

# **DIAGNÓSTICO DA GALACTOSEMIA CLÁSSICA**

## **Ana Silva**

Aluna da licenciatura em Análises Clínicas e Saúde Pública  
Faculdade de Ciências da Saúde – UFP  
[13501@ufp.pt](mailto:13501@ufp.pt)

## **Inês Lopes Cardoso**

Professora Associada  
Faculdade de Ciências da Saúde - UFP  
[mic@ufp.pt](mailto:mic@ufp.pt)

## **RESUMO**

Galactosemia clássica é uma doença metabólica hereditária caracterizada pela deficiência de galactose-1-fosfato uridiltransferase, que provoca deterioração neurológica progressiva, cataratas e alterações nos aparelhos digestivo e renal.

Pretendeu-se implementar um diagnóstico precoce da doença através da determinação de galactose (em 144 amostras contendo tirosina e/ou fenilalanina aumentadas), galactose-1-fosfato (determinado em 11 amostras com galactose superior a 4,00 mg/dl), avaliação da actividade enzimática e caracterização molecular. Esta caracterização permitiu identificar a mutação p.Q188R em todos os pacientes analisados, entre outras mutações.

**PALAVRAS-CHAVE:** galactose; galactosemia; diagnóstico precoce; caracterização molecular.

## **ABSTRACT**

Classical galactosemia is a hereditary metabolic disease resulting from deficiency of galactose-1-phosphate uridyl-transferase that leads to progressive neurological deterioration, cataracts and changes in digestive and renal tracts.

The goal of this study was to implement an early diagnosis through quantification of galactose (in 144 samples having increased tyrosine and/or phenylalanine), galactose-1-phosphate (determined in 11 samples showing galactose higher than 4,00 mg/dl), enzymatic activity evaluation and molecular characterisation. This characterisation allowed the identification of the p.Q188R mutation in all analysed patients, among others.

**KEY-WORDS:** galactose; galactosemia; early diagnosis; molecular characterization.

# 1. INTRODUÇÃO

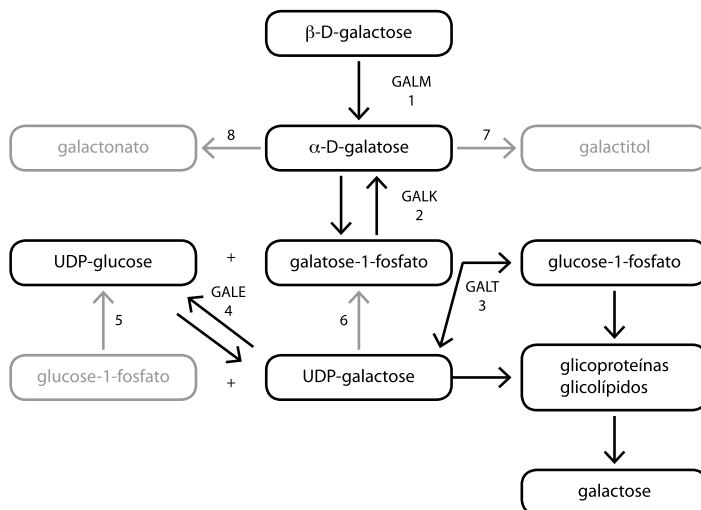
## 1.1. GALACTOSEMIA

A galactosemia clássica é uma doença metabólica hereditária que afecta cerca de 1:30 000 a 1:60 000 recém-nascidos, caracterizada pela deficiência da enzima galactose-1-fosfato uridiltransferase (Fridovich-Keil, 2006). A maioria dos doentes apresenta no período neonatal, após ingestão de leite, uma deterioração neurológica progressiva, cataratas e alterações no aparelho digestivo e renal. O diagnóstico precoce é fundamental para excluir de imediato a galactose da dieta alimentar de modo a evitar sequelas irreversíveis (Bosch, 2006).

## 1.2. METABOLISMO DA GALACTOSE

A galactose é um monossacarídeo, constituinte importante da dieta alimentar desde o nascimento, sendo a fonte mais importante a lactose do leite. A hidrólise da lactose por uma galactosidase – a lactase – nas microvilosidades intestinais, leva à formação de glucose e galactose (Segal *et al*, 1995). No fígado, a galactose é rapidamente metabolizada a glucose-1-fosfato pela acção de quatro enzimas que constituem a “via de Leloir”: galactose mutarotase (GALM), galactocinase (GALK), galactose-1-fosfato uridiltransferase (GALT) e UDP galactose-4-epimerase (GALE) (Holden *et al*, 2003).

No primeiro passo, a  $\beta$ -D-galactose é epimerizada a  $\alpha$ -D-galactose pela enzima GALM (reacção 1) (figura 1). Por sua vez, a GALK catalisa a fosforilação da  $\alpha$ -D-galactose a galactose-1-fosfato, com gasto de ATP (reacção 2) (Bosch, 2006). Posteriormente, a galactose-1-fosfato reage com UDP-glucose, por acção da GALT, produzindo glucose-1-fosfato e UDP-galactose (reacção 3). Esta pode ser utilizada para a síntese de glucoconjugados ou ser convertida a UDP-glucose (pela GALE) (Vásquez, 2007). As reacções 3 e 4 podem funcionar de modo cíclico até que toda a galactose-1-fosfato que entra na via a partir de galactose seja convertida a glucose-1-fosfato e, subsequentemente, a glucose-6-fosfato. A reacção da epimerase mantém a proporção de 3:1 entre UDP-glucose e UDP-galactose (Segal *et al*, 1995).



**Figura 1.** Reacções do metabolismo da galactose responsáveis pela interconversão galactose-glucose na via de Leloir e vias acessórias [adaptado de Segal *et al*, 1995].

Além da via de Leloir, existem três vias acessórias que metabolizam apenas quantidades vestigiais de galactose (Vásquez, 2007). No entanto, na ausência da enzima GALT, estas vias podem tornar-se significativas (Fridovich-Keil, 2006).

A via acessória da pirofosforilase converte glucose-1-fosfato a UDP-glucose (reação 5) que, por sua vez, é convertida em UDP-galactose pela enzima GALE. A UDP-galactose formada também pode ser fonte da galactose-1-fosfato celular por clivagem de pirofosfato (reação 6) (Segal *et al*, 1995). Deste modo, assegura-se uma síntese endógena de galactose, utilizada para síntese de complexos lipídicos e glicoproteínas. A segunda via é catalisada pela aldose reductase que reduz a galactose a galactitol (reação 7) (Fridovich-Keil, 2006). Por fim, a terceira via metabólica produz galactonato a partir de galactose por acção de uma desidrogenase (reação 8) As duas últimas vias acessórias têm um papel importante na patogenia da galactosemia (Vásquez, 2007).

### 1.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O início da doença pode ocorrer *in utero* uma vez que as vias metabólicas da galactose se desenvolvem por volta da 10ª semana de gestação. Só após a ingestão de leite, é que a doença se começa a desenvolver de forma aguda e fulminante associada a sepsis neonatal por *E. coli*. No entanto, a forma mais frequente é a sub-aguda apresentando como sintomas vômitos, diarreia, icterícia, hepatomegalia, ascite, aumento plasmático de fenilalanina e tirosina, galactosúria, aumento de galactose-1-fosfato plasmática, entre outros (Vásquez, 2007).

Apesar da dieta restrita em galactose, ocorrem complicações tardias que podem ter origem na produção endógena de galactose, resultante da reciclagem de hidratos de carbono complexos, assim como da possível quebra de UDP-galactose (Segal *et al*, 1995).

Manifestações clínicas englobam ainda alterações do sistema nervoso (sob a forma de diminuição do QI, dispraxia verbal e tremores), disfunção ovárica, atraso no crescimento, osteoporose, cataratas (resultantes da acumulação de galactitol) (Vásquez, 2007).

### 1.4. DIAGNÓSTICO

O rastreio sistemático neonatal deveria permitir a identificação de todos os possíveis doentes com galactosemia clássica para confirmação do diagnóstico precoce de modo a evitar sequelas no recém-nascido (Vásquez, 2007).

Os métodos usados no diagnóstico da galactosemia clássica, incluem: i) pesquisa de substâncias redutoras na urina, que tem a desvantagem de a galactose poder desaparecer entre 8-12 h após ser eliminada da dieta; ii) teste de rastreio neonatal que detecta galactose total (Bosch, 2006); iii) teste de Beutler para actividade de GALT (Fujimoto *et al*, 2000); determinação de galactitol ou galactose-1-fosfato por espectrometria de massa *em tandem*; iv) caracterização molecular para identificação de mutações no gene GALT (Vásquez, 2007).

Em Portugal, o diagnóstico da galactosemia clássica tem por base a suspeita desta patologia, sendo a amostra enviada para o Laboratório Nacional de Rastreio onde é quantificada a galactose total e avaliada a actividade de GALT.

## 1.5. BIOLOGIA MOLECULAR

O gene GALT encontra-se no cromossoma 9 (9p13) e possui 11 exões em 4.3 kb de DNA. Até à data, mais de 180 mutações e várias dezenas de polimorfismos foram descritos no *locus* GALT com uma distribuição muito variável em função da raça e área geográfica. A maioria das alterações são mutações *missense*, sendo as mais frequentes a p.Q188R, p.K285N e p.S135L. Na tabela 1 estão descritas as alterações ao nível do DNA e aminoácido (Bosch *et al*, 2005)

**Tabela 1.** Mutações mais frequentes do gene GALT [adaptado de Tyfield, 2000].

Mutação	Região (exão)	Nome nucleótido	Nomenclatura do nucleótido	Alteração de aminoácido	Tipo de mutação	Origem predominante
p.Q188R	E6	c.563 A>G	CAG/CGG	Glutamina para arginina	<i>Missence</i>	Caucasóide
p.K285N	E9	c.855G>T	AAG/AAT	Lisina para asparagina	<i>Missence</i>	Caucasóide
p.S135L	E5	c.404C>T	TCG/TTG	Serina para leucina	<i>Missence</i>	Negróide

A mutação p.Q188R é a mais frequente (60-70%) na população europeia (Bosch, 2006). Esta mutação encontra-se num domínio altamente conservado entre as espécies, muito próximo do presumível centro catalítico da enzima (Tyfield, 2000). A segunda mutação mais frequente é a p.K285N que, em algumas populações, contabiliza 25% a 40% dos alelos mutantes (Gort *et al*, 2006). Estas mutações estão associadas a um fenótipo severo provocado pela ausência de actividade GALT (Tyfield, 2000). Em Portugal, a mutação mais frequente é a p.Q188R (58%), seguida da mutação c.820+13a>g (4,7%). A mutação p.K285N não foi ainda encontrada na população portuguesa (Gort *et al*, 2006). A mutação p.S135L aparece quase exclusivamente em indivíduos de origem africana e está associada a fenótipo com severidade intermédia, exibindo especificidade tecidual (Manga *et al*, 1999).

## 1.6. TRATAMENTO

O tratamento consiste na remoção de galactose da dieta, o que reverte os sintomas clínicos iniciais (Segal *et al*, 1995). No recém-nascido, o aleitamento materno é absolutamente contra-indicado, sendo a fórmula de soja o ideal para providenciar cálcio (Gort *et al*, 2006).

Embora qualquer fonte de galactose exógena seja seguramente insignificante quando comparada com a produção endógena, as alterações tardias presentes em doentes com deficiência na enzima GALT justificam a utilização controlada de alguns alimentos não-lácteos (Vásquez, 2007). É possível que a tolerância à galactose aumente com a idade como resultado da diminuição da produção endógena de galactose nos adultos (Segal *et al*, 1995).

O controlo da evolução do doente deve ser realizado periodicamente (uma a quatro vezes por ano dependendo da idade) através de exames antropométricos, neurológicos, psicomotores e do desenvolvimento da fala e linguagem assim como monitorizados os níveis de galactose-1-fosfato e o quociente galactitol/creatinina (Bosch *et al*, 2005).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. AMOSTRAS

As amostras incluídas neste estudo foram irreversivelmente anonimizadas conforme estipulado no Artº19 da Lei nº12/2005 de 26 de Janeiro, depois de recolhidas em Hospitais ou Centros de Saúde do País, entre o terceiro e o sexto dias de vida e enviadas para o Laboratório Nacional de Rastreios. As amostras recolhidas desde 1 de Janeiro a 30 de Setembro de 2007 foram seleccionadas com base em: i) valores de tirosina superiores a 500,00 mg/dl; ii) valores de fenilalanina superiores a 148,00 mg/dl (obtidos por espectrometria de massa *em tandem*).

Foram escolhidas estas amostras pois são os valores limites considerados como normais no Laboratório de Diagnóstico Precoce do Instituto de Genética Médica Jacinto Magalhães – Porto. Foi ainda analisada uma amostra por suspeita clínica de galactosemia. Também foi realizada a caracterização molecular do gene GALT em três membros de uma família (mãe e dois filhos). Sabia-se de antemão que um dos filhos era doente e que a mãe era portadora, pretendendo-se determinar se o segundo filho (recém-nascido) era portador ou doente.

### 2.2. EXTRACÇÃO DAS AMOSTRAS

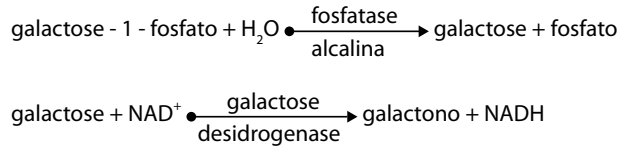
As amostras consistiram em discos de papel de filtro (Schleicher and Schuell 903, S&S) impregnados com sangue total (~2,84µl). Adicionou-se ácido tricloroacético a 3% para extracção das proteínas.

No teste de Beutler adicionou-se saponina para lisar a membrana eritrocitária e, deste modo, libertar a enzima GALT.

O DNA foi extraído recorrendo ao kit de sangue total EZ1 (Qiagen®, Alemanha) e, para sangue seco utilizou-se o kit de tecidos EZ1 (Qiagen®, Alemanha). Foi usado o equipamento de extracção automática EZ1 (Qiagen®, Alemanha).

### 2.3. DOSEAMENTO DE GALACTOSE-1-FOSFATO

O doseamento de galactose-1-fosfato foi realizado utilizando o *Quantase™ Neonatal Total Galactose Screening Assay* (Bio-Rad, Inglaterra). Este *kit* baseia-se num método enzimático colorimétrico que doseia galactose total a partir da conversão de galactose-1-fosfato em galactose após adição de fosfatase alcalina. A galactose total é quantificada pela redução de NAD<sup>+</sup> a NADH pela galactose desidrogenase (figura 2). De acordo com Orfanos *et al.* (1986), este método pode ser modificado de modo a obter o valor de galactose-1-fosfato. Nesta adaptação a amostra é testada em duplicado, sendo num ensaio adicionadas as duas enzimas (fosfatase alcalina e galactose desidrogenase) e no outro apenas a galactose desidrogenase. No primeiro são doseadas a galactose e a galactose-1-fosfato e no segundo apenas a galactose. As leituras de densidade óptica foram realizadas em microplaca, a 570/690 nm no Tecan Spectra. A diferença entre os dois resultados fornece o valor da concentração de galactose-1-fosfato.



**Figura 2.** Reacções enzimáticas envolvidas no método de doseamento enzimático de galactose total.

## 2.4. TESTE DE BEUTLER

No teste de Beutler averigua-se a presença ou ausência de actividade de GALT o que revela a ausência ou presença de galactosemia. Quando a transferase está presente forma-se glucose-1-fosfato que é convertida pela fosfoglucomutase (presente nos eritrócitos) em glucose-6-fosfato. A glucose-6-fosfato é oxidada pela sua desidrogenase com redução simultânea de  $\text{NADP}^+$  a NADPH (fluorescente sob luz ultravioleta), que serve como indicador da actividade de GALT (Beutler *et al*, 1966).

## 2.5. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE GALT

A detecção e identificação de mutações foram efectuadas por sequenciação directa a partir de produtos de PCR. O PCR de amplificação foi realizado recorrendo a *primers* específicos para os 11 exões e regiões intrónicas adjacentes do gene GALT. Para desenho dos *primers* foi utilizado o Primer 3.0 e testados *in silico* com auxílio do programa *FastPCR*.

O DNA das amostras foi amplificado no termociclador *Thermal Cycler* (Bio-Rad, Inglaterra). Os produtos de PCR foram analisados numa electroforese em gel de agarose a 2% (Invitrogen, EUA) utilizando-se, para visualização do DNA, o corante *SYBRGreen* (Qiagen, Alemanha).

Após purificação com *Exosap* (GE Healthcare, Suécia), os produtos de PCR obtidos foram sequenciados em ambas as direcções (*forward* e *reverse*) recorrendo ao *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* (*Applied Biosystems*, EUA) e ao sequenciador *ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser* (*Applied Biosystems*, EUA). A análise das sequências foi feita com base na sequência do gene GALT.

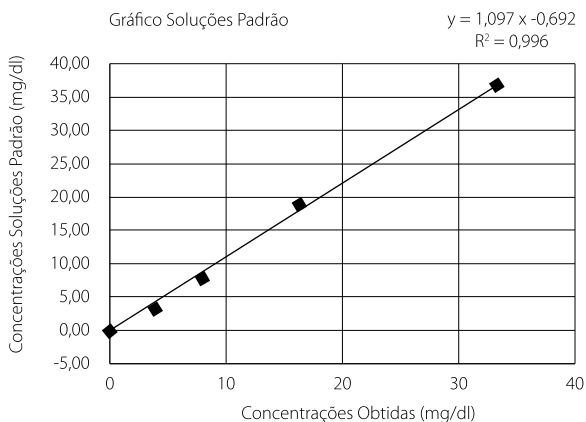
## 3. RESULTADOS

### 3.1. DOSEAMENTO DA GALACTOSE-1-FOSFATO

Para averiguar a exactidão do método utilizado no doseamento de galactose-1-fosfato, foram preparadas várias soluções padrão de galactose-1-fosfato, que foram utilizadas para testar o referido método. A tabela 2 apresenta os valores de galactose-1-fosfato das soluções padrão e os valores de concentração obtidos para as mesmas soluções. A correlação entre estes valores apresenta-se na figura 3.

**Tabela 2.** Valores de concentração de soluções padrão de galactose-1-fosfato e suas concentrações obtidas utilizando o método de doseamento de galactose-1-fosfato.

[Galactose-1-fosfato] (mg/dl)	Média obtida da [Galactose-1-fosfato] (mg/dl)	Coefficiente de variação (%)
0,00	0,00	0,00
4,20	3,08 ± 1,78	57,79
8,40	7,78 ± 2,68	34,45
16,80	18,95 ± 3,37	17,78
33,60	35,88 ± 8,75	24,39



**Figura 3.** Correlação entre as concentrações das soluções padrão e as concentrações das soluções obtidas utilizando o método de doseamento de galactose-1-fosfato.

Para determinar os valores normais de concentração de galactose-1-fosfato realizou-se o doseamento em 75 amostras de sangue seco de recém-nascidos sem galactosemia. A concentração média obtida foi de 5,00 mg/dl com uma amplitude entre 0,00 e 10,93 mg/dl. Este valor de galactose-1-fosfato encontra-se de acordo com Walter *et al* (1999).

Uma vez que em situações de galactosemia, os valores de galactose-1-fosfato se encontram muito aumentados (pelo menos duas vezes o valor normal), considerou-se, para este estudo, o valor limite de 10,00 mg/dl para prosseguir com o estudo, de modo a evitar falsos positivos.

Doseamento de galactose foi feito em 144 amostras (77 com valores de tirosina > 500,00 mg/dl, 62 amostras com valores de fenilalanina > 148,00 mg/dl e 5 com ambos aumentados). Das 144 amostras, obteve-se 11 com valores de galactose superiores a 4,00 mg/dl. Para estas 11 amostras, realizou-se o doseamento de galactose-1-fosfato, tendo-se obtido 2 com valores de galactose-1-fosfato superiores a 10,00 mg/dl (amostra A = 55,38 mg/dl e amostra E = 10,81 mg/dl). Adicionalmente foi realizado o doseamento de galactose e galactose-1-fosfato numa amostra enviada por suspeita clínica de galactosemia (amostra B) cujos resultados foram de 114,92 mg/dl e 116,51 mg/dl, respectivamente, portanto, valores superiores aos considerados normais. O segundo filho (amostra F) do estudo familiar do gene GALT, apresentou níveis de galactose de 3,00 mg/dl, valor considerado dentro dos parâmetros normais.



### 3.2. TESTE DE BEUTLER

As amostras com valores de galactose-1-fosfato superiores a 10 mg/dl foram submetidas ao teste de Beutler (A e E) para comprovar a existência de uma galactosemia clássica, isto é, amostras sem fluorescência sob luz ultravioleta não possuem actividade de GALT. A amostra B corresponde à suspeita clínica de galactosemia. As amostras C e D que correspondem às amostras dos filhos da família analisada, foram sujeitas ao teste de Beutler apenas como controlos positivo e negativo, respectivamente (tabela 3).

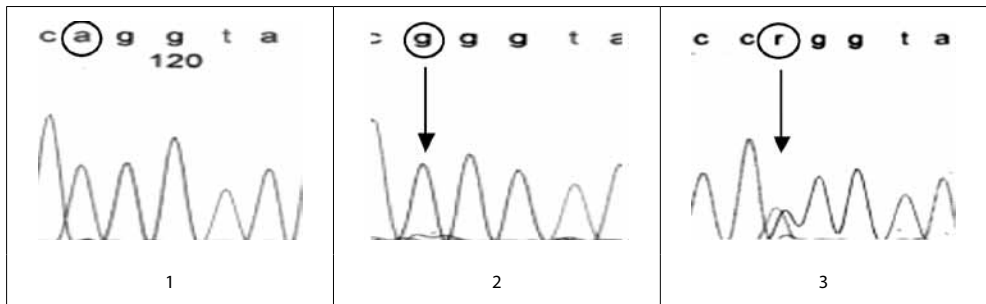
**Tabela 3.** Resultados obtidos no teste de Beutler.

Amostras	Resultado
A	Ausência de actividade
B	Ausência de actividade
C	Ausência de actividade
D	Presença de actividade
E	Presença de actividade

### 3.3. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENE GALT

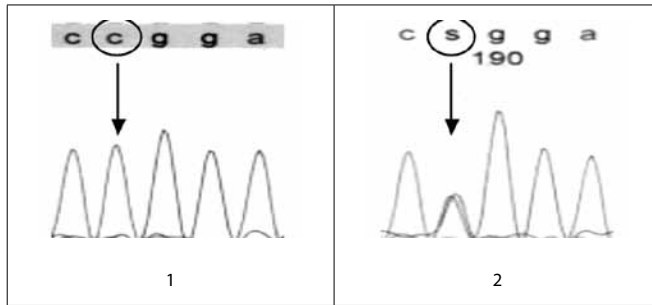
A caracterização molecular foi realizada para as amostras que não apresentavam actividade de GALT pelo teste de Beutler. Foi realizada a caracterização molecular da mãe (paciente F), por se saber previamente que era portadora da doença.

A análise do exão 6 do gene codificante da GALT no paciente A, revelou a presença, em homocigotia, da troca A@G no nucleótido 563 (c.563 A>G), que leva à substituição p.Q188R. Nos pacientes B, C, D e F esta alteração foi encontrada em heterocigotia (figura 4).



**Figura 4.** Representação parcial da sequência do exão 6 do gene GALT. 1 - Sequência normal; 2. -Sequência de um indivíduo homocigótico para a alteração c.563 A> G (A); 3 - Sequência de um indivíduo heterocigótico para a alteração c.563 A> G (B, C, D e F).

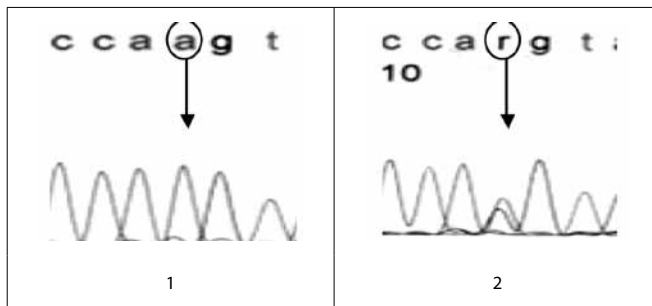
A análise do exão 10 no paciente B revelou uma alteração C@G no nucleótido 997 (c.997 C>G), que resulta na substituição p.R333G (figura 5).



**Figura 5.** Representação parcial da sequência do exão 10 do gene GALT.

1 - Sequência normal; 2 - Sequência de um indivíduo heterozigótico para a alteração c. 997 C> G (B).

No paciente C, a análise do intrão 8 revelou uma alteração A@G no nucleótido 13 desse intrão (c.820+13 a>g) (figura 6).



**Figura 6.** Representação parcial da sequência do intrão 8 do gene GALT.

1 - Sequência normal; 2 - Sequência de um indivíduo heterozigótico para a alteração c.820+13 a>g (C).

#### 4. DISCUSSÃO

A galactosemia clássica é uma doença cujo diagnóstico precoce é importante para prevenir ou reverter o quadro sub-agudo da doença. Através deste trabalho pretendeu-se criar um método de diagnóstico mais rápido, pouco dispendioso e eficaz.

Na primeira fase do trabalho foi realizada uma adaptação do *kit Quantase™ Neonatal Total Galactose Screening Assay* (Bio-Rad, Inglaterra) para quantificar a galactose-1-fosfato, uma vez que é um marcador mais específico da doença. A partir dos resultados obtidos nas diferentes concentrações das soluções-padrão é possível constatar um coeficiente de variação entre os 18% e 58% sendo o valor considerado aceitável <20%, e o valor> 50% indica uma elevada dispersão dos valores relativamente à média. No entanto, os próprios controlos disponibilizados no *kit*, podem demonstrar uma variação entre 5,25 – 11,67 mg/dl e 25,03 – 42,93 mg/dl de galactose total, quando quantificados pelo método usado neste estudo.

Apesar desta adaptação do *kit* não demonstrar uma boa precisão é possível através do método utilizado distinguir convenientemente amostras com níveis aumentados de galactose-1-fosfato, que deverão ser posteriormente analisadas pelo teste de Beutler.

Das 144 amostras analisadas, 2 apresentaram valores superiores a 10,00 mg/dl de galactose-1-fosfato e destas apenas 1 apresentava ausência de actividade da enzima GALT. O doseamento de galactose-1-fosfato reduziu o número de falsos positivos, assim como uma desnecessária realização do teste de Beutler. Através deste rastreio a dois tempos (doseamento de tirosina e fenilalanina por MS/MS seguido de doseamento de galactose e galactose-1-fosfato), é possível realizar um diagnóstico bioquímico mais rápido. No entanto este tipo de rastreio não é tão linear, uma vez que podem surgir doentes que não apresentam valores aumentados de tirosina e fenilalanina (caso do paciente B). Mas o mais frequentemente observado no laboratório de Diagnóstico Precoce do Instituto de Genética Médica são doentes galactosémicos com valores alterados de tirosina e/ou fenilalanina.

Após confirmação da galactosemia clássica pelo teste de Beutler, realizou-se a caracterização molecular do gene GALT. Em todos os casos se encontra presente a mutação mais frequente (p.Q188R). No caso A, esta mutação encontra-se em homocigotia e nos casos B e C em heterocigotia com outra mutação. Os pacientes D e F apenas apresentam a mutação p.Q188R em heterocigotia logo não são doentes galactosémicos, mas sim portadores da doença. A alteração c.820+13 a>g encontrada no caso C, é a segunda mutação mais frequente em Portugal e a mutação p.R333G encontrada no caso B não tinha sido detectada até à data em doentes portugueses (Gort *et al*, 2006).

## BIBLIOGRAFIA

- BEUTLER E, Baluda MC. (1966) A simple spot screening test for galactosemia. *J Lab Clin Med*; 68:137–41.
- BOSCH AM, IJlst L, Oodtheim W, *et al*. (2005) Identification of novel mutations in classical galactosemia. *Human Mutation*; 801: 1-7.
- BOSCH AM. (2006) Classical galactosaemia revisited. *J Inherit Metab Dis*; 29: 516-525.
- FUJIMOTO A, Okano Y, Miyagi T, Isshiki G, Oura T. (2000) Quantitative Beutler test for newborn mass screening of galactosemia using a fluorometric microplate reader. *Clinical Chemistry*; 46(6): 806-810.
- GORT L, Boleda MD, Tyfield L, *et al*. (2006) Mutation Spectrum of classical galactosaemia in Spain and Portugal. *J Inherit Metab Dis*; 29: 739-742.
- HOLDEN HM, Rayment I, Thoden JB. (2003) Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*; 278(45): 43885-43888.
- MANGA N, Jenkins T, Jackson H, Whittaker DA, Lane AB. (1999) The molecular basis of transferase galactosaemia in South African negroids. *J Inher Dis*; 22: 37-42.
- ORFANOS AP, Jinks DC, Guthrie R. (1986) Microassay for estimation of galactose and galactose-1-phosphate in dried blood specimens. *Clinical Biochemistry*; 19: 225-228.
- SEGAL S, Berry GT. (1995) Disorders of galactose metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WJ, Valle D, eds. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 7th. New York: McGraw Hill; pp. 967-1000.
- TYFIELD LA. (2000) Galactosaemia and allelic variation at the galactose-1-phosphate uridylyltransferase gene: a complex relationship between genotype and phenotype. *Eur J Pediatr*; 159[supl3]: S204-S207.
- VÁSQUEZ AB. (2007) Errores congénitos del metabolismo de la galactosa. In: Sanjurjo P, Vasquez AB, eds. *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias*. 2ª ed. Madrid: Ediciones Ergon; pp. 282-291.
- WALTER JH, Collins JE, Leonard JV. (1999) Recommendations for the management of galactosaemia. *Arch Dis Child*; 80: 93-96.