pacientes brasileiros com deficiência de frutose-1,6-bisfosfatase.

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG).

04/07/2018


Prof. Patricia Ashton Prola
Coordenadora GPPG/HCPA

12.3. Anexo 3 – Carta de Aprovação do Projeto no Comitê de Ética em pesquisa, projeto 2018-0143.



HOSPITAL DE
CLÍNICAS
PORTO ALEGRE - RS



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

Carta de Aprovação

Projeto

2018/0143

Pesquisadoras:

IDA YANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

FERNANDA SPERB LUDWIG; CAROLINA FISCHINGER MOURA DE SOUZA; TATIELE NALIN; FRANÇIELE CABRAL PINHEIRO;

Número de Participantes: 0

Título: Intolerância Hereditária à Frutose e Deficiência de frutose-1,6-bisofalase: avaliação de mutações encontradas por Sequenciamento de Nova Geração em pacientes brasileiros.

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisas.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG).

04/07/2018



Prof. Patricia Ashton Prolla
Coordenadora GPPG/HCPA

13. APÊNDICES

13.1. Apêndice 1 – Ficha de coleta de dados para pacientes com suspeita clínica e/ou diagnóstico de intolerância hereditária à frutose, projeto nº 2017-0450.

Ficha de coleta de dados – Intolerância Hereditária a Frutose

Identificação:

Data de preenchimento: ___/___/___

Código do paciente: _____

Data de nascimento: ___/___/___ Sexo: () Feminino () Masculino

Local de nascimento: _____

Casamento consanguíneo: () Sim () Não

Há outros indivíduos afetados na família: () Não () Sim quem: _____

Ascendência:

Pai	() italiana () alemã () portuguesa () espanhola () africana () brasileira () indígena () inglesa () japonesa () chinesa () outra _____ () não sabe
Mãe	() italiana () alemã () portuguesa () espanhola () africana () brasileira () indígena () inglesa () japonesa () chinesa () outra _____ () não sabe

Contato médico:

Nome do médico: _____

Telefone do médico: _____

E-mail do médico: _____

Dados de diagnóstico/clínicos/bioquímicos

Idade de início dos sintomas: _____ Idade ao diagnóstico: _____

Idade de início do tratamento: _____

Método de diagnóstico: _____

AP biópsia hepática (descreva): _____

Diagnóstico molecular: () Sim Qual? _____ () Não

Sintomas iniciais: _____

Tratamento atual:

Achados clínicos atuais:

	Marcar com X se presente	Valor no último exame
Baixa estatura		
Baixo Peso		
Dificuldade escolar		
Hepatomegalia		
Aversão a doces		
Vômitos após a ingestão de sacarose		
Transaminases alteradas		
Hipoglicemia após ingestão de frutose		
Hiperfosfatemia		
Hipertrigliceridemia		
Colesterolemia		
Proteinúria		
Presença de frutose na urina		
Isoeletrofocalização para transferrina		

13.2. Apêndice 2 – Ficha de coleta de dados para pacientes com suspeita clínica e/ou diagnóstico de deficiência de frutose-1,6-bifosfatase, projeto n° 2018-0450.

Ficha de coleta de dados – Deficiência de frutose-1,6-bifosfatase

Identificação:

Data de preenchimento: ___/___/___

Nome do paciente: _____

Data de nascimento: ___/___/___ Sexo: () Feminino () Masculino

Local de nascimento: _____

Casamento consanguíneo: () Sim () Não

Há outros indivíduos afetados na família: () Não () Sim quem: _____

Ascendência:

Pai	() italiana () alemã () portuguesa () espanhola () africana () brasileira () indígena () inglesa () japonesa () chinesa () outra () não sabe
Mãe	() italiana () alemã () portuguesa () espanhola () africana () brasileira () indígena () inglesa () japonesa () chinesa () outra () não sabe

Telefone/e-mail: _____

Contato médico:

Nome do médico: _____

Telefone do médico: _____

E-mail do médico: _____

Dados de diagnóstico/clínicos/bioquímicos

Idade de início dos sintomas: _____ Idade ao diagnóstico: _____

Idade de início do tratamento: _____

Método de diagnóstico: _____

AP biópsia hepática (descreva): _____

Diagnóstico molecular: () Sim Qual? _____ () Não

Sintomas iniciais: _____

Achados clínicos atuais

	Marcar com X se presente	Valor no último exame
Hepatomegalia		
Hipoglicemia acompanhada de acidose láctica		
Piruvato		
Alanina elevada		
Cetonas elevadas		
Ácido úrico elevado		
Glicerol elevado		
Transaminases alteradas		
pH urina		

14. PRODUÇÕES COMPLEMENTARES

14.1. Inibição de KHK no tratamento de intolerância hereditária à frutose e doença do fígado gorduroso não alcoólica: uma faca de dois gumes.

Franciele Cabral Pinheiro^{a, b, c}

Fernanda Sperb Ludwig^{a, b}

Ida Vanessa Doederlein Schwartz^{a, b, d, e}

^aPrograma de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

^bLaboratório BRAIN, Centro de Pesquisa Experimental (CPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

^cUniversidade Federal do Pampa (Unipampa), Itaqui, RS, Brasil.

^dDepartamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

^eServiço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, RS, Brasil.

Comments about:

Buziau AM, Schalkwijk CG, Stehouwer CDA, et al (2019) Recent advances in the pathogenesis of hereditary fructose intolerance: implications for its treatment and the understanding of fructose-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci*.

<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03348-2>.

Prezado Editor:

Buziau e colaboradores (2019), ao revisarem a fisiopatologia hepática da intolerância hereditária à frutose (HFI, OMIM#229600) e sua relação com a doença hepática

gordurosa não alcoólica (NAFLD) induzida por frutose [1], propuseram a inibição da frutoquinase como um possível tratamento de pacientes com HFI ou NAFLD [1]. . A HFI é causada pela atividade deficiente da aldolase B (E.C. 4.1.2.13; codificada pelo gene *ALDOB*), a qual acarreta no acúmulo do seu substrato frutose-1-fosfato (F1P) no fígado, rins e intestino. Esse metabólito também é acumulado em indivíduos com NAFLD induzida por frutose, uma vez que a fosforilação desse açúcar pela frutoquinase (E.C.2.7.1.3; codificada pelo gene *KHK*) é uma reação mais rápida do que a clivagem da F1P pela aldolase B.

Do ponto de vista bioquímico, a nova abordagem terapêutica sugerida por esses autores, é bastante promissora, pois evitaria a formação de F1P e suas consequências, como o aumento da lipogênese, a disfunção mitocondrial, a ativação de rotas inflamatórias e resistência à insulina [2], que acabam ocasionando a esteatose. Essa abordagem é balizada por estudos com ratos duplo knockout (*ALDOB^{-/-}KHK^{-/-}*), os quais evidenciaram uma redução significativa nas anormalidades hepáticas resultantes da deficiência de Aldolase B após sobrecarga de frutose [1, 3]. Contudo, Buziau e colaboradores (2019) não citaram os potenciais eventos adversos associados ao uso de inibidores da frutoquinase. Estudos em modelos animais (ratos knockout *KHK^{-/-}*) evidenciaram que a atividade diminuída da frutoquinase resultou em má absorção da frutose pelos enterócitos; consequentemente, maiores quantidades desse monossacarídeo permaneceram disponíveis no lúmen desses ratos, atingindo regiões distais do intestino e causando alterações significativas na morfologia do ceco e na composição e abundância da microbiota intestinal. Foram encontradas, também, modificações no perfil de proliferação e diferenciação de células entero-endócrinas, as quais afetam o perfil de hormônios gastrointestinais em todas as regiões desse órgão (jejuno, duodeno, íleo e ceco) e no organismo como um todo [4–6].

Dessa forma, há de se pensar como esses potenciais eventos adversos transacionar-se-iam para seres humanos. O tratamento dietético, com restrição de frutose, sorbitol e sacarose, tem sido eficiente para evitar a manifestação aguda da HFI e resulta em um bom prognóstico para esses pacientes [7]. Adicionalmente, pacientes com HFI desenvolvem uma aversão protetiva em relação a alimentos danosos à sua saúde, o que auxilia na manutenção da dieta. Entretanto, estudo recente mostrou o seguimento de pacientes com HFI por um período de dez anos evidenciando que, mesmo com uma dieta restrita em frutose, muitos pacientes ainda apresentam alterações hepáticas importantes como esteatose e elevação dos níveis séricos de ALT [8].

Em se tratando de pacientes com NAFLD, a simples redução no consumo de frutose resulta em melhoras importantes do quadro clínico [9]. Nesse sentido, uma mudança de hábitos de vida que promova a prática de exercícios físicos acompanhada de uma alimentação saudável, em pacientes com NAFLD (induzida por frutose), parece ser mais efetiva do que um tratamento medicamentoso com inibidores de frutoquinase. Salvo se essa abordagem for utilizada como um adjuvante no início do processo de tratamento para acelerar a resposta do organismo.

Referências

1. Buziau AM, Schalkwijk CG, Stehouwer CDA, et al (2019) Recent advances in the pathogenesis of hereditary fructose intolerance: implications for its treatment and the understanding of fructose - induced non - alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci*. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03348-2>
2. Distefano JK (2019) Fructose-mediated effects on gene expression and epigenetic mechanisms associated with NAFLD pathogenesis. *Cell Mol Life Sci* 1:3. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03390-0>

3. Lanaspa MA, Johnson RJ, Tolan DR, et al (2018) Ketoheokinase C blockade ameliorates fructose-induced metabolic dysfunction in fructose-sensitive mice Find the latest version: Ketoheokinase C blockade ameliorates fructose- induced metabolic dysfunction in fructose-sensitive mice. *J Clin Invest* 128:2226–2238
4. Patel C, Douard V, Yu S, et al (2015) Transport, metabolism, and endosomal trafficking-dependent regulation of intestinal fructose absorption. *FASEB J* 29:4046–4058. <https://doi.org/10.1096/fj.15-272195>
5. Jang C, Hui S, Lu W, et al (2018) The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids. *Cell Metab* 27:351-361.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.016>
6. Zhang X, Grosfeld A, Williams E, et al (2019) Fructose malabsorption induces cholecystokinin expression in the ileum and cecum by changing microbiota composition and metabolism. *FASEB J* 33:fj.201801526RR. <https://doi.org/10.1096/fj.201801526RR>
7. Demirbas D, Brucker WJ, Berry GT (2018) Inborn Errors of Metabolism with Hepatopathy. *Pediatr Clin North Am* 65:337–352. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2017.11.008>
8. Dato F Di, Spadarella S, Puoti MG, et al (2019) Daily Fructose Traces Intake and Liver Injury in Children with Hereditary Fructose Intolerance. *Nutrients* 11:1–12. <https://doi.org/10.3390/nu11102397>
9. Schwarz J-M, Noworolski SM, Erkin-Cakmak A, et al (2017) Effects of Dietary Fructose Restriction on Liver Fat, De Novo Lipogenesis, and Insulin Kinetics in Children with Obesity. *Gastroenterology* 153:743–752. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.05.043>